

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GUSTAVO JOSÉ PASSARI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PARÂMETROS NA PRODUÇÃO DO ÉSTER
GALATO DE ISOAMILA POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO DE SOLVENTE
CATALISADA POR LIPASES NAS FORMAS LIVRES**

Alfenas/MG

2022

GUSTAVO JOSÉ PASSARI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PARÂMETROS NA PRODUÇÃO DO ÉSTER
GALATO DE ISOAMILA POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO DE SOLVENTE
CATALISADA POR LIPASES NAS FORMAS LIVRES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biomoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Passari, Gustavo José.

Avaliação do efeito de parâmetros na produção do éster galato de isoamila por esterificação em meio de solvente catalisada por lipases nas formas livres / Gustavo José Passari. -

Alfenas, MG, 2022.

53 f. : il. -

Orientador(a): Ernandes Benedito Pereira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Ésteres lipofílicos. 2. Ácido gálico. 3. Esterificação. 4. Lipases. I. Pereira, Ernandes Benedito, orient. II. Título.

AValiação DO EFEITO DE PARâMETROS NA PRODUÇÃO DO ÉSTER GALATO DE ISOAMILA POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO DE SOLVENTE CATALISADA POR LIPASES NAS FORMAS LIVRES

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovado em: 04 de março de 2022

Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Larissa de Freitas
Instituição: Escola de Engenharia de Lorena, USP – (EEL-USP)

Profa. Dra. Ana Karine Furtado de Carvalho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas.



Documento assinado eletronicamente por Ernandes Benedito Pereira, Professor do Magistério Superior, em 04/03/2022, às 10:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por LARISSA DE FREITAS, Usuário Externo, em 04/03/2022, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por ANA KARINE FURTADO DE CARVALHO, Usuário Externo, em 04/03/2022, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0686033 e o código CRC DD19A6BA.

Dedico esta dissertação aos meus pais Paula Vida e Antônio Carlos, à minha irmã Fernanda e aos meus amigos que me apoiaram e incentivaram. Vocês fazem parte desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade concebida pela força e perseverança para alcançar minhas metas.

Aos meus pais Antônio Carlos e minha mãe Paula Vida, por serem meu porto seguro, por todo carinho, apoio, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial e viverem tudo isso comigo sem medir esforços. Obrigado por serem minha base e por todo cuidado e carinho que sempre tiveram comigo.

À minha irmã Fernanda pela ajuda, apoio e incentivo durante esses meses longe de casa.

Aos meus amigos que mesmo distante sempre me apoiaram, torceram e emanaram energias positivas para que esse sonho tornasse concreto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira pela confiança, atenção, dedicação e principalmente pelo companheirismo.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-02196-15) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processos 404929/2016-8 e 310633/2020-6) pelo suporte financeiro.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Alfenas pela concessão da bolsa de mestrado (PIB-Pós/UNIFAL-MG).

RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu na produção enzimática de um éster com atividade antioxidante (galato de isoamila) por esterificação de ácido gálico e álcool isoamílico em meio de solvente (terc-butanol). Oito lipases comerciais de diferentes fontes como *Mucor javanicus* (LMJ), *Rhizopus niveus* (LRN), *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Rhizomucor miehei* (LRM), *Candida* sp. (LCsp), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e animal obtida de pâncreas de porco (LPP) foram avaliadas na produção do éster na forma de extratos enzimáticos brutos (lipases livres). Após a seleção das lipases com maior atividade catalítica, foram avaliadas as influências de relevantes parâmetros na reação como temperatura de reação (35°C a 60°C), concentração de biocatalisador baseada na atividade catalítica na hidrólise da emulsão de azeite de oliva (250 U a 2000 U), razão molar ácido:álcool (1:1 a 1:2) e tempo de reação. As reações foram realizadas em triplicata em frascos fechados contendo 5 mL de meio de reação empregando concentração fixa de ácido gálico no meio de reação (250 mM) e agitação mecânica (240 rpm). O progresso das reações foi determinado pelo consumo de ácido gálico na reação pelo método titulométrico. De acordo com os resultados, os máximos valores de porcentagem de conversão foi da ordem de 55% após 105 min de reação para LPF e 40% após 90 min de reação para LPP foram alcançados empregando razão estequiométrica de ácido gálico e álcool isoamílico (1:1 – 250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol) temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF, 1000 U de atividade hidrolítica para cada enzima (0,12 g de lipase de LPF e 0,19 g de LPP). Estes resultados revelam que a aplicação de uma lipase de baixo custo (LPP) pode ser promissora na produção de ésteres com propriedades antioxidantes, uma importante classe de compostos empregados na área de alimentos e cosméticos

Palavras-chave: Ésteres lipofílicos; Ácido gálico; Esterificação; Lipases

ABSTRACT

The objective of this work was the enzymatic production of an ester with antioxidant activity (isoamyl gallate) by esterification of gallic acid and isoamyl alcohol in solvent medium (terc-butanol). For such purpose, eight commercial lipases from different sources were used in their free forms (crude enzymatic extracts) as biocatalysts: *Mucor javanicus* (LMJ), *Rhizopus niveus* (LRN), *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Rhizomucor miehei* (LRM), *Candida* sp. (LCsp), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) and porcine pancreas (LPP). After selecting the lipase sources with the highest catalytic performance on the ester production, it was evaluated the influence of relevant parameters on the reaction such as temperature (35°C–60°C), biocatalyst concentration based on the catalytic activity in olive oil emulsion hydrolysis (250 U–2000 U), molar ratio acid:alcohol (1:1–:2) and reaction time. In this study, esterification reactions have been performed em closed flasks containing 5 mL of reaction mixture at fixed gallic acid concentration (250 mM) and mechanical stirring (240 rpm). The progress of the reaction has been measured by determining the residual gallic acid in the reaction by titrimetric method. According to results, maximum acid conversion percentage around 55% after 105 min of reaction using LPF and 40% after 90 min of reaction catalyzed by LPP were achieved under such experimental conditions: stoichiometric molar ratio acid:alcohol (1:1 – 250 mM of each reactant), 40°C for LPP and 55°C for LPF, 1000 U of hydrolytic activity (0.12 g of LPF and 0.19 g of LPP). These results reveal that the application of a low-cost lipase as LPP can be highly promising for producing a lipophilic ester with antioxidant properties, an important class of compounds used in the food and cosmetic formulations.

Keywords: Lipophilic esters; Gallic acid; Esterification; Lipases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do ácido gálico..... **15**

ARTIGO

Figura 1 - Reação de esterificação entre ácido gálico e álcool isoamílico **35**

Figura 2 - Efeito da fonte de lipase na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas a 40°C, razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, 1000 unidades de atividade hidrolítica de cada lipase (0,16 g de LMJ, 0,36 g de LRN, 40 µL de LTL, 1,14 mL de LRM, 1,25 mL de LCsp, 0,062 g de LCR, 0,12 g de LPF, e 0,19 g de LPP) e 4 h de reação..... **37**

Figura 3 - Efeito da temperatura de reação na produção de galato de isoamila catalisada por LPP (A) e LPF (B) em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, 1000 unidades de atividade hidrolítica de cada lipase (0,12g de LPF e 0,19 g de LPP) e 4 h de reação **39**

Figura 4 - Efeito da concentração de lipase na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF e 2 h de reação **40**

Figura 5 - Efeito da razão molar ácido:álcool na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas empregando concentração fixa de ácido (250 mM), agitação mecânica de 240 rpm, temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF e 2 h de reação..... **41**

Figura 6 - Efeito do tempo de reação na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol catalisada por LPF e LPP. As reações foram conduzidas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240rpm, e temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF **42**

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

- Tabela 1** - Informações técnicas e propriedades das preparações de lipases comerciais testadas neste estudo..... **34**
- Tabela 2** - Principais equipamentos utilizados neste trabalho **34**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
IV	Espectroscopia de infravermelho
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LCsp	Lipase de <i>Candida</i> sp.
LMJ	Lipase de <i>Mucor javanicus</i>
LPP	Lipase de pâncreas de porco
LPF	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
LRM	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
LRN	Lipase de <i>Rhizopus niveus</i>
LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
LP	Lipase pancreática humana
RMN	Ressonância magnética nuclear

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
	CAPÍTULO 1.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Ácido gálico.....	15
2.2	Obtenção do éster via química versus via enzimática.....	16
2.3	Ésteres e aplicações de ésteres de Ácido Gálico.....	17
2.4	Enzimas.....	19
2.5	Lipases.....	20
2.6	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (LPF).....	21
2.7	Lipase de pâncreas de porco (Porcine pancreas - LPP).....	22
	Referências.....	24
	CAPÍTULO 2.....	31
	ARTIGO: Avaliação do efeito de parâmetro na produção do éster galato de isoamila por esterificação em meio de solvente catalisada por lipases na forma livre.....	31
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
4	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	46
	REFERENCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Nos últimos anos, a adoção de processos biotecnológicos vem se apresentando como uma das vertentes que possibilitam a aplicação sustentável da biodiversidade para a produção de diversos compostos de interesse industrial (ALMEIDA *et al.*, 2021; BOLINA *et al.*, 2021; BASSO e SERBAN, 2019). Diferentes compostos obtidos de fontes renováveis são explorados por estas rotas como biocombustíveis, polímeros, ácidos orgânicos, antibióticos, enzimas industriais, alimentos funcionais, proteínas entre muitos outros. Estes processos têm sido conduzidos empregando preferencialmente células íntegras de diferentes fontes (microrganismos, células animais e vegetais) ou enzimas. A aplicação de biocatalisadores é atrativa do ponto de vista industrial porque estes apresentam alta atividade catalítica em condições brandas de reação (temperaturas moderadas e pressão atmosférica) e especificidade que reduz a formação de subprodutos que facilita as etapas de separação e purificação (ALMEIDA *et al.*, 2021). Desta forma, surge como alternativa o emprego de lipases como biocatalisador. As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3), são enzimas que têm sido uma das mais empregadas no setor industrial, tais como, no setor alimentício (desenvolvimento de aromas, maturação de queijos, lipídeos estruturados, e emulsificantes), cosmético (emolientes e ésteres com propriedades antioxidantes), farmacológico (síntese de naxopreno, ibuprofeno), agroquímico (inseticidas, e pesticidas), oleoquímico (hidrólise de óleos e gorduras, biosurfactantes e biolubrificantes), formulação de detergentes, e na geração de energia (biodiesel). Esta importante classe de enzimas pode catalisar reações tanto em meios aquosos e não convencionais – meios orgânicos com baixa concentração de água (ALMEIDA *et al.*, 2021; BOLINA *et al.*, 2021). Dentre os diferentes produtos de interesse industrial produzidos por lipases, ésteres de ácido gálico são compostos que exibem várias atividades biológicas, incluindo proteção cardiovascular, atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anticâncer e anti-inflamatórias (AL ZHRANI *et al.*, 2020; GUTIERREZ *et al.*, 2020). Além disso, estes compostos também apresentam atividade anti-hiperglicêmica devido ao seu efeito inibitório sobre enzimas digestivas como amilase (DRAGANO *et al.*, 2020; GUTIERREZ *et al.*, 2020).

Os comprimentos das cadeias carbônicas introduzidas pela esterificação empregando diferentes álcoois como aceptores acila afetam diferentemente suas atividades farmacológicas (AL ZAHRANI *et al.*, 2020; GUTIERREZ *et al.*, 2020). Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade catalítica de oito preparações comerciais de lipases de *Mucor javanicus* (LMJ), *Rhizopus niveus* (LRN), *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Rhizomucor miehei* (LRM), *Candida sp.* (LCsp), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e lipase de origem animal obtida de pâncreas de porco (LPP) na produção de éster de ácido gálico (galato de isoamila). A escolha de álcool isoamílico, um álcool proveniente do óleo fúsel ($\approx 70\%$ mol/mol) gerado na destilação do etanol, se deve ao seu baixo custo e de fácil obtenção no país (CERÓN *et al.*, 2018). O éster foi obtido por esterificação direta de ácido gálico e álcool isoamílico em meio de terc-butanol, avaliando a conversão da reação e a sua produtividade. A aplicação de terc-butanol como solvente orgânico foibaseada na elevada solubilidade do ácido gálico (sólido nas condições de ensaio) como intuito de preparar um sistema reacional com boa dispersão dos materiais de partida empregados neste estudo.

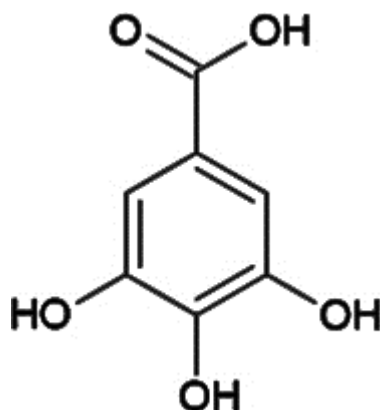
CAPÍTULO 1

2 REVISÃO LITERATURA / DESENVOLVIMENTO

2.1 ÁCIDO GÁLICO

O flavonóide ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) é um polifenol encontrado amplamente no reino vegetal, ocorrendo em muitas plantas, como por exemplo, raízes de *Paeonia rockii* (PICERNO *et al.*, 2011), frutos de *Syzygium cumini* (TOBAL *et al.*, 2012), folhas, caules e raízes de variedades diferentes de *Labisa pumila* benth (KARIMI *et al.*, 2011), *Alchornea glandulosa* (CALVO *et al.*, 2007), entre muitos outros. Esse ácido fitoquímico é bem conhecido pelas suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antivirais e analgésicas (BIROSOVÁ; MIKULÁSOVÁ; VAVERKOVÁ, 2005; GIFTSON; JAYANTHI; NALINI, 2009; KANG *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2011). O ácido gálico (Figura 1), consiste em uma estrutura fenólica trihidroxilada, é um intermediário do metabolismo vegetal secundário, e é frequentemente um componente de taninos hidrolisáveis em plantas (GRUNDHÖFER *et al.*, 2001).

Figura 1 - Estrutura química do ácido gálico.



Fonte: O autor (2021).

Caracteriza-se como um sólido branco cristalino, cuja fórmula molecular é

$C_7H_6O_5$ e sua massa molar é de 170,12 g/mol. O ponto de fusão é de 210 °C com decomposição entre 235 a 240 °C, produzindo dióxido de carbono e monóxido de 18 carbonos; a solubilidade do ácido gálico em água é de 12g/L a 20°C. É solúvel em álcool etílico, água, glicerina e praticamente insolúvel em clorofórmio, benzeno e éter de petróleo (PUBCHEM, 2021).

Vários derivados do ácido gálico já foram sintetizados com o objetivo de melhorar suas características físico-químicas, alterando especialmente sua lipofilicidade. Esses polifenóis derivados apresentam diferença somente no número de carbonos da cadeia lateral do ácido gálico (LIMA, 2014).

2.2 OBTENÇÃO DO ÉSTER: VIA QUÍMICA VERSUS VIA ENZIMÁTICA

Ésteres são importantes compostos químicos, atuando como intermediários na síntese de medicamentos, plastificantes, lubrificantes, cosméticos e fármacos (CHOWDHURY *et al.*, 2014; LAGE *et al.*, 2016; VESCOVI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2012). Os ésteres sintéticos são substâncias que apresentam uma combinação de excelente desempenho técnico com propriedades ecológicas satisfatórias por se tratarem de compostos de fácil degradação, além de possuírem baixa toxicidade aquática. Conferem alta estabilidade química às moléculas quando comparados aos ésteres de glicerol, como por exemplo, apresentarem ao menos um átomo de carbono quaternário em sua cadeia.

Na produção de ésteres simples a partir de álcoois de cadeia curta, como metanol, etanol ou butanol e triglicerídeos de origem natural, os catalisadores mais utilizados são hidróxido de sódio ou potássio, hidróxidos e alcóxidos de metais, carbonatos, acetatos e diferentes ácidos, por meio de reações de esterificação (MACHADO, 2018).

Uma produção economicamente viável de ésteres em escala industrial deve atender, no mínimo, aos seguintes critérios: bom rendimento, poucos subprodutos, balanço energético favorável, pequeno impacto no meio ambiente e simplicidade. Entretanto, apenas poucos dentre os inúmeros processos publicados na literatura especializada, de fato, atendem a esses requisitos (LAMSA, 1995).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios reacionais não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais.

Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos, catalisadas por lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com sua alta estabilidade em solventes orgânicos; o fato de não requerer a presença de cofatores e por possuir uma larga especificidade pelo substrato e exibir uma alta enantiosseletividade (BONDIOLI, 2005; LINDEMANN *et al.*, 2012; WHITBY, 2015). O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial.

2.3 ÉSTERES E APLICAÇÕES DE ÉSTERES DE ÁCIDO GÁLICO

Os ésteres são compostos químicos frequentemente usados na manufatura de plastificantes, tintas, aromas, produtos farmacêuticos, cosméticos, combustíveis líquidos e lubrificantes (WANG *et al.*, 2016; CHOWDHURY *et al.*, 2014). Esses últimos são ésteres alquílicos que se originam a partir da reação de ácidos carboxílicos e álcoois de cadeia longa, ou seja, compostos com oito ou mais carbonos (LIMA *et al.*, 2018; CHOWDHURY *et al.*, 2014; RUDNICK, 2013).

Classificam-se como compostos orgânicos oxigenados derivados de ácidos carboxílicos. São frequentemente encontrados na natureza estando associados ao odor agradável de flores, frutas e óleos vegetais, também fazem parte da composição de gorduras animais (ésteres graxos) (BOLT; RIEMENSCHNEIDER, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Desenvolvido por Emil Fischer e Arthur (1985) o método mais conhecido para obtenção de ésteres é conhecido como esterificação de Fischer e ocorre entre um ácido carboxílico e um álcool, sob aquecimento e presença de um ácido forte como catalisador (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Trata-se de uma reação reversível que, nas condições descritas, atinge o equilíbrio em poucas horas e dessa forma, para se obter um melhor rendimento desloca-se o equilíbrio para a formação dos produtos, adicionando um dos reagentes em excesso ou retirando a água que vai sendo formada (SOLOMONS, FRYHLE, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Os ésteres, também, são compostos com uma ampla aplicabilidade no setor industrial com destaque para a produção de combustíveis, em especial o biodiesel, é utilizado em fármacos, em aromas nas indústrias alimentícia e cosmética e também é

utilizado como monômero na produção de polímeros (SKORONSKI, 2006).

Dentre os diferentes produtos de interesse industrial produzidos, ésteres de ácido gálico são compostos que exibem várias atividades biológicas, incluindo proteção cardiovascular, atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anticâncer e anti-inflamatórias (AL ZHRANI *et al.*, 2020; GUTIERREZ *et al.*, 2020). Em sua função ácida, o ácido gálico permite a introdução dos mais variados substituintes, possibilitando, desta forma, a obtenção de inúmeros análogos ésteres com os mais distintos efeitos.

Pesquisadores como George Sampsom (1849) e John Lyell (1849) já relatavam a utilização do ácido gálico para o tratamento precoce de insuficiência renal (microalbuminúria). Em 1910, Ehrmann cita que o ácido gálico forma um complexo de coloração vermelha com m-hidroxidifenilamina, o que culminou na sua utilização na indústria de tinturas.

Bucher descreveu em 1945 a capacidade do ácido gálico em proteger a rancificação do óleo de salmão. Kring *et al* (1950), descreveram a habilidade de pequenos ésteres do ácido gálico em prevenir a rancificação de diversas gorduras, semelhante ao que Bucher descreveu.

A partir da década de 70, com a introdução de novos métodos de extração e isolamento (MGEBRISHVILI, 1977; MOLL *et al.*, 1978), a obtenção do ácido gálico a partir de plantas (DA SILVA, 1970; GUVEN *et al.*, 1974) e de microorganismos (KORTH, 1973) passou a ser mais relatada, bem como a síntese química de seus derivados (FORGO; BUCHI, 1970; TAKAHASHI *et al.*, 1977). Na mesma década, estudos de atividade biológica de derivados do ácido gálico foram intensificados.

Estudos demonstram que o ácido gálico apresenta forte ação antioxidante (KIM *et al.*, 2002), anti-inflamatória (KROES *et al.*, 1992), antimutagênica (GICHNER *et al.*, 1987) e antitumoral (LOCATELLI *et al.*, 2013). Com relação à atividade antitumoral, o ácido gálico tem demonstrado também atividade citotóxica seletiva, afetando principalmente células tumorais e não as linhagens celulares normais (SERRANO *et al.*, 1998; YOSHIOKA *et al.*, 2000).

Derivados do ácido gálico têm demonstrado efeitos ainda mais potentes que o seu precursor, provavelmente por apresentarem uma maior permeabilidade às membranas plasmáticas (SAEKI *et al.*, 2000). Um estudo que avaliou a atividade do ácido gálico em linhagem de células de câncer de próstata demonstrou que sua ação

antitumoral está relacionada à indução do apoptose dependente da formação de espécies reativas de oxigênio, as quais seriam produzidas a partir da auto-oxidação do ácido gálico nessa linhagem celular.

2.4 ENZIMAS

Atualmente, a química moderna requer a produção de produtos complexos usando processos que levam a altas conversões e em quantidades muito baixas de subprodutos, conforme refletido pelos princípios da química verde (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020;). Nesse contexto, a biocatálise enzimática está se tornando cada vez mais aplicada como alternativa aos processos químicos tradicionais. As enzimas são altamente ativas sob condições moderadas, exibindo alta seletividade e especificidade, permitindo assim, uma drástica redução nos requisitos de pureza do substrato e na geração de subprodutos (MAGRO *et al.*, 2019).

As enzimas são catalisadores biológicos que facilitam a conversão de um substrato em um produto, pelo fornecimento de condições que diminuam a energia de ativação da reação. Estes biocatalisadores, por sua vez, podem ser proteínas ou glicoproteínas, e consistem de pelo menos uma parte polipeptídica (MIKKELSEN e CORTON, 2004). Tem a função de levar a reação para o seu equilíbrio de uma forma acelerada, provocando uma mudança favorável na energia do sistema. O uso de enzimas em biocatálise é bem consolidado com relação ao estabelecimento de processos mais sustentáveis com finalidade biotecnológica (ASTOLFI; GIRELLI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2019; SCUTO, 2020).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam mais atrativas como catalisadoras para biotransformações, destacando-se o uso na indústria químico-farmacêutica e alimentícia.

O aumento populacional e a busca por processos mais ecológicos impulsionaram a produção de uma grande demanda por produtos e compostos que consigam suprir todos os ramos da indústria, sendo assim, um aprimoramento e aperfeiçoamento de técnicas é necessário. O mercado das enzimas não ficou para trás e teve um grande desenvolvimento decorrente desses avanços (CASTILLA *et al.*, 2018; EHLEBRACHT; FETCHENHAUER, 2016; STAVROVA; SUN *et al.*, 2018).

O interesse no uso das enzimas pode ser explicado por fatores como: a variedade de substratos sobre os quais as enzimas atuam, as reações complexas que as enzimas são capazes de catalisar em rotas onde a geração de resíduos e subprodutos são reduzidos e a capacidade que as mesmas têm de atuar como catalisadoras e altas velocidades em condições reduzidas de energia (AEHLE, 2004). As enzimas podem ser obtidas de várias fontes; animal, vegetal ou microbiana. Esta última possibilita a obtenção de um maior número de enzimas devido à grande variedade de microrganismo existentes e ainda permite a utilização das novas tecnologias de modificações genética (BORNSCHEUER *et al.*, 2019; FREY; HAYASHI; BULLER, 2019). Dentre as principais enzimas de interesse comercial, podem ser destacadas as amilases, proteases, celulasas e lipases alvo desse trabalho, as quais são amplamente empregadas em vários setores industriais (SILVA *et al.*, 2018).

2.5 LIPASES

As lipases (éster triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) desempenham uma pluralidade de funções em diversos setores industriais pela sua ampla especificidade por substratos, disponibilidade comercial e sua capacidade de atuar em concentrações de substrato bem elevadas, tanto em ambientes aquosos (natural dessa classe de enzimas), quanto em solventes orgânicos (RODRIGUES *et al.*, 2019; SEDDIGI *et al.*, 2017). Em sistemas não aquosos (meios orgânicos), elas também catalisam reações de esterificação, transesterificação e interesterificação para a produção de ésteres de interesse industrial como biodiesel, biolubrificantes, ésteres de aroma, lipídios estruturados, polímeros, emolientes, surfactantes, dentre outros (ADLERCREUTZ, 2013; BASSO; SERBAN, 2019; BOLINA *et al.*, 2021 FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais (estômago, tecido adiposo, vascular e linfático, lisossomos), vegetais (oleaginosas) e microbianas (bactérias e fungos), nas quais exercem um papel chave na modificação biológica de lipídios. A maioria das lipases utilizadas como catalisadores em síntese orgânica são de origem microbiana, como as lipases de *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae* (BAN *et al.*, 2001), *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus*, e *Rhizomucor miehei* (AL-ZUHAIR, LIG e JUN; 2007).

As lipases são um dos principais biocatalisadores com potencial comprovado para contribuir com a bioindústria da tecnologia lipídica (TREICHEL *et al.*, 2010; MALDONADO *et al.*, 2016; ARUMUGAM *et al.*, 2018).

A importância tecnológica das lipases está bem documentada na literatura. Assim como outras classes de enzimas, as lipases vêm sendo aplicadas em diversas áreas devido às suas vantagens em comparação com catalisadores químicos: mostram alta seletividade, atuam em condições brandas e são biodegradáveis (FORESTI e FERREIRA, 2005). Considerando estas vantagens, as lipases estão entre os biocatalisadores mais utilizados na área de química orgânica (DIAZ *et al.*, 2006).

2.6 LIPASE DE PSEUDOMONAS FLUORESCENS (LPF)

As lipases de bactérias *Pseudomonas* são conhecidas como lipases termoestáveis (MUSTRANTA; FORSELL; POUTANEN, 1993) e têm sido utilizadas para uma ampla variedade de aplicações biotecnológicas em síntese orgânica (JAEGER; REETZ, 1998) e formulação de detergentes (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). A lipase de *Pseudomonas fluorescens*, comercialmente disponível na sua forma livre e imobilizada, é constituída por uma cadeia de 320 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 33 kDa (BORNSCHEUER *et al.*, 1994; FERNÁNDEZLORENTE *et al.*, 2003; SCHRAG *et al.*, 1997). Seu sítio catalítico é formado pela tríade Ser87-Asp264- His286 (SCHRAG *et al.*, 1997).

A LPF tem a tendência de formar agregados bimoleculares em concentrações enzimáticas moderadas. Essa estrutura bimolecular é muito menos ativa que a forma monomérica da lipase e pode ser dissociada por adição de detergentes (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003).

A LPF, tem sido investigada, pois é produzida por um fungo, adaptado a temperaturas próximas a 40°C (TINTOR, 2014), bem como, devido a suas propriedades, como a enantioseletividade, além de serem usadas para a produção de fármacos, biocombustíveis e de alimentos, a lipase AK pode ter ampla atuação em outras diferentes indústrias (FONSECA *et al.*, 2015, FERREIRA *et al.*, 2014).

É uma lipase não regioespecífica, estável na faixa de temperatura de 20 a 50°C e pH 6-10, enquanto sua atividade ótima foi observada na temperatura de 55°C e pH 8 a 10 (KOJIMA; YOKOE; MASE, 1994; MUSTRANTA; FORSELL; POUTANEN, 1993).

2.7 LIPASE DE PÂNCREAS DE PORCO (PORCINE PANCREAS - LPP)

A lipase pancreática suína (LPP) é a preparação de lipase mais barata comercialmente disponível, o que é recomendado para processos de sínteses em que o custo é considerado como fator crítico (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012; PAULA et al., 2007).

A LPP apresenta uma homologia de 86% com a lipase pancreática humana (LP), tornando-se uma das lipases mais utilizadas em reações de biotransformação (WINKLER *et al.*, 1990; BIRARI; BHUTANI, 2007). Também, a LPP é bastante termoestável, se mantém ativa em meios reacionais anidros, e é economicamente mais viável se comparada com as lipases de origem humana, microbiana e de outros animais (GOGOI *et al.*, 2008).

É uma enzima solúvel em água, com massa molecular de 50 – 52 kDa, composta por 449 resíduos de aminoácidos (WINKLER *et al.*, 1990; MILED *et al.*, 2000), e estável na faixa de temperatura de 35 à 45°C e pH 7,3 - 9,0 (MENDES; OLIVEIRA; CASTRO, 2012), e amplamente aplicada em reações de biotransformação, que inclui hidrólise de óleos para a produção de ácidos graxos, hidrólise enantioseletiva, tratamento de águas residuais ricas em lipídeos, síntese de aromas, fragrâncias, biodiesel, produtos farmacêuticos, emulsificantes e cosméticos (MENDES; OLIVEIRA; CASTRO, 2012).

2.8 REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES: ESTERIFICAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO

As lipases são biocatalisadores versáteis, capazes de catalisar uma série de diferentes reações. De fato, embora sua função natural seja a quebra das ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster a partir de álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). De fato, algumas lipases são mais desejáveis para aplicações de síntese do que hidrólise (RICHETTI, 2009).

No presente trabalho o foco principal foi a reação de esterificação, onde a habilidade da lipase em catalisar a reação reversa de síntese pode ser aplicada na obtenção de inúmeros produtos de interesse, no caso desse trabalho, o éster galato de isoamila. Diversos trabalhos na literatura têm sido reportados no sentido de elucidar os mecanismos cinéticos de reações de esterificação catalisadas por lipases (GANDHI, 1997).

A água gerada durante a reação de esterificação é considerada um parâmetro bastante importante que precisa ser controlado. Mesmo sob condições de baixa concentração de água, durante o curso da reação, onde para cada um mol de água é formado para cada um mol de éster sintetizado. Desta forma, solventes hidrofílicos são geralmente evitados para prevenir a inativação da enzima, a formação desta fase aquosa pode ocorrer facilmente durante a reação. A remoção de água por diversas metodologias pode prevenir este fenômeno e auxiliar na direção da reação para atingir altas conversões (CASTRO *et al.*, 1995), tais como, o uso de peneiras moleculares.

Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores de diferentes da água (YAHYA *et al.*, 1998). Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora (CASTRO e ANDERSON, 1995; YAHYA *et al.*, 1998;).

O critério mais importante na seleção de um solvente orgânico é sua compatibilidade com o catalisador e os substratos da reação. Para tal, o solvente orgânico não deve afetar fortemente a camada de hidratação da enzima, necessária para manter sua conformação nativa.

Os solventes orgânicos utilizados em reações de esterificação catalisadas por lipases incluem benzeno, tolueno, n-hexano, heptano, octano, entre outros (CASTRO; ANDERSON, 1995).

Uma das desvantagens do uso de enzimas em síntese orgânica é a pobre solubilidade da maioria dos compostos orgânicos com mais de quatro átomos de carbono onde o processo é executado em água. A água é um solvente para quase todas as aplicações na indústria química, uma vez que muitos compostos orgânicos são instáveis em soluções aquosas. Portanto, o uso de solventes orgânicos apresenta diversas vantagens, tais como: fácil recuperação do substrato e produtos com alta proporção; é possível o uso de substratos não polares e em muitos casos as lipases são mais ativas (GOTOR-FÉRNANDEZ *et al.*, 2006).

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, Patrick. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.
- AEHLE, W. Enzymes in Industry: **Production and Application**. Wiley VCH, 2 ed., 2004.
- ALMEIDA, F.L.C; CASTRO, M. P.J; TRAVALIA, B. M; FORTE, M. B. S. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis. **Process Biochem.**, Campinas, v.110, p. 37-51, 2021.
- AL ZAHRANI, N. A; EL-SHISHTAWY, R. M; ASIRI, A. M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 204, p. 112-609, 2020.
- AL-ZUHAIR, S; LIG, F. W; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, Elsevier, v.42, p. 951-960, 2007.
- ARUMUGAM, A; THULASIDHARAN, D; JEGADEESAN, G. B. Process optimization of biodiesel production from *Hevea brasiliensis* oil using lipase immobilized on spherical silica aerogel. **Renewable Energy**, v. 116, p. 755-761, 2018.
- BAN, K; KAIEDA, M; MATSUMOTO, K; KONDO, A; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 39-43, 2001.
- BASSO, A; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes – A review. **Molec. Catal.**, v. 479, p. 110-607, 2019.
- BIRARI, R.B.; BHUTANI, K.K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 19/20, p. 879-880, 2007
- BOLINA I. C. A; GOMES, R. A. B; MENDES, A. A. Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: Current scenario and future perspectives. **BioEnergy Res.**, p. 1-19, 2021.
- BONDIOLI, P. From oil seeds to industrial products: present and future oleochemistry. **Journal of Synthetic Lubrication**, v. 21, p. 331-43, 2005.
- BORNSCHEUER, U. et al. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. **BBA - General Subjects**, v. 1201, n. 1, p. 55-60, 1994.
- BIROSOVÁ, L; MIKULÁSOVÁ, M; VAVERKOVÁ, S. Antimutagenic effect of phenolic acids. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.**, v.149, p.489-91, 2005.
- CALVO, T. R; LIMA, Z. P; SILVA, J. S; BALLESTEROS, K. V. R; PELLIZZON, C. H; HIRUMA-LIMA, C. A; TAMASHIRO, J; SOUZA-BRITO, A. R. M; TAKAHIRA, R. K; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of

cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 3, p. 451-9, 2007.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. *Química Nova*. v 18, p. 544-554, 1995.

CASTILLA, I. A. WOODS, D. F; REEN, F. J; & O’Gara, F. Harnessing marine biocatalytic reservoirs for green chemistry applications through metagenomic technologies. **Marine Drugs**, v. 16, n. 7, p. 1-21, 2018.

CERÓN, A. A; VILAS BOAS, R. N; BIAGGIO, F. C; CASTRO, H. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, 2018.

CHOWDHURY, A; CHAKRABORTY R, MITRA, D; BISWAS, D. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 783-789, 2014.

DA SILVA, J. B. Gallic acid, pyrogallol and pyrocatechol in the roots of *Byrsonima intermedia* Ad. Jussieu, form *Latifolia* grisebach. **Revista de farmácia e bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, p. 187-192, 1970.

DE FONSECA, T. S. T; DA SILVA, M. R; DE OLIVEIRA, M. D. C. F; DE LEMOS, T. L. G; DE ARAÚJO M. R; & DE MATTOS, M. C. Chemoenzymatic synthesis of rasagiline mesylate using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 492, p. 76-82, 2015.

DIAZ, J. C. M; RODRÍGUEZ, J. A; ROUSSOS, S; CORDOVA, J; ABOUSALHAM, A; CARRIERE, F; BARATTI. J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.

DRAGANO, R. V; FERNO, J; DIEGUEZ, C; LOPEZ, M; MILBANK, E. Recent updates on obesity treatments: Available drugs and future directions. **Neuroscience**, v. 437, p. 215-239, 2020.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Editorial for special issue: **Enzyme immobilization and its applications**. *Molecules*, v. 24, n. 24, p. 6–9, 2019.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 232–237, 2003.

FERREIRA, I. M. NISHIMURA, R. H; Ana, B. D. A; CLOSOSKI, G. C; Yoshioka, S. A; & Porto, A. L. Highly enantioselective acylation of chlorohydrins using Amano AK lipase from *P. fluorescens* immobilized on silk fibroin–alginate spheres. **Tetrahedron Letters**. v. 55, p. 5062-5065, 2014.

- FORESTI, M. L; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. n. p. 23-30, 2005.
- FORGO, I; BUCHI, J. Synthesis, physical-chemical properties and antioxidative effect of some gallic acid esters. 1. Nature, mechanism of action and properties of antioxidants. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 45, p. 207-226, 1970.
- GANDHI, N. N. Applications of lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 74, p. 621-634, 1997.
- GIFTSON, J. S; JAYANTHI, S; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, na antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Invest. New. Drugs**, v. 28, p.251-59, 2009.
- GICHNER, T; POPSPÍSIL, F; VELEMÍNSKY, J; VOLKEOVÁ, V; VOLKE, J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 32, n. 1, p. 55-62, 1987.
- GIRELLI, A. M; ASTOLFI, M. L; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, 2020.
- GOGOI, S; PATHAK, M. G; DUTTA, A; DUTTA, N. N. Porcine pancreas lipase catalized synthesis of lauryl laurate in organic solvante media: A kinetic study. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 45, p. 192-197, 2008.
- GOTOR-FÉRNANDES, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: **Useful biocatlysis B: Enzymatic.**, v. 40, p. 111-120, 2006.
- GRUNDHOFER, P; NIEMETZ, R; SCHILLING, G; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57; p. 915- 927, 2001.
- GUITIERREZ, A. S. A; GUO, J; FENG, J; TAN, L; KONG, L. Inhibition of starch digestion by gallic acid and alkyl gallates. **Food Hydrocolloids**, v. 102, p. 105-603, 2020.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, 2004.
- GUVEN, K. C; KOYUNCUOGLU, H; ULUBELEN A; GUVEN, N. Studies on gallic acid esters formed by the extraction of *Paeonia peregrina* Mill. **Die Pharmazie**, v. 29, p.350, 1974.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, set. 1998.

KANG, M. S; OH, J. S; KANG, I. C; HONG, S. J; CHOI, C. H. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **J. Microbiol.**, v.46, p.744-50, 2008.

KIM, D. O; LEE, K. W; LEE, H. J; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 13, p. 3713-7, 2002.

KIM, S. H; JUN, C. D; SUK, K; CHOI, B. J; LIM, H; PARK, S; LEE, S. H; SHIN, H. Y; KIM, D. K; SHINK, T. Y. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. **Toxicol. Sci.**, v.91, p.123-31, 2006.

KOJIMA, Y.; YOKOE, M.; MASE, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 9, p. 1564–1568, 1994.

KORTH, H. Formation of gallic acid from quinic acid by *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas fluorescens*. **Archiv fur Mikrobiologie**, v. 89, p. 67-72. 1973.

KROES, B. H; VAN DEN BERGER, A. J. J. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med**, v. 58, p. 499-504, 1992.

LAGE, F. A. P; BASSI, J. J; CORRADINI, M. C; TODERO, L. M; LUIZ, J. H; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.

LAMSA, M. **Environmentally friendly products based on vegetable oils**. 1995. Tese de doutorado Sc. - Helsinki University of Technology, Helsinki.

LOCATELLI, C; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B; Creczynski-Pasa TB. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur J Med Chem**, v. 60, p. 233-9, 2013.

LOPES, F. C. M; ROCHA, A; PIRRACO, A; REGASINI, L. O; SIQUEIRA, J. R; SILVA, D. H. S; BOLZANI, V. S; CARLOS, I. Z; SOARES, R. *Alchornea glandulosa* ethyl acetate fraction exhibits antiangiogenic activity: preliminary findings from in vitro assays using human umbilical vein endothelial cells. **J. Med. Food**, v. 14, n. 10, p.1244-53, 2011.

LIMA, Kelly Goulart. **Avaliação do efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma HEPG2**. 2014. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

LIMA, L. C. D; PERES, D. G. C; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 7, p. 991-1002, 2018.

LINDEMANN, L; GOSALIA, A. The impact of the global raw material landscape on the worldwide lubricants market or vice-versa. In: Proceedings of the 18th TAE International Colloquium Tribology. **Ostfildern**, Alemanha. 2012.

MACHADO, N. **Preparação e caracterização de partículas de sílica da casca de arroz funcionalizada na imobilização de lipase e aplicação na síntese de ésteres**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.

MENDES, A. A; OLIVEIRA, P. C; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MENDES, A. A; OLIVEIRA, P. C; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MGBRISHVILI, M. A. Extraction isolation of gallic acid in the "liquid-liquid" system. **Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi SSR**, v. 86, p. 625-628, 1977.

MIKKELSEN, S. R; CORTON, E. Bioanalytical chemistry. New Jersey: **Jonh Wiley & Sons**, p.382, 2004.

MILED, N; CANAANA, S; DUPUISA, L; ROUSSELB, A; RIVIÈREA, M; CARRIÈREA, F; CAROA, A; CAMBILLAUB, C; VERGERA, R. Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. **Biochimie**, v. 82, p. 973-986, 2000.

MOLL, M; FLAYEUX, R; BAZARD, D; MOUET, A. Separation of phenolic acids by HPLC. Applications to beer. **Bulletin de Liaison - Groupe Polyphenols**. v. 8, p.364-368, 1978.

MUSTRANTA, A; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. **Enzyme and microbial technology**, v. 15, n. 2, p. 133–9, fev. 1993.

OLIVEIRA, CAMILA, A; SOUZA, A.C; SANTOS, A. P. B; SILVA, B. V; LACHTER, E. R; PINTO, A. C. Síntese de ésteres de aromas de frutas: um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 152-167, 2014.

PAULA, A. V et al. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane– polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 281–288, mar. 2007.

PICERNO, P; MENCHERINI, T; SANSONE, F; GAUDIO, P. D; GRANATA, I; PORTA, A; AQUINO, R. P. Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities. **J. Ethnopharmacol.**, v. 138, n.3, p. 705-12, 2011.

PUBCHEM. CID 370 (Ácido Gálico). Disponível em: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid. Acesso em: 04 Nov. de 2021. RIEMENSCHNEIDER, W.; BOLT, H, M. Esters, organic. **Ullmann's encyclopedia of industrial Chemistry**. 1ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012.

RIEMENSCHNEIDER; Wilhelm; BOLT, Hermann, M. Ester Organic. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 1ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012.

RODRIGUES, R. C; VIRGEN-ORTÍZ, J. J; DOS SANTOS, J. C; BERENQUER-MURCIA, Á; ALCANTARA, A. R; BARBOSA, O; FERNANDEZ-LAFUENTES, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019.

RUDNICK, L. R. **Synthetics, Mineral Oils and Bio-Based Lubricants: Chemistry and Technology**. 2a ed. Boca Raton, *CRC Press, Taylor & Francis Group* 2013.

SAEKI, K; YUO, A; ISEMURA, M; ABE, I; SEKI, T; NOGUCHI, H. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 23, n. 11, p. 1391-1394, 2000.

SEDDIGI, Z. S; MALIK, M. S; AHMED, S. A; BABALGHITH, A. O; KAMAL, A. Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase–metal combinations for dynamic processes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 348, p. 54-70, 2017.]

SCHRAG, J. D. et al. The open conformation of a Pseudomonas lipase. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187–202, fev. 1997.

SKORONSKI, E; **Estudo Cinético da Síntese do Octanoato de n-Pentila Catalisada pela Enzima Lipozyme TL IM**. Dissertação (Pós-Graduação em engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SERRANO, A; PALACIOS, C; ROY, G; CESPÓN, C; VILLAR, M. L; NOCITO, M; GONZÁLEZ-PORQUÉ, P. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Arch Biochem Biophys**, v. 350, n. 1, p. 49-54, 1998.

STAVROVA, O; EHLEBRACHT, D; FETCHENHAUER, D. Belief in scientific technological progress and life satisfaction: The role of personal control. **Personality and Individual Differences**, v. 96, p. 227-236, 2016.

SOLOMONS, G; FRYHHLE, C. Ácidos carboxílicos e seus derivados. Adição – eliminação nucleofílica do carbono acílico. In: **SOLOMONS, G. Química orgânica**. v. 2, n. 10, p. 795-799, 2012.

SUN, H. **ZHANG, H; ANG, E. L; & ZHAO, H**. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1275-1284, 2018.

TAKAHASHI, M; UEDA, J; SASAKI, J. I. The components of the plants of Lagerstroemia genus. V. Synthesis of the aglycon of lagertannin 3,4-di-Omethylellagic acid from gallic acid. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 97, p. 1236-1239, 1977.

TINTOR, C. B. **Utilização de resíduos gordurosos para a produção de biodiesel via enzimática**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

TOBAL, T. M; DA SILVA, R; GOMES, E; BOLINI, H. M; BOSCOLO, M. Evaluation of the use of *Syzygium cumini* fruit extract as an antioxidant additive in orange juice and its sensorial impact. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 63, n. 3, p. 273-7, 2012.

TREICHEL, H; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VESCOVI, V. GIODANO, R. L., MENDES, A. A; TARDIOLI, P. W. Immobilized lipases on functionalized silica particles as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. **Molecules**, v. 22, p. 212, 2017.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A. MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase catalyzed reaction. **Enzyme Microb. Technol.**, n. 23, p.438-450, 1998.

YOSHIOKA, K; KATAOKA, T; HAYASHI, T; HASEGAWA, M; ISHI, Y; HIBASAMI, H. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. **Oncol Rep**, v. 7, n. 6, p. 1221-3, 2000.

WANG, C. F. ZHOU, G. W., Li, Y. J., LU, N., SONG, H. B; ZHANG, L. Biocatalytic esterification of caprylic acid with caprylic alcohol by immobilized lipase on amino-functionalized mesoporous silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 406, p. 75-83, 2012.

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.

WINKLER, F.K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.

WHITBY, R. D. **Understanding the global lubricants business**. In: Regional markets, economic issues and profitability. 2015, Oxford.

CAPÍTULO 2:

TÍTULO AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PARAMETROS NA PRODUÇÃO DO ÉSTER GALATO DE ISOAMILA POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO SOLVENTE CATALISADA POR LIPASES NA FORMA LIVRE

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a produção enzimática de um éster com atividade antioxidante (galato de isoamila) por esterificação de ácido gálico e álcool isoamílico em meio de solvente (terc-butanol). Oito lipases comerciais de diferentes fontes (microbianas e animal) foram empregadas na forma livre (extratos brutos) como biocatalisadores. As reações foram conduzidas empregando 0,25 mol L⁻¹ de cada reagente (ácido gálico e álcool isoamílico), agitação mecânica de 240 rpm, 40°C, 4 h de reação e 1000 unidades de atividade enzimática baseada na hidrólise da emulsão de azeite de oliva. Os máximos valores de porcentagem de conversão foram obtidos para as preparações de lipase de *Pseudomonas fluorescens* – LPP (41,5 ± 5,1%) e de pâncreas suíno – LPP (38,4 ± 2,3%), a preparação de lipase testada com menor custo. A produtividade para estes sistemas de reação foi da ordem de 25 μmoles de ácido gálico consumido h⁻¹ U⁻¹. Estes revelam que a aplicação de uma lipase de baixo custo (LPP) pode ser promissora na produção de ésteres com propriedades antioxidantes, uma importante classe de compostos empregados na área de alimentos e cosméticos.

PALAVRAS-CHAVE: Ésteres lipofílicos; Ácido gálico; Esterificação; Lipases.

EVALUATION OF THE EFFECT OF PARAMETER IN THE PRODUCTION OF ISOAMYL GALATE ESTER BY ESTERIFICATION IN SOLVENT MEDIUM CATALIZED BY LIPASES IN THE FREE FORM

G. J. PASSARI¹, F. A. PASSARI², E. B. PEREIRA³, A. A. MENDES
Universidade Federal de Alfenas¹²³
gusta_vopassari@hotmail.com

Artigo submetido em 07/02/2022/2022 e aceito em xxxx/2022

DOI: 10.15628/holos.2016.xxxx

ABSTRACT

The present work aimed at the enzymatic production of an ester with antioxidant activity (isoamyl gallate) by esterification of gallic acid and isoamyl alcohol in solvent (tert-butanol). Eight commercial lipases from different sources (microbial and animal) were used in the free form (crude extracts) as biocatalysts. The reactions were carried out using 0.25 mol L⁻¹ of each reagent (gallic acid and isoamyl alcohol), mechanical agitation at 240 rpm, 40°C, 4 h of reaction and 1000 units of enzymatic activity based on the hydrolysis of the olive oil emulsion. olive.

The maximum conversion percentage values were obtained for the lipase preparations of *Pseudomonas fluorescens* – LPF (41.5 ± 5.1%) and porcine pancreas – LPP (38.4 ± 2.3%), the lipase preparation tested at lower cost. The productivity for these reaction systems was of the order of 25 μmoles of gallic acid consumed h⁻¹ U⁻¹. These reveal that the application of a low-cost lipase (LPP) can be promising in the production of esters with antioxidant properties, an important class of compounds used in the food and cosmetics area.

KEYWORDS: Lipophilic esters, Gallic acid, Esterification, Lipases.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PARAMETRO NA PRODUÇÃO DO ÉSTER GALATO DE ISOAMILA POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO DE SOLVENTE CATALISADA POR LIPASES NA FORMA LIVRE

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a produção enzimática de um éster com atividade antioxidante (galato de isoamila) por esterificação de ácido gálico e álcool isoamílico em meio de solvente (terc-butanol). Oito lipases comerciais de diferentes fontes (microbianas e animal) foram empregadas na forma livre (extratos brutos) como biocatalisadores. As reações foram conduzidas empregando 0,25 mol L⁻¹ de cada reagente (ácido gálico e álcool isoamílico), agitação mecânica de 240 rpm, 40°C, 4 h de reação e 1000 unidades de atividade enzimática baseada na hidrólise da emulsão de

azeite de oliva. Os máximos valores de porcentagem de conversão foram obtidos para as preparações de lipase de *Pseudomonas fluorescens* – LPF (41,5 ± 5,1%) e de pâncreas suíno – LPP (38,4 ± 2,3%), a preparação de lipase testada com menor custo. A produtividade para estes sistemas de reação foi da ordem de 25 μmoles de ácido gálico consumido h⁻¹ U⁻¹. Estes revelam que a aplicação de uma lipase de baixo custo (LPP) pode ser promissora na produção de ésteres com propriedades antioxidantes, uma importante classe de compostos empregados na área de alimentos e cosméticos.

PALAVRAS-CHAVE: Ésteres lipofílicos; Ácido gálico; Esterificação; Lipases.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a adoção de processos biotecnológicos vem se apresentando como uma das vertentes que possibilitam a aplicação sustentável da biodiversidade para a produção de diversos compostos de interesse industrial (Basso & Serban, 2019; Almeida, Castro, Travalia & Forte, 2021); Bolina, Gomes & Mendes, 2021). Diferentes compostos obtidos de fontes renováveis são explorados por estas rotas como biocombustíveis, polímeros, ácidos orgânicos, antibióticos, enzimas industriais, alimentos funcionais, proteínas entre muitos outros. Estes processos têm sido conduzidos empregando preferencialmente células íntegras de diferentes fontes (microrganismos, células animais e vegetais) ou enzimas. A aplicação de biocatalisadores é atrativa do ponto de vista industrial porque estes apresentam alta atividade catalítica em condições brandas de reação (temperaturas moderadas e pressão atmosférica) e especificidade que reduz a formação de subprodutos que facilita as etapas de separação e purificação (Almeida et al., 2021). Desta forma, surge como alternativa o emprego de lipases como biocatalisador.

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3), são enzimas que têm sido uma das mais empregadas no setor industrial, tais como, no setor alimentício (desenvolvimento de aromas, maturação de queijos, lipídeos estruturados, e emulsificantes), cosmético (emolientes e ésteres com propriedades antioxidantes), farmacológico (síntese de naxopreno, ibuprofeno), agroquímico (inseticidas, e pesticidas), oleoquímico (hidrólise de óleos e gorduras, biosurfactantes e biolubrificantes), formulação de detergentes, e na geração de energia (biodiesel). Esta importante classe de enzimas pode catalisar reações tanto em meios aquosos e não-convencionais – meios orgânicos com baixa concentração de água (Almeida et al., 2021; Bolina et al., 2021).

Dentre os diferentes produtos de interesse industrial produzidos por lipases, ésteres de ácido gálico são compostos que exibem várias atividades biológicas, incluindo proteção cardiovascular, atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anticâncer e anti-inflamatórias (Al Zahrani, El-Shishtawy & Asiri, 2020); Gutierrez, Guo, Feng, Tan & Kong, 2020). Além disso, estes compostos também apresentam atividade anti-hiperglicêmica devido ao seu efeito inibitório sobre enzimas digestivas como amilase (Dragano, Ferno, Dieguez, Lopez & Milbank, 2020); Gutierrez et al., 2020).

Os comprimidos das cadeias carbônicas introduzidas pela esterificação empregando diferentes álcoois como aceptores acila afetam diferentemente suas atividades farmacológicas (Al Zahrani et al., 2020; Gutierrez et al., 2020).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade catalítica de oito preparações comerciais de lipases de *Mucor javanicus* (LMJ), *Rhizopus niveus* (LRN), *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Rhizomucor miehei* (LRM), *Candida* sp. (LCsp), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e lipase de origem animal obtida de pâncreas de porco (LPP) na produção de éster de ácido gálico (galato de isoamila). A escolha de álcool isoamílico, um álcool proveniente do óleo fúsel ($\approx 70\%$ mol/mol) gerado na destilação do etanol, se deve ao seu baixo custo e de fácil obtenção no país (Cerón, Vilas Boas, Biaggio & Castro, 2018). O éster foi obtido por esterificação direta de ácido gálico e álcool isoamílico em meio de terc-butanol, avaliando a conversão da reação e a sua produtividade. A aplicação de terc-butanol como solvente orgânico foi baseada na elevada solubilidade do ácido gálico (sólido nas condições de ensaio) com o intuito de preparar um sistema reacional com boa dispersão dos materiais de partida empregados neste estudo.

2. METODOLOGIA

2.1 Materiais

Foram utilizadas oito lipases comerciais de origem microbiana e animal:

Lipases microbianas de *Mucor javanicus* (LMJ), *Rhizopus niveus* (LRN), *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Rhizomucor miehei* (LRM), *Candida* sp. (LCsp), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e animal obtida de pâncreas de porco (LPP) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Ambas foram usadas na forma de extratos brutos. As informações técnicas destas lipases e propriedades estão sumarizadas na Tabela 1. Ácido gálico foi também obtido da Sigma-Aldrich Co., o álcool isoamílico e o terc-butanol foram adquiridos da Synth (São Paulo, SP, Brasil). Todos os outros reagentes e solventes foram de grau analítico adquiridos da Synth.

Tabela 1: Informações técnicas e propriedades das preparações de lipases comerciais testadas neste estudo.

Lipase (Fonte)	Abreviação	Forma (Código) ^a	AH (U/g) ^b	Custo (R\$) ^c	Custo (R\$/g)
<i>Mucor Javanicus</i>	LMJ	Pó (534803)	6200	767,00 (50 g)	15,3
<i>Rhizopus niveus</i>	LRN	Pó (62310)	2800	532,00 (50 g)	10,6
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	LTL	Solúvel (L0777)	27000	1825,00 (250 mL)	7,3
<i>Rhizomucor Miehei</i>	LRM	Solúvel (L4277)	880	2024,00 (250 mL)	8,1
<i>Candida</i> sp.	LCsp	Solúvel (L3170)	800	571,00 (50 mL)	11,4
<i>Candida rugosa</i>	LCR	Pó (L1754)	16200	995,00 (25 g)	39,8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LPF	Pó (534730)	8600	1349,00 (50 g)	27,0
Pâncreas suíno	LPP	Pó (L3126)	5400	473,00 (100 g)	4,7

a: Código das lipases fornecidas pela empresa Sigma-Aldrich Co. (ST LOUIS, MO, EUA).

b: Atividade das lipases na hidrólise da emulsão do azeite de oliva (BASSI *et al.*, 2016).

c: Custo das lipases fornecidas pela empresa Sigma-Aldrich Co. (ST LOUIS, MO, EUA).

2.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Principais equipamentos utilizados neste trabalho.

Tipo de experimento	Equipamento	Modelo/Fabricante
Reação de Esterificação	Shaker (Incubadora refrigerada)	SL222/CFR (Solab)
Agitação	Agitador mecânico	MA 095 (Marconi ^{MR})
Atividade Hidrolítica	Bureta Digital	Digitrate Pro (Jencons)
Medida de pH	pHmetro	DLA-PH (Del Lab)

2.3 Efeito de variáveis na produção enzimática de galato de isoamila por esterificação em meio de terc-butanol.

2.3.1 Efeito da fonte de lipase na produção do éster

A atividade catalítica das oito preparações comerciais de lipases em meio orgânico foi determinada na esterificação direta de ácido gálico e álcool isoamílico, como representado na figura 1, dissolvidos em terc-butanol, mantendo os parâmetros reacionais constantes, como a razão estequiométrica fixada em 1:1 e a quantidade de enzima adicionada no meio.



Figura 1: Reação de esterificação entre ácido gálico e álcool isoamílico.

As reações de esterificação foram conduzidas em frascos de vidro fechados (frascos de Duran) com capacidade para 100 mL, contendo 5 mL de meio reacional (0,25 mol/L de cada reagente – ácido gálico e álcool isoamílico), mantidos sob agitação constante de 240 rpm em um banho termostatizado, numa temperatura de 40°C. A reação foi iniciada pela adição direta de 1000 unidades internacionais de atividade hidrolítica (U), que corresponde a 0,16 g de LMJ, 0,36 g de LRN, 40 µL de LTL, 1,14 mL de LRM, 1,25 mL de LCsp, 0,062 g de LCR, 0,12 g de LPF, e 0,19 g de LPP. Estas quantidades foram determinadas com base nos valores de atividade hidrolítica reportados na Tabela 1. Uma unidade internacional de atividade (U) é definida como a massa de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácidos graxos livres (AGL) por minuto de reação de hidrólise da emulsão de azeite de oliva em pH 8,0 (tampão fosfato de sódio, 0,1 mol/L) a 37°C (Alves, Aracri, Cren & Mendes, 2017). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Alíquotas foram retiradas da mistura reacional (100 µL) após 4 h de reação (2 e 4h), diluídas em 10 mL de solução de álcool (70% m/m) e tituladas com solução de NaOH 40 mmol/L, utilizando fenolftaleína como indicador para determinar a concentração de ácido gálico consumida na reação para a determinação da porcentagem de conversão (Y), conforme Equação (1): (Alves et al., 2017; Lage et al., 2016).

Conversão:

$$Y(\%) = \left(\frac{AG_0 - AG_t}{AG_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que: AG_0 e AG_t são as concentrações de ácido gálico inicial (0,25 mol/L) e residual após um certo tempo t de reação (mM).

A produtividade para os diferentes sistemas de reação foi determinada conforme mostrado na Equação (2):

$$\text{Produtividade} \left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{h.U}} \right) = \left(\frac{Y \times AG_0}{t_{\text{reação}} \times AE_0} \right) \times 10^6 \quad (2)$$

Em que: Y é a porcentagem de conversão; AG_0 é a concentração inicial de ácido gálico (0,25 mol/L), $t_{\text{reação}}$ é o tempo de reação (4 h) e AE_0 é a atividade enzimática empregada nas reações de esterificação (1000 U).

2.3.2 Influência da temperatura de reação na produção do éster

A influência da temperatura de temperatura na reação foi avaliada no intervalo entre 35 e 60°C, com incremento de 5°C. As reações foram realizadas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (1:1 – 250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol), 1000 U de atividade para as lipases selecionadas (que correspnde a 0,12 g de lipase de LPF e 0,19 g de LPP no meio de reação) e agitação mecânica de 240 rpm. O tempo de reação foi fixado em 4 h. Ao final, alíquotas foram retiradas e determinadas as porcentagens de conversão conforme mostrado na Equação (1).

2.3.3 Influência da concentração de lipases na produção do éster

A influência da concentração das lipases na faixa de 250 U a 2000 U foi determinada empregando as lipases de LPP e LPF. Estes ensaios foram conduzidos com razão estequiométrica de ácido gálico e álcool isoamílico (1:1 – 250 mm de cada reagente em meio de terc-butanol) temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF, agitação mecânica de 240 rpm e tempo de reação de 2 h. A porcentagem de conversão do ácido foi determinada de acordo com a Equação (1).

2.3.4 Influência da razão molar ácido:álcool na produção do éster

A influência da razão molar ácido:álcool no intervalo de 1:1; 1:1.25; 1:1.5 e 1:2 foi determinada empregando concentração fixa de ácido gálico no meio de reação (250 mM). Estes testes foram realizados a 40°C para LPP e 55°C para LPF, 1000 U de atividade hidrolítica para cada enzima (0,12 g de lipase de LPF e 0,19 g de LPP) agitação mecânica de 240 rpm e tempo de reação de 2 h. A porcentagem de conversão do ácido foi determinada de acordo com a Equação (1).

2.3.5 Influência do tempo de reação na produção do éster

A influência do tempo de reação foi finalmente determinada nas condições que maximizam a produção do éster catalisada por LPP e LPF: razão estequiométrica de ácido gálico e álcool isoamílico (1:1 – 250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol) temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF, 1000 U de atividade hidrolítica para cada enzima (0,12 g de lipase de LPF e 0,19 g de LPP) e agitação mecânica de 240 rpm. A porcentagem de conversão do ácido foi determinada de acordo com a Equação (1):

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1.1 Seleção da fonte de lipase para produção enzimática de galato de isoamila

Neste estudo, oito diferentes preparações de lipases comerciais foram empregadas na forma de extratos brutos para catalisar a produção de um éster com propriedades antioxidantes (galato de isoamila) para posterior aplicação em emulsões cosméticas. Estes testes foram conduzidos com o propósito de selecionar as lipases com maior atividade catalítica na qual foi expressa em termos de porcentagem de conversão (Figura 2A) e produtividade (Figura 2B).

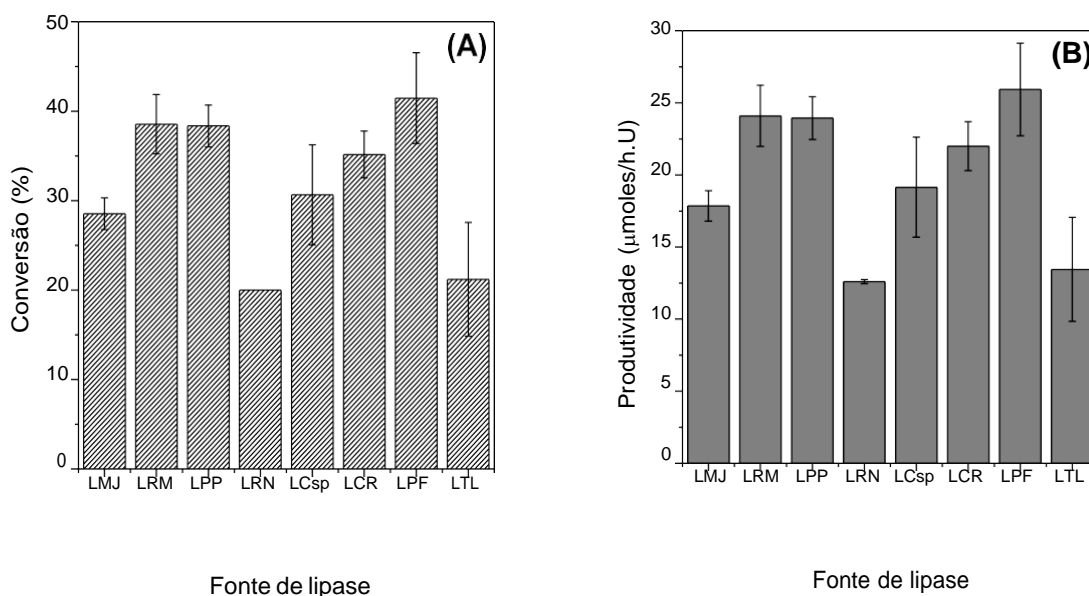


Figura 2: Efeito da fonte de lipase na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas a 40°C, razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, 1000 unidades de atividade hidrolítica de cada lipase (0,16 g de LMJ, 0,36 g de LRN, 40 μL de LTL, 1,14 mL de LRM, 1,25 mL de LCsp, 0,062 g de LCR, 0,12 g de LPF, e 0,19 g de LPP) e 4 h de reação.

De acordo com a Figura 2A, as preparações LRN e LTL foram as menos ativas nesta reação e máxima conversão do ácido gálico da ordem de 20% foi alcançada. A lipase LCR com maior custo avaliada neste estudo, apresentou uma conversão da ordem de 35% após 4 h de reação. Seu desempenho catalítico foi ligeiramente inferior à LPP e LRM que obtiveram similares valores de conversão da ordem 38%. Dentre elas, máxima conversão de $41,5 \pm 5,1\%$ foi obtido para LPF, a segunda lipase com maior custo empregada neste estudo (R\$ 27,0/g de extrato em pó).

O desempenho catalítico destas lipases foi também avaliada pela produtividade que expressa o número de unidades de atividade necessário para catalisar a conversão de 1 μmol de ácido gálico por hora de reação. De acordo com a Figura 2B, as lipases LPF e LPP apresentaram valores similares de produtividade da ordem de 25 $\mu\text{moles/h.U}$.

As preparações de lipases testadas neste estudo são disponíveis comercialmente como formulações líquidas (soluções) ou em pó (Tabela 1). As fontes de obtenção destas lipases são bastante diversas (fontes fúngicas, bacterianas e animal) e suas atividades catalíticas são bastante distintas devido às suas diferentes estruturas terciárias e especificidades que influenciam em suas propriedades catalíticas em uma determinada reação (Basso & Serban, 2019; Almeida et al., 2021). Além disso, estas formulações contém em suas composições diferentes compostos como carboidratos, proteínas e álcoois que atuam como preservantes de suas estruturas nativas que também interferem fortemente em suas propriedades catalíticas (Bassi et al., 2016).

Embora a mesma atividade catalítica, em termos de atividade hidrolítica, tenha sido oferecida nos diferentes sistemas reacionais (1000 U), é possível notar a forte influência do tipo de

lipase testada na produção de galato de isoamila. Estes diferentes resultados obtidos confirmam a influência do tipo de lipase em reações de síntese devido às suas diferentes propriedades catalíticas, origem e composição como a presença de agentes preservantes (sais, carboidratos e polióis) em suas formulações que influenciam suas atividades catalíticas (Persson, Mladenoska, wehtje & Adlercreutz, 2002).

Estes resultados mostram claramente que a aplicação da lipase LPP é mais vantajosa por se tratar da lipase com menor custo testada no presente trabalho e satisfatória atividade catalítica. De fato, a lipase LPP tem sido amplamente empregada na produção industrial de enantiômeros para as indústrias de química fina e farmacêutica (Mendes, Oliveira & Castro, 2012). Neste sentido, estes resultados podem contribuir para a ampliação de sua aplicação em outros processos industriais visto que a produção de ésteres de ácido gálico ainda é preferencialmente realizada pela rota química empregando catalisadores homogêneos como ácidos inorgânicos (HClO_4 , HCl , H_2SO_4) e temperaturas de reação entre 50°C e 100°C (Nguyen et al., 2021). Este estudo mostra que é possível a adoção de um processo menos agressivo e ambientalmente correto usando uma lipase de baixo custo na produção de ésteres lipofílicos como galato de isoamila, pois foram requeridas condições brandas de temperatura (40°C).

De acordo com os resultados obtidos, a lipase LPP foi a selecionada como a lipase mais interessante na produção do éster devido à satisfatória atividade catalítica e menor custo quando comparados com a lipase *Pseudomonas fluorescens* – LPF, que também obteve valores significativos e satisfatórios com máximos de porcentagem de conversão ($41,5 \pm 5,1\%$), porém com um custo quase 6 vezes maior – R\$ 27,0/g e R\$ 4,7/g de preparação enzimática.

3.1.2 Influência da temperatura

A temperatura é outro fator que pode influenciar a esterificação enzimática, negativa ou positivamente. De um lado, as altas temperaturas podem prejudicar a estabilidade ou inativar as enzimas, por isso deve-se levar em consideração a temperatura ótima do biocatalisador. Por outro lado, o aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade de reagentes e melhorar o processo de difusão dos substratos, favorecendo, assim, a transferência de massa e a interação entre a enzima e moléculas dos materiais de partida (Lerin et al., 2012; Lage et al., 2016; Lima, Peres & Mendes, 2018).

Portanto, a dependência da temperatura na reação de esterificação foi determinada na faixa entre 35 e 60°C , e os resultados são apresentados na Figura 3. As demais condições foram fixadas em razão estequiométrica de ácido e álcool (1:1 – 250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol), e 1000 U de atividade para as lipases selecionadas (que corresponde a 0,12 g de lipase de LPF e 0,19 g de LPP no meio de reação) e agitação mecânica de 240 rpm. O tempo de reação foi fixado em 4h nas condições descritas acima.

De acordo com o ensaio preliminar (Figuras 2A e 2B), as lipases selecionadas com melhor desempenho catalítico foram *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e lipase de pâncreas de porco (LPP), onde ambas apresentaram valores similares de produtividade da ordem de $25 \mu\text{moles/h.U}$.

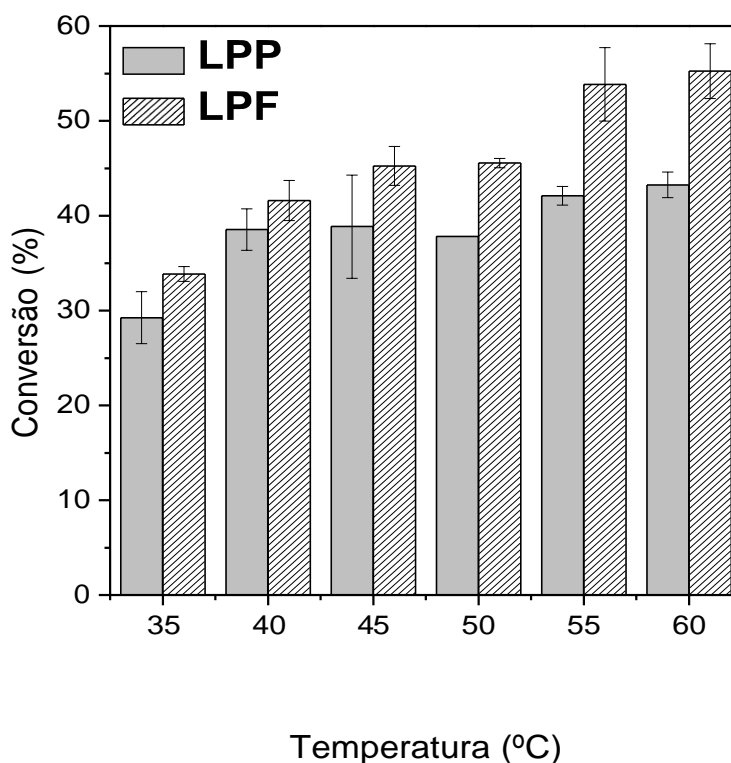


Figura 3: Efeito da temperatura de reação na produção de galato de isoamila catalisada por LPP (A) e LPF (B) em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, 1000 unidades de atividade hidrolítica de cada lipase (0,12 g de LPF e 0,19 g de LPP) e 4 h de reação.

Na Figura 3, observa-se que num período de 4h de reação, o aumento de temperatura de 35°C a 40°C aumentou a conversão do ácido de 28% para quase 40% empregando LPP como biocatalisador. Após, foi observada similar conversão. Por outro lado, o aumento de temperatura de 35°C para 55°C elevou a porcentagem de conversão do ácido, como esperado, para a reação catalisada por LPF. Na faixa de temperatura entre 55 e 60°C, a conversão do ácido foi da ordem de 50% para LPF. Neste contexto, testes subsequentes com estas duas preparações de lipases foram conduzidos a 40°C para LPP e 55°C para LPF.

3.1.3 Influência da concentração de lipase

Em seguida, foram realizados ensaios da influência da concentração das lipases na faixa de 250 U a 2000 U com o propósito de estabelecer a quantidade mínima necessária de biocatalisador necessária para obter máxima produção do éster. Estes ensaios foram conduzidos empregando razão estequiométrica de ácido gálico e álcool isoamílico (razão molar 1:1 – 250 mm de cada reagente em meio de terc-butanol) temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF, agitação mecânica de 240 rpm e tempo de reação de 2 h.

De acordo com os dados obtidos sumarizados na Figura 4, o aumento da concentração de enzima de 250 U para 1000 U elevou a porcentagem de conversão para ambos os sistemas de reação. Como esperado, o aumento da concentração de lipase aumenta o número de sítios ativos disponíveis no meio de reação para a formação do produto (galato de isoamila). Nestas condições, máxima porcentagem de conversão do ácido da ordem de 43% e 50% foi obtida para LPP e LPF, respectivamente. Entretanto, concentrações de lipase acima de 1000 U reduziu a formação de

produto pode ser observado nos dois sistemas de reação (LPP e LPF). Este decréscimo de atividade catalítica foi mais expressivo para a LPP. Estes resultados podem ser devido à forte agregação das lipases por adsorção de água produzida na reação que pode reduzir drasticamente a transferência de massa para os sítios ativos da enzima e/ou inativação da estrutura dimensional das lipases pelo acúmulo dos materiais de partida em seu microambiente – inativação dos biocatalisadores por adsorção de moléculas de reagentes que promovem a formação de gradientes de pH entre seus microambientes e o sistema reacional (Lage et al., 2016; Lima et al., 2018). Dessa forma, ensaios subsequentes para a avaliação do efeito da razão molar ácido:álcool foram realizados empregando 1000 U de atividade hidrolítica para ambas as lipases (LPP e LPF).

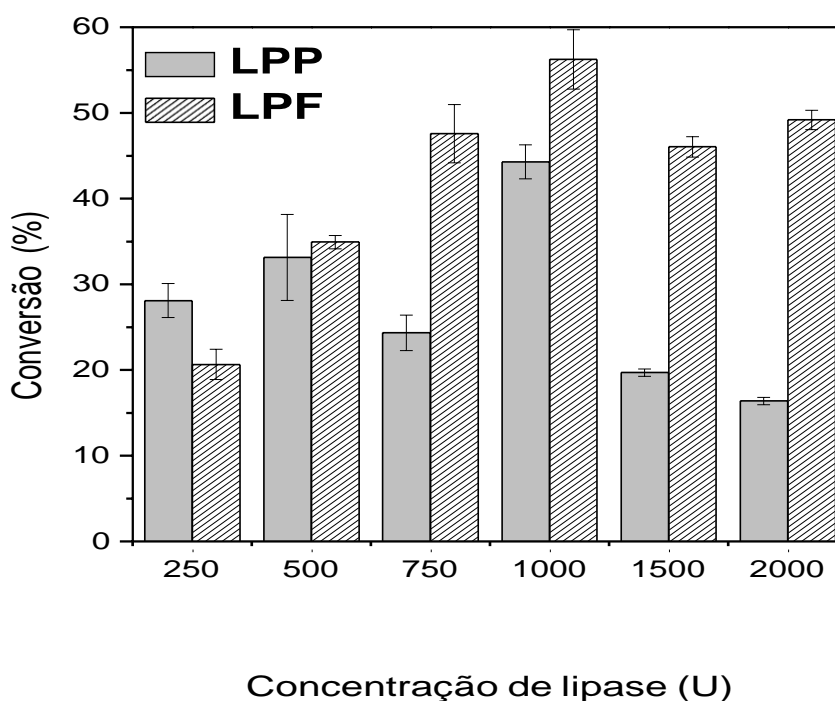


Figura 4: Efeito da concentração de lipase na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF e 2 h de reação.

3.1.4 Estudo da influência da razão molar

Foi também avaliada a influência da razão molar ácido:álcool na produção do éster mantendo-se fixa a concentração de ácido gálico no meio de reação (250 mM). As diferentes razões molares ácido:álcool avaliadas foram 1:1; 1:1.25; 1:1.5 e 1:2 (ácido:álcool). Este parâmetro foi estudado porque o excesso de um dos materiais de partida no meio de reação pode deslocar o equilíbrio químico para a direção da formação do produto (Lage et al., 2016; Carvalho, Luiz, Fernandez-Lafuente, Hirata & Mendes, 2021). Com o intuito de obter sistemas de reação com completa solubilização do ácido gálico nas condições de ensaio (temperatura entre 40°C e 55°C em meio de terc-butanol), optou-se trabalhar com excesso de álcool isoamílico (líquido nas temperaturas de processo). Estas reações foram conduzidas com agitação mecânica de 240 rpm, temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF e 2 h de reação e 1000 U de atividade para cada enzima (0,12 g de LPF e 0,19 g de LPP). Os resultados obtidos estão sumarizados na Figura 5.

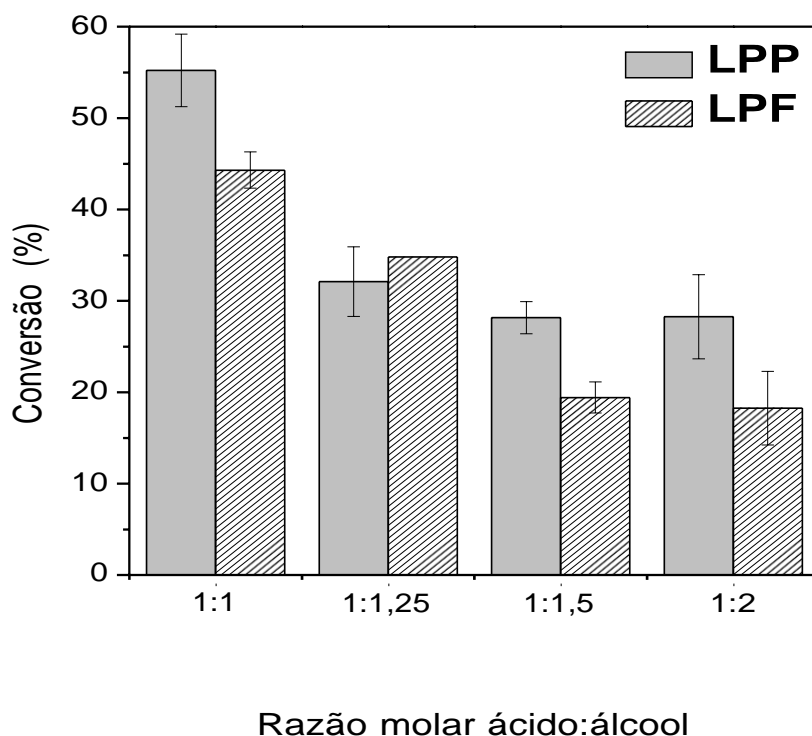


Figura 5: Efeito da razão molar ácido:álcool na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas empregando concentração fixa de ácido (250 mM), agitação mecânica de 240 rpm, temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF e 2 h de reação.

De acordo com os resultados obtidos, máxima conversão do ácido da ordem de 43% e 55% após 2h de reação catalisada por LPP e LPF foram obtidos, respectivamente. Por outro lado, as reações conduzidas com excesso de álcool resultaram em decréscimo na conversão. O aumento na quantidade de álcool pode causar um efeito contrário, diminuindo a conversão devido à sua interação com a camada de hidratação presente na superfície das enzimas, provocando alterações na estrutura proteica da enzima e resultando em inibição e redução da atividade enzimática (Sá et al., 2017). O decréscimo de produção de ésteres com o aumento de uma dos materiais de partida no meio de reação tem sido observado em outros estudos realizados em nosso grupo de pesquisa (Bassi et al., 2016; Lage et al., 2016; Lima et al., 2018; Carvalho et al., 2021). Dessa forma, testes posteriores para a avaliação do efeito do tempo de reação na produção do éster foram conduzidos em razões equimolares dos materiais de partida (1:1 – 250 mM de cada reagente).

3.1.5 Estudo da influência do tempo na síntese enzimática de galato de isoamila

Por fim, foi avaliado o efeito do tempo de reação na produção de galato de isoamila nas condições que maximizam a reação determinadas acima: agitação mecânica 240 rpm, 1000 U unidades de atividade enzimática, temperaturas de 55°C para (LPF) e 40° C para (LPP), razão molar 1:1 (250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol).

Na Figura 6, pode observar que as lipases de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) apresentou um melhor empenho catalítico num período de tempo de 105 min (conversão da ordem de 55 %) e a de pâncreas de porco (LPP) em 90 min (conversão da ordem de 42%). Com base nestes resultados, pode-se observar que estas lipases são promissoras para a produção de um éster de interesse industrial.

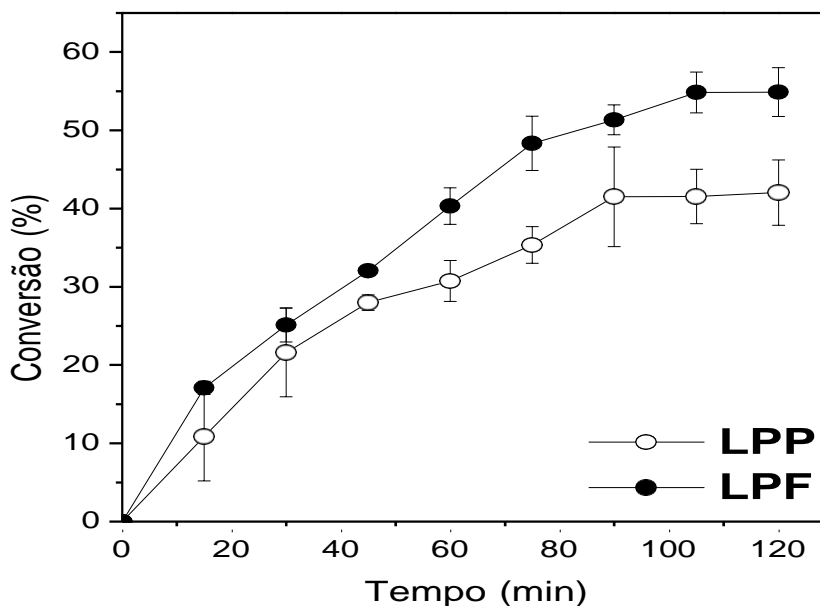


Figura 6: Efeito do tempo de reação na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol catalisada por LPF e LPP. As reações foram conduzidas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, e temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, LPP foi selecionada como a lipase mais interessante na produção do éster devido à sua satisfatória atividade catalítica e menor custo quando comparados com LPF que possui um custo quase 6 vezes maior – R\$ 27,0/g e R\$ 4,7/g de preparação enzimática. A melhor temperatura selecionada foi de 55°C para *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e 40°C para a lipase de pâncreas de porco (LPP).

Ficou evidenciado que a razão molar ácido:álcool 1:1 foi a melhor razão molar já que apresentou uma conversão de 50,7% de conversão, quando comparada com as demais razões molares testadas.

A melhor influência de tempo para a lipase *Pseudomonas fluorescens* (LPF) foi de 90 min e para a lipase de pâncreas de porco (LPP) 105 min.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-02196-15) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processos 404929/2016-8 e 310633/2020-6) pelo suporte financeiro. Gustavo J. Passari agradece à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Alfenas pela concessão da bolsa de mestrado (PIB-Pós/UNIFAL-MG).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F.L.C; CASTRO, M. P.J; TRAVALIA, B. M ; FORTE, M. B. S. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis. **Process Biochem.**, v. 110, p. 37-51, 2021.
- ALVES, M. D; ARACRI, F. M; CREN, E. C; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chem. Eng. J.**, v. 311, p. 1–12, 2017.
- AL ZHRANI, N. A; EL-SHISHTAWY, R. M; ASIRI, A. M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 204, p. 112-609, 2020.
- BASSI, J. J; TODERO, L. M; LAGE, F. A. P; KHEDY, G. I; DUCAS, J. D; PINTO, M. A; MENDES, A. A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 92, p. 900-909, 2016.
- BASSO, A; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes – A review. **Molec. Catal.**, v. 479, p. 110-607, 2019.
- BOLINA I. C. A; GOMES, R. A. B; MENDES, A. A. Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: Current scenario and future perspectives. **BioEnergy Res.**, p. 1-19, 2021.
- CARVALHO, W. C. A; LUIZ, J. H. H; FERNANDEZ-LAFUENTE, R; HIRATA, D. B; MENDES, A. A. Eco-friendly production of trimethylolpropane triesters from refined and used soybean cooking oils using an immobilized low-cost lipase (Eversa Transform 2.0) as heterogeneous catalyst. **Biomass and Bioenergy**, v. 155, p. 106302, 2021.
- CERÓN, A. A; VILAS BOAS, R. N; BIAGGIO, F. C; CASTRO, H. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, 2018.
- DRAGANO, R. V; FERNO, J; DIEGUEZ, C; LOPEZ, M; MILBANK, E. Recent updates on obesity treatments: Available drugs and future directions. **Neuroscience**, v. 437, p. 215-239, 2020.
- GUITIERREZ, A. S. A; GUO, J; FENG, J; TAN, L; KONG, L. Inhibition of starch digestion by gallic acid and alkyl gallates. **Food Hydrocolloids**, v. 102, p. 105-603, 2020.
- LAGE, F. A. P; BASSI, J. J; CORRADINI, M. C; TODERO, L. M; LUIZ, J. H; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.
- LERIN, L. A; RICHETTI, A; DALLAGO, R; TREICHEL, H; MAZUTTI, M; OLIVEIRA, J.V; ANTUNES, O. A. C; OESTREICHER, E. G; DE OLIVEIRA, D. Enzymatic Synthesis of Ascorbyl Palmitate in Organic Solvents: Process Optimization and Kinetic Evaluation. **Food and Bioprocess Technol**, v.5, p. 1068 -1076, 2012.

- LIMA, L. C. D; PERES, D. G. C; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 7, p. 991-1002, 2018.
- MENDES, A. A; OLIVEIRA, P. C; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 78, p. 119-134, 2012.
- NGUYEN, V. H; LE, M. N; NGUYEN, H. B; HA, K.O; PHAM, T. H. V; NGUYEN, T. H; DAO, N. S. H; NGUYEN, V. G; NGUYEN, D. L; TRINH, N.T. Propyl gallate. **Molbank**, v. 2021, p.1201, 2021.
- PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.
- SÁ, A.G.A. et al. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 95-105, 2017.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Lipase Pâncreas de porco (LPP) foi selecionada como a lipase mais interessante na produção do éster devido à sua satisfatória atividade catalítica e menor custo quando comparados com LPF que possui um custo quase 6 vezes maior R\$ 27,0/g e R\$ 4,7/g de preparação enzimática. A melhor temperatura selecionada foi de 55°C para *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e 40° C para a lipase de pâncreas de porco (LPP), evidenciado que a razão molar ácido:álcool 1:1 foi a melhor razão molar já que apresentou uma conversão de 50,7%, quando comparada com as demais razões molares testadas. Além disso a melhor influência de tempo para a lipase *Pseudomonas fluorescens* (LPF) foi de 90 min e para a lipase de pâncreas de porco (LPP) 105min.

4. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar os ésteres obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de infravermelho (IV).
- Avaliar o potencial antioxidante do galato de isoamila e do ácido gálico.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do galato de isoamila e do ácido gálico.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, Patrick. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, France, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.
- AEHLE, W. Enzymes in Industry: **Production and Application**. 2.ed. Wiley VCH, 2 ed.,2004.
- ALMEIDA, F.L.C; CASTRO, M. P.J; TRAVALIA, B. M ; FORTE, M. B. S. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis. **Process Biochem.**, v. 110, p. 37-51, 2021.
- AL ZHRANI, N. A; EL-SHISHTAWY, R. M; ASIRI, A. M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 204, p. 112-609, 2020.
- AL-ZUHAIR, S; LIG, F. W; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v.42, p. 951-960, 2007.
- ARUMUGAM, A; THULASIDHARAN, D; JEGADEESAN, G. B. Process optimization of biodiesel production from *Hevea brasiliensis* oil using lipase immobilized on spherical silica aerogel. **Renewable Energy**, v. 116, p. 755-761, 2018.
- BAN, K; KAIEDA, M; MATSUMOTO, K; KONDO, A; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 39–43, 2001.
- BASSO, A; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes – A review. **Molec. Catal.**, v. 479, p. 110-607, 2019.
- BIRARI, R.B.; BHUTANI, K.K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 19/20, p. 879-880, 2007
- BOLINA I. C. A; GOMES, R. A. B; MENDES, A. A. Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: Current scenario and future perspectives. **BioEnergy Res.**, p. 1-19, 2021.
- BONDIOLI, P. From oil seeds to industrial products: present and future oleochemistry. **Journal of Synthetic Lubrication**, v. 21, p. 331-43, 2005.
- BORNSCHEUER, U. et al. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. **BBA - General Subjects**, v. 1201, n. 1, p. 55–60, 1994.
- BIROSOVÁ, L; MIKULÁSOVÁ, M; VAVERKOVÁ, S. Antimutagenic effect of phenolic acids. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.**, v.149, p.489-91, 2005.

CALVO, T. R; LIMA, Z. P; SILVA, J. S; BALLESTEROS, K. V. R; PELLIZZON, C. H; HIRUMA-LIMA, C. A; TAMASHIRO, J; SOUZA-BRITO, A. R. M; TAKAHIRA, R. K; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 3, p. 451-9, 2007.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. **Química Nova**. v 18, p. 544-554, 1995.

CASTILLA, I. A. WOODS, D. F; REEN, F. J; & O'Gara, F. Harnessing marine biocatalytic reservoirs for green chemistry applications through metagenomic technologies. **Marine Drugs**, v. 16, n. 7, p. 1-21, 2018.

CERÓN, A. A; VILAS BOAS, R. N; BIAGGIO, F. C; CASTRO, H. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, 2018.

CHOWDHURY, A; CHAKRABORTY R, MITRA, D; BISWAS, D. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 783-789, 2014.

DA SILVA, J. B. Gallic acid, pyrogallol and pyrocatechol in the roots of *Byrsonima intermedia* Ad. Jussieu, form *Latifolia* grisebach. **Revista de farmácia e bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, p. 187-192, 1970.

DE FONSECA, T. S. T; DA SILVA, M. R; DE OLIVEIRA, M. D. C. F; DE LEMOS, T. L. G; DE ARAÚJO M. R; & DE MATTOS, M. C. Chemoenzymatic synthesis of rasagiline mesylate using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 492, p. 76-82, 2015.

DIAZ, J. C. M; RODRÍGUEZ, J. A; ROUSSOS, S; CORDOVA, J; ABOUSALHAM, A; CARRIERE, F; BARATTI. J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.

DRAGANO, R. V; FERNO, J; DIEGUEZ, C; LOPEZ, M; MILBANK, E. Recent updates on obesity treatments: Available drugs and future directions. **Neuroscience**, v. 437, p. 215-239, 2020.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Editorial for special issue: **Enzyme immobilization and its applications**. **Molecules**, v. 24, n. 24, p. 6–9, 2019.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 232–237, 2003.

FERREIRA, I. M. NISHIMURA, R. H; Ana, B. D. A; CLOSOSKI, G. C; Yoshioka, S. A; & Porto, A. L. Highly enantioselective acylation of chlorohydrins using Amano AK lipase from *P. fluorescens* immobilized on silk fibroin–alginate spheres. **Tetrahedron Letters**. v. 55, p. 5062-5065, 2014.

FORESTI, M. L; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. n. p. 23-30, 2005.

FORGO, I; BUCHI, J. Synthesis, physical-chemical properties and antioxidative effect of some gallic acid esters. 1. Nature, mechanism of action and properties of antioxidants. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 45, p. 207-226, 1970.

GANDHI, N. N. Applications of lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 74, p. 621-634, 1997.

GIFTSON, J. S; JAYANTHI, S; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, na antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Invest. New. Drugs**, v. 28, p.251-59, 2009.

GICHNER, T; POPSPÍSIL, F; VELEMÍNSKY, J; VOLKEOVÁ, V; VOLKE, J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 32, n. 1, p. 55-62, 1987.

GIRELLI, A. M; ASTOLFI, M. L; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, 2020.

GOGOI, S; PATHAK, M. G; DUTTA, A; DUTTA, N. N. Porcine pancreas lipase catalized synthesis of lauryl laurate in organic solvante media: A kinetic study. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 45, p. 192-197, 2008.

GOTOR-FÉRNANDES, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: **Useful biocatalysis B: Enzymatic.**, v. 40, p. 111-120, 2006.

GRUNDHOFER, P; NIEMETZ, R; SCHILLING, G; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57; p. 915- 927, 2001.

GUITIERREZ, A. S. A; GUO, J; FENG, J; TAN, L; KONG, L. Inhibition of starch digestion by gallic acid and alkyl gallates. **Food Hydrocolloids**, v. 102, p. 105-603, 2020.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, 2004.

GUVEN, K. C; KOYUNCUOGLU, H; ULUBELEN A; GUVEN, N. Studies on gallic acid esters formed by the extraction of *Paeonia peregrina* Mill. **Die Pharmazie**, v. 29, p.350, 1974.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, set. 1998.

KANG, M. S; OH, J. S; KANG, I. C; HONG, S. J; CHOI, C. H. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **J. Microbiol.**, v.46, p.744-50, 2008.

KIM, D. O; LEE, K. W; LEE, H. J; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 13, p. 3713-7, 2002.

KIM, S. H; JUN, C. D; SUK, K; CHOI, B. J; LIM, H; PARK, S; LEE, S. H; SHIN, H. Y; KIM, D. K; SHINK, T. Y. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. **Toxicol. Sci.**, v.91, p.123-31, 2006.

KOJIMA, Y.; YOKOE, M.; MASE, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 9, p. 1564–1568, 1994.

KORTH, H. Formation of gallic acid from quinic acid by *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas fluorescens*. **Archiv fur Mikrobiologie**, v. 89, p. 67-72. 1973.

KROES, B. H; VAN DEN BERGER, A. J. J. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med**, v. 58, p. 499-504, 1992.

LAGE, F. A. P; BASSI, J. J; CORRADINI, M. C; TODERO, L. M; LUIZ, J. H; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.

LAMSA, M. **Environmentally friendly products based on vegetable oils**. 1995. Tese de doutorado Sc. - Helsinki University of Technology, Helsinki.

LOCATELLI, C; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B; Creczynski-Pasa TB. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur J Med Chem**, v. 60, p. 233-9, 2013.

LOPES, F. C. M; ROCHA, A; PIRRACO, A; REGASINI, L. O; SIQUEIRA, J. R; SILVA, D. H. S; BOLZANI, V. S; CARLOS, I. Z; SOARES, R. *Alchornea glandulosa* ethyl acetate fraction exhibits antiangiogenic activity: preliminary findings from in vitro assays using human umbilical vein endothelial cells. **J. Med. Food**, v. 14, n. 10, p.1244-53, 2011.

LIMA, Kelly Goulart. **Avaliação do efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma HEPG2**. 2014. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

LIMA, L. C. D; PERES, D. G. C; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 7, p. 991-1002, 2018.

LINDEMANN, L; GOSALIA, A. The impact of the global raw material landscape on the worldwide lubricants market or vice-versa. In: Proceedings of the 18th TAE International Colloquium Tribology. **Ostfildern**, Alemanha. 2012.

MACHADO, N. **Preparação e caracterização de partículas de sílica da casca de arroz funcionalizada na imobilização de lipase e aplicação na síntese de ésteres**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.

MENDES, A. A; OLIVEIRA, P. C; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MENDES, A. A; OLIVEIRA, P. C; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MGEBRISHVILI, M. A. Extraction isolation of gallic acid in the "liquid-liquid" system. **Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoï SSR**, v. 86, p. 625-628, 1977.

MIKKELSEN, S. R; CORTON, E. Bioanalytical chemistry. New Jersey: **Jonh Wiley & Sons**, p.382, 2004.

MILED, N; CANAANA, S; DUPUISA, L; ROUSSELB, A; RIVIÈREA, M; CARRIÈREA, F; CAROA, A; CAMBILLAUB, C; VERGERA, R. Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. **Biochimie**, v. 82, p. 973-986, 2000.

MOLL, M; FLAYEUX, R; BAZARD, D; MOUET, A. Separation of phenolic acids by HPLC. Applications to beer. **Bulletin de Liaison - Groupe Polyphenols**. v. 8, p.364-368, 1978.

MUSTRANTA, A; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. **Enzyme and microbial technology**, v. 15, n. 2, p. 133–9, fev. 1993.

OLIVEIRA, CAMILA, A; SOUZA, A.C; SANTOS, A. P. B; SILVA, B. V; LACHTER, E. R; PINTO, A. C. Síntese de ésteres de aromas de frutas: um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 152-167, 2014.

PAULA, A. V et al. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane– polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 281–288, mar. 2007.

PICERNO, P; MENCHERINI, T; SANSONE, F; GAUDIO, P. D; GRANATA, I; PORTA, A; AQUINO, R. P. Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities. **J. Ethnopharmacol.**, v. 138, n.3, p. 705-12, 2011.

PUBCHEM. CID 370 (Ácido Gálico). Disponível em: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid. Acesso em: 04 Nov. de 2021. RIEMENSCHNEIDER, W.; BOLT, H, M. Esters, organic. **Ullmann's encyclopedia of industrial Chemistry**. 1ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012.

RIEMENSCHNEIDER; Wilhelm; BOLT, Hermann, M. Ester Organic. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 1ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012.

RODRIGUES, R. C; VIRGEN-ORTÍZ, J. J; DOS SANTOS, J. C; BERENQUER-MURCIA, Á; ALCANTARA, A. R; BARBOSA, O; FERNANDEZ-LAFUENTES, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019.

RUDNICK, L. R. **Synthetics, Mineral Oils and Bio-Based Lubricants: Chemistry and Technology**. 2a ed. Boca Raton, *CRC Press, Taylor & Francis Group* 2013.

SAEKI, K; YUO, A; ISEMURA, M; ABE, I; SEKI, T; NOGUCHI, H. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 23, n. 11, p. 1391-1394, 2000.

SEDDIGI, Z. S; MALIK, M. S; AHMED, S. A; BABALGHITH, A. O; KAMAL, A. Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase-metal combinations for dynamic processes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 348, p. 54-70, 2017.]

SCHRAG, J. D. et al. The open conformation of a Pseudomonas lipase. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187-202, fev. 1997.

SKORONSKI, E; **Estudo Cinético da Síntese do Octanoato de n-Pentila Catalisada pela Enzima Lipozyme TL IM**. Dissertação (Pós-Graduação em engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SERRANO, A; PALACIOS, C; ROY, G; CESPÓN, C; VILLAR, M. L; NOCITO, M; GONZÁLEZ-PORQUÉ, P. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Arch Biochem Biophys**, v. 350, n. 1, p. 49-54, 1998.

STAVROVA, O; EHLEBRACHT, D; FETCHENHAUER, D. Belief in scientific technological progress and life satisfaction: The role of personal control. **Personality and Individual Differences**, v. 96, p. 227-236, 2016.

SOLOMONS, G; FRYHLE, C. Ácidos carboxílicos e seus derivados. Adição – eliminação nucleofílica do carbono acílico. In: **SOLOMONS, G. Química orgânica**. v. 2, n. 10, p. 795-799, 2012.

SUN, H. **ZHANG, H; ANG, E. L; & ZHAO, H**. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1275-1284, 2018.

TAKAHASHI, M; UEDA, J; SASAKI, J. I. The components of the plants of Lagerstroemia genus. V. Synthesis of the aglycon of lagertannin 3,4-di-Omethylellagic acid from gallic acid. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 97, p. 1236-1239, 1977.

TINTOR, C. B. **Utilização de resíduos gordurosos para a produção de biodiesel via enzimática**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

TOBAL, T. M; DA SILVA, R; GOMES, E; BOLINI, H. M; BOSCOLO, M. Evaluation of the use of *Syzygium cumini* fruit extract as an antioxidant additive in orange juice and its sensorial impact. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 63, n. 3, p. 273-7, 2012.

TREICHEL, H; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VESCOVI, V. GIODANO, R. L., MENDES, A. A; TARDIOLI, P. W. Immobilized lipases on functionalized silica particles as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. **Molecules**, v. 22, p. 212, 2017.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A. MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase catalyzed reaction. **Enzyme Microb. Technol.**, n. 23, p.438-450, 1998.

YOSHIOKA, K; KATAOKA, T; HAYASHI, T; HASEGAWA, M; ISHI, Y; HIBASAMI, H. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. **Oncol Rep**, v. 7, n. 6, p. 1221-3, 2000.

WANG, C. F. ZHOU, G. W., Li, Y. J., LU, N., SONG, H. B; ZHANG, L. Biocatalytic esterification of caprylic acid with caprylic alcohol by immobilized lipase on amino-functionalized mesoporous silica. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 406, p. 75-83, 2012.

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.

WINKLER, F.K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.

WHITBY, R. D. **Understanding the global lubricants business**. In: Regional markets, economic issues and profitability. 2015, Oxford.