

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LENIR INÊS RIGOLI FERRAZ

**APLICAÇÃO DE LIPASES NA CATÁLISE DE REAÇÕES DE
INTERESSE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadoras: Débora de Oliveira
Helen Treichel
Natália Paroul

Erechim, Abril de 2014

APLICAÇÃO DE LIPASES NA CATÁLISE DE REAÇÕES DE INTERESSE

Lenir Inês Rigoli Ferraz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Débora de Oliveira, D.Sc.
(UFSC) (Orientadora)

Helen Treichel, D.Sc.
(UFFS) (Orientadora)

Natália Paroul, D.Sc.
(URI – Campus de Erechim) (Orientadora)

Jamile Zeni (URI)

Ilizandra Fernandes (URI)

Daniela dos Santos de Oliveira (IDEAU)

Elisandra Rigo (UDESC)

Erechim, Abril de 2014

*Ao meu esposo
Bibiano e meu filho Felipe...*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tornar tudo possível...

Aos grandes amores da minha vida, meu filho Felipe e meu esposo Bibiano, por estarem ao meu lado, incondicionalmente, em todos os momentos, abrindo mão muitas vezes dos seus desejos.

À toda minha família, especialmente meus pais que apesar de estarem longe, estão no coração e não mediram esforços sempre que necessário.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, mais precisamente ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização desse trabalho.

Às minhas orientadoras Débora de Oliveira, Helen Treichel, Elisadra Rigo e Natália Paroul pela paciência e disposição para auxiliar na construção desse trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Termodinâmica.

Ao pessoal da Central de Materiais pela disponibilidade.

À equipe diretiva da Escola José Bonifácio, em especial à Diretora Cleusa Regla, pela compreensão e incentivo, minha gratidão.

Aos meus queridos sogros Lurdes e Bibiano, pelo apoio e palavras de incentivo que me acrescentaram muito.

Aos meus queridos amigos Dieter e Maria Luiza Kepler, pelo amor, carinho, amizade e pelas orações.

Aos meus amigos integrantes do PG que todas as sextas feiras se reúne, minha gratidão pelas nossas conversas e reflexões.

A todos os meus amigos e amigas, que das mais variadas formas contribuíram durante esse período.

Às queridas bolsistas e amigas Gessica Possebom e Emilly A. Valandro, pela disposição e inestimável ajuda na realização experimental desse trabalho, e também pela amizade.

À banca examinadora, pela disponibilidade, interesse e valiosas contribuições.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.
Aos demais professores do Curso de Engenharia de Alimentos.

Muito Obrigada!

*“Peçam, e será dado; busquem, e encontrarão;
batam, e a porta será aberta.”*

Mt.:7:7

Resumo da tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

APLICAÇÃO DE LIPASES NA CATÁLISE DE REAÇÕES DE INTERESSE

Lenir Inês Rigoli Ferraz

04/2014

Orientadoras: Débora de Oliveira

Helen Treichel

Natália Paroul

A aplicação de lipases em grande escala de processos industriais requer investigação cuidadosa de técnicas adequadas para a reutilização e aumento da estabilidade da enzima, tal como a purificação e processos de imobilização. A finalidade do presente trabalho consistiu na produção de extratos enzimáticos lipolíticos por dois micro-organismos isolados e selecionados previamente (fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e da levedura *Sporidiobolus pararoseus*), seguido da subsequente concentração e imobilização dos extratos enzimáticos em diferentes suportes, para posterior aplicação como catalisadores em reações de síntese. A enzima comercial de pâncreas suíno também foi testada. A fermentação em estado sólido (FES) foi a técnica utilizada para a produção dos extratos a partir de farelo de soja, para posterior obtenção dos extratos enzimáticos em diferentes formas de apresentação: Extrato enzimático bruto (EEB), extrato enzimático precipitado (EEP), extrato enzimático imobilizado (EEI) e extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI), de ambos os micro-organismos, sendo que os mesmos foram concentrados com sulfato de amônio e imobilizados em alginato de sódio com

carvão ativado e em argila Poço A. Posteriormente, realizou-se a avaliação em termos de atividade de síntese (U/g) e aplicação dos mesmos como catalisadores em diferentes reações de interesse: transesterificação de óleos vegetais em meio orgânico, esterificação de ácido oleico e etanol e esterificação de geraniol e ácido propiônico. Melhores atividades de síntese foram encontradas para o extrato enzimático de *Penicillium crustosum* bruto imobilizado (EEBI) (240,59 U/g), seguido do extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI) (228,76 U/g), ambos imobilizados em alginato com carvão. Por apresentar atividades inferiores, não prosseguiu-se os experimentos com o suporte argila poço A. Melhores conversões foram obtidas para os extratos de *Penicillium crustosum* imobilizados em alginato com carvão: transesterificação enzimática 4,68% (para EEBI), esterificação enzimática de ácido oleico e etanol, 64,48% (para EEBI) e esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico 38,89% (para EEB), seguido de 37,09% (para EEBI). Após os experimentos preliminares, a maximização da produção do sistema reacional de geraniol propionato foi avaliada, usando o EEBI, a partir da técnica de planejamento de experimento, mantendo fixas as condições: razão molar entre os substratos de 3:1, 150 rpm de agitação e 6 horas de reação. Melhor conversão (53,28%) foi atingida no ensaio relativo à temperatura de 60 °C e concentração de enzima (m/m substrato) 50%. O estudo do efeito da razão molar geraniol:ácido propiônico na cinética da produção demonstrou que a máxima conversão (51%) foi obtida na razão molar 5:1, em temperatura de 40°C, em um curto tempo de reação (50 minutos), o que é favorável, levando em conta a diminuição de custos no processo de síntese.

Palavras-chave: Extrato enzimático lipolítico, imobilização, síntese enzimática, geraniol propionato.

Abstract of thesis presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor in Food Engineering.

APPLICATION LIPASE IN CATALYSIS OF REACTION OF INTEREST

Lenir Inês Rigoli Ferraz

04/2014

Advisors: Débora de Oliveira

Helen Treichel

Natália Paroul

The use of lipases in large scale industrial processes require careful investigation of techniques that permits the reuse and increasing the stability of the enzyme, such as purification and immobilization processes. The purpose of this work was the production of lipolytic enzyme extract isolated by two previously selected microorganisms (filamentous fungus *Penicillium crustosum* and yeast *Sporidiobolus pararoseus*), followed by concentration and subsequent immobilization of enzyme extract in different media, for later application as catalysts in synthesis reactions. The commercial enzyme porcine pancreas was also tested. Solid-state fermentation (SSF) was the technique used for the production of extracts from soybean meal for later obtaining the enzyme extract in different forms of presentation: crude enzymatic extract (CEE), precipitated enzyme extract (PEE), immobilized enzyme extract (IEE) and precipitated immobilized enzyme extract (PIEE) of both microorganisms, considering that they were concentrated using ammonium sulfate immobilized on sodium alginate and activated carbon and Poço A clay. Subsequently, we performed the evaluation in terms of synthesis activity (U/g) and tested the enzymes as catalysts in different reactions of interest: transesterification of

vegetable oils in organic medium, esterification of oleic acid and ethanol and esterification of geraniol and propionic acid. Interesting synthesis activities were found for the crude extract of immobilized enzyme from *Penicillium crustosum* (240.59 U/g), followed by precipitate immobilized enzyme extract (228.76 U/g), both immobilized in alginate coal. Considering the lower activities presented, the experiments using Poço A clay as immobilization support was not continued. Best conversions were obtained for the extracts of *Penicillium crustosum* carbon immobilized in alginate: 4.68% transesterification esterification of oleic acid and ethanol 64.48% and esterification of acid and geraniol propionic 38.89%, followed by 37.09%. After preliminary experiments, the maximization of the production of reactive system geranyl propionate was assessed using crude enzymatic extract immobilized, using experimental design methodology, and keeping fixed conditions: molar ratio of 3:1 between the substrates, 150 rpm of agitation and 6 hours of reaction. Best conversion (53.28%) was reached in the experiment using 60°C of temperature and the enzyme concentration of 50%. The kinetics study of the effect of molar ratio of geraniol:propionic acid on the production showed that the highest conversion (51%) was obtained in the molar ratio 5:1 at 40°C in a short reaction time (50 minutes) which is a promise result since it causes a cost reduction in the synthesis process .

Keywords: Extract lipolytic enzyme immobilization, enzymatic synthesis, geranyl propionate.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Objetivos	20
1.2. Descrição das Etapas da Pesquisa de Tese de Doutorado	21
1.3. Estrutura de apresentação da Tese.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. Enzimas.....	25
2.1.1 Lipases	28
2.2 Aplicações de Lipases.....	29
2.2.1. Lipases Microbianas como Biocatalisadores.....	32
2.3. Pré-purificação dos Extratos Enzimáticos	36
2.4. Imobilização de Enzimas.....	37
2.4.1. Métodos de Imobilização de Enzimas em Suportes.....	40
2.4.2. Imobilização em Alginato de Sódio com Carvão Ativado	43
2.4.3. Imobilização em Argilas do tipo Poço A.....	45
2.5. Aplicação de Enzimas Imobilizadas	46
2.6. A Importância Industrial de Ésteres de Ácidos Graxos.....	47
2.7. Considerações Parciais.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1. Produção de lipase <i>Sporidiobolus pararoseus</i> e <i>Penicillium crustosum</i>	50
3.1.1. Micro-organismos.....	50
3.1.2. Inóculo e substrato	52
Levedura <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	52
Fungo filamentoso <i>Penicillium crustosum</i>	52
Substrato.....	53
3.1.3. Fermentação em Estado Sólido (FES)	53
3.1.4. Processo de Extração da Enzima	53
3.1.5. Liofilização.....	54

3.2. Concentração do Extrato Enzimático Bruto das Lipases Produzidas	54
3.3. Lipase Comercial.....	55
3.4. Imobilização de Enzimas: métodos e suportes	56
3.4.1. Imobilização em Alginato de Sódio com Carvão Ativado	56
3.4.2. Imobilização em Argila Poço A.....	57
3.5. Determinação da Atividade Enzimática de Síntese.....	58
3.6. Aplicação de Lipases na Catálise de Reações de Interesse	59
3.6.1. Transesterificação Enzimática de Óleos Vegetais em Meio Orgânico ...	59
3.6.2. Esterificação Enzimática Ácido Oleico em Sistema Livre de Solvente...	60
3.6.3 . Esterificação Enzimática de Geraniol e Ácido Propiônico.....	60
3.6.4. Preparo das Amostras e Determinação da Conversão das Reações	61
3.7. Estudo da Produção de Geranil Propionato.....	63
3.7.1. Efeito da Temperatura e Concentração de Enzima.....	63
3.7.2. Efeito da Razão Molar Geraniol:Ácido Propiônico na Cinética de Esterificação Enzimática.....	64
3.7.3. Avaliação do Reuso do Extrato Enzimático não Comercial de <i>Penicillium crustosum</i> Imobilizado.....	65
3.8. Caracterização Parcial do Catalisador Empregado	65
4. RESULTADOS E DICUSSÃO	67
4.1. Concentração dos Extratos Enzimáticos Brutos.....	67
4.2. Técnicas de Imobilização	70
4.2.1. Imobilização em Alginato de Sódio com Carvão Ativado	71
4.2.2. Imobilização em Argila Poço A.....	73
4.3. Aplicações das Lipases como Catalisadores de Reações de Interesse....	76
4.3.1. Transesterificação Enzimática de Óleos Vegetais em Meio Orgânico ...	76
4.3.2. Esterificação Enzimática de Acido Oleico e Etanol	79
4.3.3. Esterificação Enzimática de Geraniol e Acido Propiônico	82
4.4. Estudo da Produção de Geranil Propionato.....	85
4.4.1. Efeito da Temperatura e Concentração de Enzima.....	85
4.4.2. Efeito da Razão Molar Geraniol:Ácido Propiônico na Cinética de Esterificação Enzimática	88

4.4.3. Avaliação do Reuso do Extrato Enzimático não Comercial de <i>Penicillium crustosum</i> Imobilizado.....	91
4.5. Caracterização Parcial do Catalisador Empregado	93
4.6. Considerações Finais.....	94
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	97
5.1. Conclusões.....	97
5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros.....	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXO I.....	120

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fluxograma esquemático com o resumo das atividades desenvolvidas neste trabalho.	24
FIGURA 2. Esquema geral da reação de esterificação.	35
FIGURA 3. Esquema geral da reação de transesterificação.	35
FIGURA 4. Métodos de imobilização de enzimas em suportes: (a) adsorção; (b) ligação covalente; (c) quelação; (d) encapsulação.	41
FIGURA 5. Aspecto da levedura <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (a) e do fungo <i>Penicillium crustosum</i> (b) semeados em meio PDA.	51
FIGURA 6. Aparato experimental utilizado no processo de imobilização.	57
FIGURA 7. Cromatógrafo gasoso utilizado para determinação das conversões em ésteres.	62
FIGURA 8. Comportamento dos extratos enzimáticos obtidos a partir da levedura <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (a) e do fungo <i>Penicillium crustosum</i> (b) em termos de atividade de esterificação em relação à concentração de sulfato de amônio utilizado para a precipitação.	69
FIGURA 9. Aspecto do extrato enzimático do fungo filamentoso <i>Penicillium crustosum</i> imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.	71
FIGURA 10. Aspecto da enzima comercial de pâncreas suíno imobilizada em argila Poço A.	74
FIGURA 11. Gráfico de Pareto da produção de geranil propionato (6 horas de reação) utilizado como catalisador extrato enzimático de <i>Penicillium crustosum</i> imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.	87
FIGURA 12. Efeito da razão molar sobre a conversão de geranil propionato à temperatura de 40 °C, concentração de enzima de 50% (m/m substratos) e agitação de 150 rpm, utilizando como catalisador extrato enzimático de <i>Penicillium crustosum</i> imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.	89
FIGURA 13. Efeito da razão molar sobre a conversão de geranil propionato à temperatura de 60 °C, concentração de enzima de 50% (m/m substratos) e agitação de 150 rpm, utilizando como catalisador extrato enzimático de <i>Penicillium crustosum</i> imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.	90

FIGURA 14. Atividade de síntese do extrato lipolítico de *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado e conversão em geranyl propionato à temperatura de 40 °C, concentração de enzima de 50% (m/m substratos), agitação de 150 rpm e razão molar 5:1..... 92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação das enzimas e tipos de reações catalisadas.....	26
TABELA 2. Principais aplicações de lipases em diferentes segmentos.	31
TABELA 3. Micro-organismos produtores de lipases respectivas referências	34
TABELA 4. Comparação entre os diferentes métodos de imobilização.	43
TABELA 5. Variáveis e níveis estudados no planejamento DCCR para o processo de precipitação da lipase	55
TABELA 6. Variáveis e níveis dos fatores investigados no planejamento experimental.....	64
TABELA 7. Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de geranyl propionato.....	64
TABELA 8. Atividade de síntese (U/g) dos extratos enzimáticos brutos e precipitados antes e depois da imobilização em alginato de sódio com carvão ativado.....	72
TABELA 9. Atividade de síntese (U/g) dos extratos enzimáticos brutos e precipitados antes e depois da imobilização em Poço A.....	74
TABELA 10. Conversões em ésteres etílicos utilizando os extratos em diferentes formas de obtenção de <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (a), de <i>Penicillium crustosum</i> (b) e da lipase comercial de pâncreas suíno (c).....	77
TABELA 11. Esterificação enzimática utilizando os extratos em diferentes formas de obtenção de <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (a), de <i>Penicillium crustosum</i> (b) e da lipase comercial de pâncreas suíno (c).....	80
TABELA 12. Esterificação enzimática utilizando como catalisador os extratos em diferentes formas de <i>Penicillium crustosum</i> (a) e da lipase comercial de pâncreas suíno (b) para conversão em geranyl propionato....	83
TABELA 13. Matriz do planejamento experimental 2^2 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em geranyl propionato nas reações conduzidas em condição de razão molar 3:1 (geraniol:ácido propiônico) agitação de 150 rpm, 6 horas de reação, utilizado como catalisador extrato enzimático de <i>Penicillium crustosum</i> imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.....	86

TABELA 14. Resultado da caracterização parcial do catalisador empregado no estudo da maximização da produção de geranil propionato... ..	94
---	----

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são macromoléculas de proteínas que atuam como catalisadores de alta eficiência durante o transcurso das complexas reações bioquímicas que formam parte do metabolismo dos seres vivos, considerando que estas são produzidas dentro das células destes organismos (Hasan *et al.*, 2006).

Além de serem ativas e versáteis, as enzimas são biocatalisadores altamente requisitados, devido as suas propriedades, o que às difere dos catalisadores não enzimáticos, levando em consideração que toda enzima catalisa transformações moleculares sem ocorrências de reações paralelas, devido à sua especificidade. Nessa classe especial de proteínas, a atividade biológica surge a partir de um sítio ativo, unido pela configuração tridimensional da molécula, onde pequenas mudanças neste sítio podem alterar a funcionalidade da enzima, considerando que a desnaturação destas proteínas está diretamente associada à mudanças conformacionais de sua estrutura protéica (Borzani *et al.*, 2001; Hendrickx *et al.*, 1998; Mateo *et al.*, 2007).

O aumento da preocupação com questões ambientais, qualidade do produto e redução de gastos em setores industriais, alavancou o interesse por enzimas em diferentes aplicações. A tecnologia enzimática é uma alternativa para substituir processos químicos por biocatalisados, uma vez que estes últimos possuem menor impacto ambiental, são mais limpos e apresentam-se como ferramentas promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases destacam-se entre as principais enzimas utilizadas em biocatálise, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio-regio e enantiosseletividade (Kapoor *et al.*, 2012; Krieger *et al.*, 2004).

Atualmente, as lipases têm apresentado grande importância no cenário biotecnológico, econômico e industrial. Essas enzimas são utilizadas como ferramenta tecnológica, representando uma perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de uma grande gama de produtos, entre eles os monoglicérides, ácidos graxos, agentes biotensoativos, compostos de aroma e sabor e lipídios estruturados ou modificados (Treichel *et al.*, 2010).

O potencial de aplicações industriais dessas enzimas abrange, além da indústria de alimentos, como aditivos (modificação de aromas), a química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (Kapoor *et al.*, 2012).

Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação industrial não é tão imediata porque, apesar das possíveis vantagens, as enzimas apresentam outras características que limitam a sua utilização em escala industrial. Dentre estas destacam-se a solubilidade das enzimas no meio de reação, o que inviabiliza economicamente sua separação dos produtos, a utilização destas como matéria-prima não reciclável, gerando elevação do custo operacional do sistema e a instabilidade operacional, restringindo a aplicação deste biocatalisador (Burton *et al.*, 2002; Lorenz e Eck, 2005).

Neste contexto, o uso de lipases não comerciais, obtidas a partir de matérias-primas renováveis e de baixo custo, pode também ser relevante para o desenvolvimento de processos utilizando enzimas como catalisadores, que sejam economicamente viáveis (Salihu *et al.*, 2012). Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas, e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional (Treichel *et al.*, 2010).

A imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente. Ao se obter uma enzima imobilizada ativa e estável, e com boa especificidade ao substrato, a maioria das desvantagens dos biocatalisadores é eliminada e as enzimas

podem ser utilizadas nos processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos (Zanin e Moraes, 2004).

As razões para a escolha de um derivado imobilizado podem variar dependendo da aplicação, incluindo: utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros (Mendes *et al.*, 2011).

Tendo em vista a viabilidade de obtenção de lipases de diferentes fontes associadas às vantagens da utilização de enzimas imobilizadas e ao potencial de aplicação destas como biocatalisadores em reações de interesse a proposta deste trabalho foi consolidada, cujos objetivos foram traçados e serão apresentados a seguir.

1.1. Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho consiste na produção de lipases utilizando dois micro-organismos isolados e selecionados previamente como potenciais produtores desta enzima, seguido da subsequente imobilização dos extratos enzimáticos obtidos em diferentes suportes para a posterior aplicação destes como catalisadores em reações de síntese, na obtenção de produtos de interesse científico e tecnológico.

Com base no objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

1. Produção de lipases através da fermentação em estado sólido (FES) utilizando *Penicillium crustosum* e *Sporidiobolus pararoseus* e resíduo agroindustrial como substrato em condições previamente otimizadas em termos de atividade de síntese;

2. Concentração dos extratos enzimáticos obtidos das diferentes fontes microbianas, por precipitação com sulfato de amônio;
3. Imobilização dos extratos enzimáticos nos suportes: alginato de sódio com carvão ativado e montmorrolonita Poço A;
4. Imobilização da lipase comercial de pâncreas suíno em alginato de sódio com carvão ativado e montmorrolonita Poço A;
5. Aplicação das lipases nas diferentes formas de apresentação na catálise de reações de interesse industrial.
6. Maximização da produção de geranyl propionato usando extrato enzimático com maior atividade de síntese.
7. Caracterização parcial do catalisador empregado.

1.2. Descrição das Etapas da Pesquisa de Tese de Doutorado

O atual interesse pela obtenção de enzimas capazes de superar os desafios ainda encontrados nas áreas de aplicação em bioprocessos, como os custos de produção e especificidade das mesmas, motiva o esboço dos principais objetivos pretendidos com a realização desta pesquisa de Doutorado. A seguir, cada objetivo específico será detalhado apresentando as etapas a serem executadas.

1. Produção de lipases através da fermentação em estado sólido (FES) utilizando *Penicillium crustosum* e *Sporidiobolus pararoseus* e farelo de soja como substrato em condições previamente otimizadas em termos de atividade de esterificação.
 - a. Liofilização dos extratos enzimáticos obtidos através do fungo filamentosso *Penicillium crustosum* e da levedura *Sporidiobolus pararoseus*.
 - b. Avaliação quantitativa, através da medida de atividade de síntese, sobre a capacidade destes em produzir lipases.
2. Concentração dos extratos enzimáticos obtidos das diferentes fontes microbianas, por precipitação com sulfato de amônio;

- a. Estudo da pré-purificação do extrato enzimático bruto, através da avaliação de diferentes concentrações de saturação, utilizando o sulfato de amônio como sal, variando o tempo de precipitação das proteínas.
 - b. Liofilização dos extratos enzimáticos concentrados obtidos através do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e da levedura *Sporidiobolus pararoseus*.
3. Imobilização dos extratos enzimáticos nos suportes: montmorrolonita Poço A e alginato de sódio com carvão ativado;
 - a. Imobilização do extrato enzimático bruto e concentrado do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e da levedura *Sporidiobolus pararoseus* nos diferentes suportes.
 - b. Acompanhamento das técnicas de imobilização, através da medida de atividade de síntese.
 4. Imobilização da lipase comercial de pâncreas suíno em montmorrolonita Poço A e alginato de sódio com carvão ativado;
 - a. Imobilização da lipase comercial de pâncreas suíno.
 - b. Acompanhamento das técnicas de imobilização, através da medida de atividade de síntese.
 5. Aplicação das lipases nas diferentes formas de apresentação na catálise de reações de interesse industrial.
 - a. Obtenção dos extratos enzimáticos provenientes do fungo *Penicillium crustosum* e da levedura *Sporidiobolus pararoseus* nas diferentes formas:
 - ✓ Extrato enzimático bruto (EEB),
 - ✓ Extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI),
 - ✓ Extrato enzimático precipitado (EEP)
 - ✓ Extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI)
 - b. Aplicação dos diferentes extratos enzimáticos obtidos do fungo e da levedura, bem como, da lipase comercial de pâncreas suíno livre (ECL) e imobilizada (ECI), na catálise das reações de:

- ✓ Transesterificação enzimática em meio orgânico para produção de biodiesel
 - ✓ Esterificação enzimática para produção de etil oleato
 - ✓ Esterificação enzimática para produção de geranil propionato.
6. Maximização da produção de geranil propionato através da técnica de planejamento de experimentos.
- a. Avaliação do efeito das variáveis (temperatura e concentração de enzima) no processo de esterificação.
 - b. O estudo do efeito da razão molar geraniol:ácido propionico na cinética da produção.
 - c. Avaliação do reuso do extrato enzimático não comercial de *Penicillium crustosum* imobilizado.
7. Caracterização parcial do catalisador empregado na maximização da produção de geranil propionato.

1.3. Estrutura de apresentação da Tese

A descrição do presente estudo foi realizada em capítulos, sendo que o Capítulo 1 apresenta a introdução do trabalho, os objetivos e as etapas envolvidas no desenvolvimento desta tese. O Capítulo 2 aborda uma breve e consistente revisão da literatura acerca dos temas a serem abordados no desenvolvimento do trabalho, onde será apresentado o estado da arte a respeito da produção, concentração e imobilização de enzimas, bem como a aplicação de enzimas de interesse, em especial, as lipases.

No Capítulo 3 são descritos os materiais empregados nos experimentos, bem como as metodologias empregadas em todo o processo de imobilização e no estudo da aplicação dos imobilizados em reações de síntese.

Os resultados obtidos são relatados e discutidos no Capítulo 4. No Capítulo 5 serão apresentadas as conclusões obtidas após a realização dos

experimentos e discussão dos resultados e, finalmente, as sugestões para trabalhos futuros referentes à presente pesquisa.

As referências consultadas para a proposição e embasamento desta proposta são apresentadas no Capítulo 6.

A Figura 1 apresenta um fluxograma esquemático para melhor visualização das etapas desenvolvidas neste trabalho.

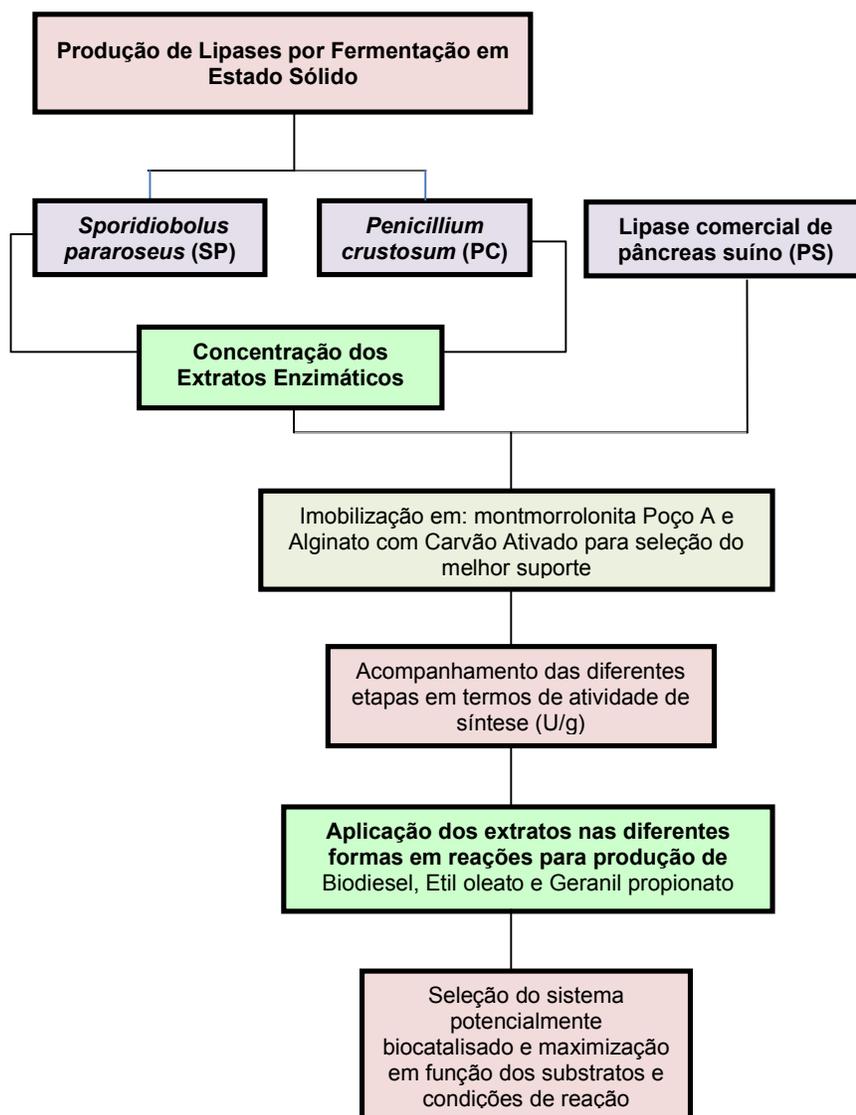


Figura 1. Fluxograma esquemático com o resumo das atividades desenvolvidas neste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Grande parte das enzimas são moléculas de proteínas complexas que agem como catalisadores em reações bioquímicas. Elas são formadas por células de todos os seres vivos. Estes catalisadores biológicos são extremamente eficientes e muito específicos nas suas funções, desta forma, o uso de enzimas para novas aplicações industriais vem crescendo muito nos últimos tempos, vindo de encontro ao apelo da diminuição a agressões ambientais (Treichel *et al.*, 2010).

Enzimas lipolíticas, como lipases e esterases, constituem um importante grupo de enzimas associadas com o metabolismo de degradação de lipídios. Os micro-organismos produtores de lipase podem ser encontrados no solo e em diversos resíduos oleosos. Os aspectos biológicos, fisiológicos e de aplicação industrial das lipases vêm sendo bastante estudados devido à sua ação sobre substratos insolúveis em água (Treichel *et al.*, 2010).

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à imobilização e estudo da concentração de lipases, bem como aplicações em reações de interesse. Com base no exposto anteriormente, levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, ênfase especial será dada à lipases microbianas obtidas por meio do fungo *Penicillium crustosum* e da levedura *Sporidiobolus pararoseus*, via fermentação em estado sólido (FES) e, à lipase comercial obtida de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich). Resultados da literatura concernentes às etapas realizadas nesta pesquisa apresentam especial destaque.

2.1 Enzimas

As enzimas constituem um grupo de substâncias orgânicas de natureza normalmente protéica (existem também enzimas constituídas de

RNA, as ribozimas), com atividade intra ou extracelular que têm funções catalisadoras (Tabela 1.), catalisando reações químicas que, sem a sua presença, dificilmente aconteceriam. Isso é conseguido através do abaixamento da energia de ativação necessária para que se dê uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo dos seres vivos. A capacidade catalítica das enzimas torna-as adequadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou de alimentos.

Tabela 1. Classificação das enzimas e tipos de reações catalisadas.

Classe de Enzimas	Algumas Subclasses	Tipos de Reações Catalisadas
Oxidoreduases	Desidrogenases Oxidases Redutases	Formação de ligação dupla por eliminação de H ₂ Oxidação Redução
Transferases	Quinase Transaminase	Transferência de um grupo fosfato Transferência de um grupo amino
Hidrolases	Nucleases Lipases Proteases	Hidrólise de um grupo fosfato Hidrólise de um grupo éster Hidrólise de um grupo amino
Liases	Descarboxilases Desidrases	Eliminação de CO ₂ Eliminação de H ₂ O
Isomerases	Epimerases	Isomerização de um centro estereogênico
Ligases	Carboxilases Sintetases	Adição de CO ₂ Formação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.

Em sistemas vivos, a maioria das reações bioquímicas dá-se em vias metabólicas, que são sequências de reações em que o produto de uma reação é utilizado como reagente na reação seguinte. Diferentes enzimas catalisam diferentes passos de vias metabólicas, agindo de forma sincronizada de modo a não interromper o fluxo nessas vias. Cada enzima pode sofrer regulação da sua atividade, aumentando-a, diminuindo-a ou mesmo interrompendo-a, de modo a modular o fluxo da via metabólica em que se insere (Patel, 2002; Pizarro e Park, 2003).

Além de serem muito ativas e versáteis, as enzimas são biocatalisadores altamente requisitados, devido às suas propriedades, executando uma série de

transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. A facilidade de regular a atividade enzimática é mais um ponto positivo na utilização de enzimas. Para isso basta apenas que se modifique a natureza do meio de reação, altere o pH ou adicione algum efector. Toda enzima ainda catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (Patel, 2002; Pizarro e Park, 2003).

As enzimas industriais são em sua maioria obtidas de micro-organismos (Sharma *et al.*, 2001). As enzimas microbianas são normalmente mais úteis que as enzimas derivadas de plantas e animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, aos altos rendimentos possíveis, à facilidade de manipulação genética, ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios de baixo custo. As enzimas microbianas são também mais estáveis e sua produção é mais conveniente e segura. Contudo, apenas cerca de 2% dos micro-organismos existentes foram testados como produtores de enzimas (Hasan *et al.*, 2006).

Muito da história da bioquímica refere-se à pesquisa em enzimas. Em 1926, James Sumner's isolou e cristalizou a primeira enzima, a urease, que catalisa a hidrólise da uréia em NH_3 e CO_2 (Voet *et al.*, 2000).

Segundo Medeiros *et al.* (1999) a aplicação tecnológica de enzimas é bastante vantajosa quando comparada aos processos químicos por não necessitar de condições de temperatura e pressão drásticas. Uma das vantagens da produção microbiana de enzimas é que se pode utilizar substratos de baixo custo e as mesmas exigirem um tempo relativamente curto de produção.

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, os quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais (Castro *et al.*, 2004).

A aplicação das enzimas em produtos e processos industriais ganhou maior importância a partir do início do século XX, com os avanços tecnológicos e científicos em áreas como a bioquímica. Com isso, o mercado de enzimas tornou-se mais atrativo, sendo as mesmas comercializadas e empregadas em larga escala (Said e Pietro, 2004).

De acordo com Said e Pietro (2004), aproximadamente 75% das enzimas aplicadas industrialmente são hidrolases, utilizadas na despolimerização de substâncias naturais. Entre as enzimas classificadas como hidrolases, as proteases dominam o mercado enzimático, representando cerca de 40% de todas as enzimas comercializadas. As proteases são empregadas em vários setores como a indústria de alimentos, detergentes, couro e farmacêutica. O segundo grande grupo de hidrolases com aplicação industrial é composto pelas carbohidrases, utilizadas em cervejarias, panificação, na indústria do amido, têxtil e de papel. Além destes setores, estas enzimas têm sido utilizadas na fabricação de ração animal, em biotransformação de produtos químicos, em análises diagnósticas e no tratamento de resíduos. Outras classes de enzimas encontram aplicação industrial pontual, como a glicose isomerase, as oxidases, glicose oxidase, colesterol oxidase e algumas enzimas usadas em técnicas de biologia molecular.

2.1.1 Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres na interface lipídio-água (Treichel *et al.*, 2010; Rajendran e Thangavelu, 2009), em sistemas biológicos (Rodrigues *et al.*, 2008). Sendo assim, as lipases catalisam a transesterificação de ésteres, bem como a síntese destes compostos, além de apresentarem propriedades enantiosseletivas. São também capazes de catalisar reações de lactonização (esterificação intramolecular), além de agirem sobre compostos que causam ranços (Levy *et al.*, 2003; Pastore *et al.*, 2003). A capacidade de lipases para realizar transformações químicas muito específicas (biotransformações) tornou-as interessantes em alimentos, detergentes, sínteses,

cosméticos orgânicos, produtos farmacêuticos e industriais (Treichel *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2008).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica (IUB), a lipase catalisa a seguinte reação:



As lipases ainda têm sido pouco empregadas industrialmente, embora sejam estudadas há anos e possam ser produzidas em larga escala. Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de otimizar os processos de modificação de óleos e gorduras catalisados por lipases. Tais pesquisas incluem estudos cinéticos, desenvolvimento de biorreatores e imobilização de enzimas (Carvalho *et al.*, 2003).

Estes catalisadores tornaram-se parte integrante da indústria alimentar moderna, e um grande número de lipases são produzidas em escala industrial para o desenvolvimento de aromas em produtos lácteos, processamento de alimentos, como carnes, legumes, frutas, assados e cerveja (Treichel *et al.*, 2010; Rajendran e Thangavelu, 2009).

2.2 Aplicações de Lipases

As lipases têm recebido atenção especial por parte do meio industrial devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade ao substrato e representam a classe de enzimas mais amplamente empregada em aplicações biotecnológicas e química orgânica (Treichel *et al.*, 2010).

O potencial de aplicações industriais que as lipases possuem abrange a indústria de alimentos, como aditivos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (Burkert, 2002; Burkert *et al.*, 2004).

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas para a obtenção de maiores rendimentos de produção, além de enzimas mais robustas e altamente específicas para cada tipo de aplicação, ampliando as possibilidades de aplicações industriais destes biocatalisadores (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Segundo Bon *et al.* (2008), as enzimas lipolíticas constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas. A produção de lipases microbianas requer um entendimento detalhado do mecanismo molecular que governa a sua secreção e formação. A otimização de propriedades das lipases industrialmente relevantes tem sido estabelecida com sucesso utilizando lipases para a síntese de biopolímeros e biodiesel, a produção de farmacêuticos enantiopuros, agroquímicos e flavors.

Devido às suas características biocatalíticas, as lipases são utilizadas em diversos campos de aplicação. A Tabela 2 sintetiza as principais aplicações das lipases em diferentes segmentos (Martins *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2006), considerando as reações de hidrólise e a esterificação.

A reação de hidrólise envolve o ataque na ligação de éster do triglicerídeo na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos. A alta especificidade das lipases pelo triglicerídeo com relação ao tipo e à posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxo propicia um grande número de aplicações dentro da área de alimentos. Aromatizantes para uso em alimentos destinados ao consumo humano e animal têm sido obtidos através da hidrólise parcial de triglicerídeos (Malcata *et al.*, 1990).

A reação de esterificação entre polióis e ácidos graxos livres é, em sua essência, a reação inversa da hidrólise do glicerídeo correspondente. As velocidades relativas da reação direta (hidrólise) e inversa (esterificação) são usualmente controladas pela atividade de água da mistura reacional.

As principais aplicações das lipases em diferentes segmentos da indústria estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Principais aplicações de lipases em diferentes segmentos.

Indústria	Aplicações	Produtos
Hidrólise		
Alimentos	Hidrólise da gordura do leite	Desenvolvimento de “flavour” em produtos lácteos
Química	Hidrólise de óleos e gorduras Biorremediação Tratamento efluente gorduroso Análise de ácidos graxos de TGC	Ácidos graxos, mono diglicerídeos; Biossurfactantes Redução de sólidos
Química (detergentes)	Remoção de manchas de gorduras	Detergentes (roupas e superfícies)
Médica	Análise de triglicerídeos do sangue	Kits de diagnóstico
Farmacêutica, agroquímica	Hidrólise estéreo-específica	Resolução misturas racêmicas
Esterificação		
Química (química fina)	Síntese de ésteres	Compostos quirais intermediários terapêutico; Ésteres e emulsificantes; “Flavour”, Fragrância para cosméticos
Alimentos, Química, Farmacêutica	Transesterificação (óleos naturais)	Óleos e gorduras: análogos de manteiga de cacau, Biodiesel
Têxtil	Síntese de poliésteres	Poliésteres biodegradáveis, aromáticos,
Alimentos	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas

Fonte: Rigo, 2009

Exemplos de produtos químicos de alto valor obtidos pelo uso de lipases para esterificação incluem a síntese de ésteres de ácido oléico com álcoois alifáticos primários e secundários e álcoois terpênicos e a produção de ésteres dos álcoois geraniol e mentol com ácido propiônico e ácido acético, respectivamente (Oliveira, 1999; Paroul *et al.*, 2010, Chiaradia *et al.*, 2011).

O termo interesterificação refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou um éster e outro éster (transesterificação). Nessas reações, o triglicerídeo reage com um ácido graxo, um álcool ou outro éster, resultando em um rearranjo dos grupos de ácidos graxos do triglicerídeo de forma a produzir um novo triglicerídeo. O rearranjo é o resultado de reações concorrentes de

hidrólise e esterificação. A concentração ótima de água no meio reacional deve ser suficientemente baixa de forma a minimizar a formação de produtos de hidrólise indesejáveis, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça totalmente ativa (Malcata *et al.*, 1990).

O biodiesel é formado pelos ésteres monoacil de óleos e gorduras e pode ser utilizado como mistura com os combustíveis derivados de petróleo, o diesel. Recentemente, as pesquisas têm sido voltadas para utilização das lipases na transesterificação de moléculas de ácidos graxos de elevado peso molecular. A lipase catalisa a reação do álcool com óleos vegetais e gordura animal. Sabendo-se que várias matérias-primas agropecuárias são ricas em gorduras e óleos, o emprego delas como fontes de biocombustíveis ganha uma notável importância tecnológica, social e econômica (Lee *et al.*, 2002).

2.2.1. Lipases Microbianas como Biocatalisadores

Lipases são produzidas por várias plantas, animais e micro-organismos. As últimas representam a classe mais utilizada de enzimas em aplicações biotecnológicas e química orgânica. Micro-organismos com potencial para produção de lipases tanto em fermentação submersa (FS) como em estado sólido (FES) têm sido relatados (Treichel *et al.*, 2010).

Aproximadamente cem anos atrás, o microbiologista C. Eijkmann reportou que diferentes cepas bacterianas poderiam produzir e secretar lipases (Jaeger e Eggert, 2002). Então, a partir de 1906, iniciaram-se os estudos sobre produção de lipases utilizando-se diversos micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases microbianas têm recebido atenção especial devido às suas diversas propriedades, como relativa facilidade de preparação e ampla especificidade pelo substrato, estereosseletividade (Treichel *et al.*, 2010; Rajendran e Thangavelu, 2009) além de facilidade de produção em grandes quantidades (Hansan *et al.*, 2006). Uma revisão dos micro-organismos mais

recentemente citados como produtores de lipase por FS (fermentação submersa) e FES (fermentação em estado sólido) e respectivas referências estão representados na Tabela 3.

Nas últimas décadas, o interesse na produção de lipases microbianas tem aumentado devido à versatilidade da estrutura molecular e propriedades catalíticas. Estas enzimas têm um amplo potencial de aplicação em diferentes setores industriais, conforme já citado anteriormente (Damaso *et al.*, 2008).

Na produção de alimentos (laticínios, peixe e produtos cárneos) e bebidas alcoólicas, os micro-organismos vêm desempenhando um papel importante. Além disso, vários produtos de fermentação microbiana também são incorporados em alimentos como aditivos e suplementos (antioxidantes, aromas, corantes, conservantes, edulcorantes e outros).

Há grande interesse no desenvolvimento e utilização de alimentos naturais e aditivos derivados de micro-organismos, uma vez que são mais desejáveis do que os sintéticos produzidos por processos químicos (Couto e Sanromán, 2006).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (Dallavechia *et al.*, 2004).

A biotransformação pode ser aplicada às modificações específicas ou interconversões da estrutura química realizadas por catalisadores bioquímicos. O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente em áreas de engenharia de proteínas e enzimologia e em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (Castro *et al.*, 2004).

Tabela 3. Micro-organismos produtores de lipases e respectivas referências.

Micro-organismo	Tipo	Referência	
		FS*	FES**
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Fungo	Rajendran <i>et al</i> (2009)	
<i>Candida cylindracea</i>	Levedura	D'Annibale (2006)	
<i>Rhizopus sp.</i>	Fungo		Martínez-Ruiz <i>et al</i> (2008)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Bactéria	Cheirsilp <i>et al</i> (2009)	
<i>Yarrowia lipolytica (cepa mutante)</i>	Levedura	Fickers <i>et al</i> (2009)	
<i>Bacillus coagulans</i>	Bactéria		Alkan <i>et al</i> (2006)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Fungo		Rodriguez <i>et al</i> (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	Fungo		Dutra <i>et al</i> (2008)
<i>R. oryzae</i>	Fungo	Kawakami <i>et al</i> (2009)	
<i>Candida antarctica</i>	Levedura	Vahla <i>et al</i> (2008)	
<i>Penicillium verrucosum</i>	Fungo		Kempka <i>et al</i> (2008)
<i>Aspergillus Níger</i>	Fungo		Damaso (2008)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo		Martins <i>et al</i> (2008)
<i>Phialemonium sp.</i>	Fungo		Martins <i>et al</i> (2008)
<i>Mucor miehei</i>	Fungo	Shamel <i>et al</i> (2007)	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Levedura	Mingrui Yu (2007)	
<i>Aspergillus oryzae (geneticamente modificado)</i>	Fungo	Dizgea <i>et al</i> (2009)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria		Gupta <i>et al</i> (2008)
<i>Candida Antarctica</i>	Levedura	Rodrigues <i>et al</i> (2008)	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Bactéria	Al-Zuhair <i>et al</i> (2009)	
<i>Candida antarctica</i>	Levedura	Al-Zuhair (2009)	
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactéria	Takaç <i>et al</i> (2008).	
<i>Bacillus sp.</i>	Bactéria	Ertugrul <i>et al</i> (2007)	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Fungo	Hama <i>et al</i> (2009)	
<i>Rhizopus chinensis</i>	Fungo	Sun & Xu (2009)	
<i>Rhizopus chinensis</i>	Fungo		Sun & Xu (2009)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Levedura	Destain <i>et al</i> (2008)	
<i>Candida cylindracea</i>	Levedura	Brozzoli <i>et al</i> (2009)	
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Fungo	Xie e Ning Ma (2009)	
		Teng <i>et al</i> (2009)	
<i>Rhizopus chinensis</i>	Fungo	Xu <i>et al</i> (2009)	
<i>Aureobasidium pullulans (isolada do mar)</i>	Levedura	Liu <i>et al</i> (2008)	
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Fungo		Vargaset <i>al</i> .(2008)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Levedura		Ferraz <i>et al</i> .(2012)

FS*- Fermentação submersa; FES**- Fermentação em estado sólido.

Fonte: O autor

A especificidade é uma característica importante das lipases. Aproximadamente, quatro classes de especificidades podem ser definidas. A

primeira é a especificidade em relação à classe de lipídios. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo, tri-, di- ou monoglicerídios, colesterol éster, metil éster, etc. A segunda é a regioespecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia. Finalmente, merece referência a estereoespecificidade, ou seja, algumas lipases catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estereoisômeros (Van der Padt, 1993).

Entretanto, sob condições microaquosas, elas são capazes de catalisar a síntese de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos, como representado na Figura 2.

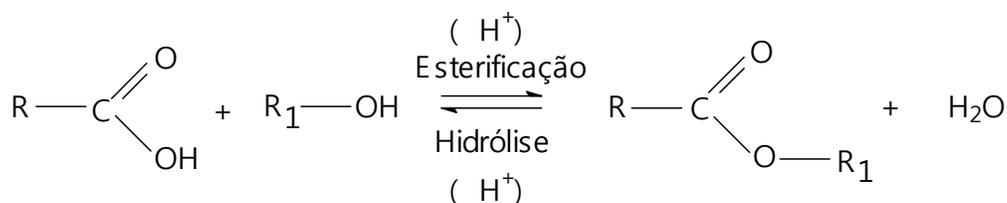


Figura 2. Esquema geral da reação de esterificação.

Uma combinação destes dois processos básicos em sequências lógicas pode resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise ou transesterificação), Figura 3, a depender dos reagentes de partida. (Castro *et al.*, 2004).

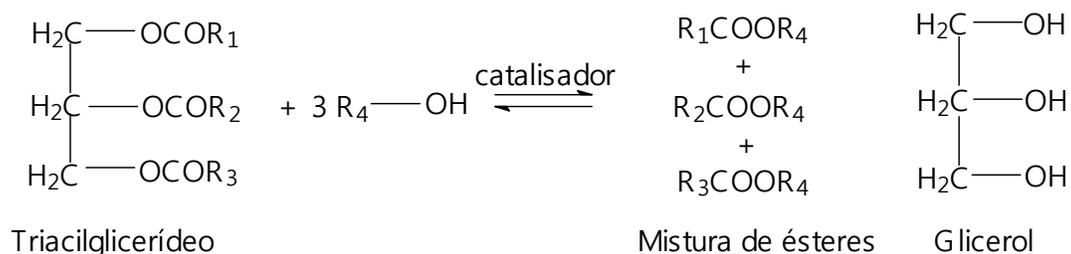


Figura 3. Esquema geral da reação de transesterificação.

O processo de transesterificação, representado na Figura 3, também chamado de alcoólise, consiste no deslocamento do álcool e de um éster em um processo similar à hidrólise, exceto pelo emprego de um álcool ao invés da água. Alguns álcoois são empregados de modo satisfatório na reação, dentre estes pode-se citar, metanol, etanol, propanol e butanol, sendo que o mais amplamente utilizado é o metanol devido ao baixo custo e às vantagens físicas e químicas deste reagente (Fukuda *et al.*, 2001).

2.3. Pré-purificação dos Extratos Enzimáticos

A etapa de purificação é importante para a obtenção de enzimas com alto grau de pureza e com maiores atividades enzimáticas. O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima, já que, após a fermentação, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que podem não ser de interesse. Independentemente da fonte de lipase ou da técnica empregada, a purificação tem uma capacidade limitada no que se refere ao aumento da atividade específica (Menoncin *et al.*, 2009).

Diversas técnicas têm sido empregadas para a purificação de lipases, a precipitação de proteínas muitas vezes é usada como primeiro passo de purificação e neste caso o sulfato de amônio é o agente de precipitação mais utilizado (Gupta e Roy, 2004).

De acordo com Martins *et al.* (2008), a técnica de precipitação das proteínas com sais, aplicada como pré-tratamento do meio contendo a enzima de interesse, facilita os processos subsequentes devido à ausência de possíveis interferentes. Esta metodologia consiste em uma das técnicas de concentração de proteínas, para separação das mesmas dos outros compostos do meio. A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas proteicas se agregam e precipitam. O sal é adicionado ao sobrenadante até uma porcentagem de saturação em que a enzima de interesse é precipitada e

separada por centrifugação. A composição do extrato, sua concentração e temperatura podem influenciar a precipitação, no caso das enzimas a temperatura deve ser mantida baixa (4°C). A adição do sal deve ser lenta e sob agitação para favorecer a homogeneidade. Após a centrifugação, o precipitado deve ser redissolvido em tampão adequado, utilizando-se um volume de aproximadamente duas vezes o volume de precipitado (Borzani *et al.*, 2001).

A avaliação do uso de diferentes concentrações de sulfato de amônio para precipitação da lipase produzida através do sistema de FES com *Penicillium verrucosum* e *Sporidiobolus pararoseus* foi estudada através planejamento experimental, abrangendo a faixa de 32 a 88% de saturação.

Redução da atividade enzimática, alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas com o processo de purificação, apesar da importância do estudo da purificação da enzima é preciso considerar que por mais adequado que seja o processo escolhido, este sempre vai causar alterações na enzima (Maldonado, 2006).

2.4. Imobilização de Enzimas

De um modo geral, as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve *et al.*, 2000).

Enzimas na sua forma nativa (enzimas livres) têm sido estudadas, por vários séculos, na indústria de alimentos e mais recentemente nas indústrias farmacêuticas e químicas. Sua estrutura e modo de ação vêm sendo

gradativamente elucidados por métodos experimentais bem estabelecidos, como técnicas clássicas de difração de raios-X e avançadas de Ressonância Magnética Nuclear (RNM). Metodologias modernas de engenharia genética têm possibilitado a produção de enzimas em larga escala ou a modificação de sua estrutura primária, alterando, portanto algumas de suas características físico-químicas e biológicas. De igual significância são as recentes técnicas de evolução direcionada, as quais tem permitido, via modificação do DNA, a preparação de enzimas especialmente dirigidas para uma determinada finalidade, enzimas que atuam em valores extremos de pH e temperatura, bem como em presença de meios não convencionais (solventes orgânicos, fase gasosa, CO₂ supercrítico).

Enzimas imobilizadas são aquelas que se encontram ligadas covalentemente ou não em um suporte que possa proteger a capacidade catalítica da enzima (Brígida, 2006). O processo de imobilização consiste em circundar o material com atividade biológica em uma matriz polimérica envolvida por uma membrana semipermeável. Esta membrana permite a difusão de nutrientes, oxigênio e protegem de perdas internas da célula de ambos, *stress* mecânico e compostos tóxicos (Qi *et al.*, 2006).

De interesse particular é o aumento do uso de enzimas imobilizadas, termo empregado por Katchalski–Katzir na primeira Conferência de Engenharia Enzimática realizada em Henniker, NH, EUA em 1971, para designar enzima fisicamente confinada ou localizada numa certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usada repetidamente e continuamente. Nesta técnica, a enzima fica retida no interior (poros) ou na superfície de um material que é utilizado como suporte. O complexo, enzima–suporte, mantém as características físicas do suporte e ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel. O termo enzima imobilizada inclui: (a) a modificação das enzimas de forma a torná-las insolúvel em água; (b) a utilização de enzimas na forma solúvel em reatores equipados com membranas de ultrafiltração, que permitem o escoamento dos produtos da reação, porém retendo a enzima no interior do reator; e (c) a restrição da mobilidade da

enzima pela ligação à outra molécula que torna o sistema insolúvel no meio reacional (Miranda, 2004).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

O sistema imobilizado permite a condução de reações em reatores contínuos, com fácil separação de catalisador-produto, e aumento da produtividade do processo (massa de substrato/ massa de biocatalisador).

A tecnologia de imobilização une os conhecimentos da química, bioquímica e biologia celular com aqueles da engenharia, buscando sempre ampliar às aplicações das enzimas na conversão de matérias-primas, normalmente de baixo custo, em produtos de maior valor agregado. Dessa forma, a imobilização de enzimas é realizada não só com o propósito de atender aplicações puramente científicas, onde são utilizadas como modelos para estudar a relação entre a atividade catalítica e a estrutura proteica, mas principalmente visando o uso comercial em processos contínuos (Miranda, 2004).

A escolha de um processo de imobilização para uma dada enzima depende de fatores essenciais do processo, tais como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. Um dos principais fatores é a seleção de um suporte adequado para a fixação da enzima. Assim, o método escolhido deve atender a duas necessidades, a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a controle e *down-streaming process* (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Segundo Assis (2004), as enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens em relação às enzimas solúveis. Entre elas, pode-se citar a

capacidade de reutilização da enzima, maior facilidade de separação do produto final, diminuindo as etapas posteriores de purificação do mesmo. A imobilização enzimática permite a operação contínua, facilita o controle da reação, reduz o volume desta e possibilita uma alta concentração catalítica no reator. A reação pode ser interrompida no momento desejado pela simples remoção da enzima, em processos de batelada, ou pelo ajuste do tempo de residência, em reatores contínuos. O processo de imobilização ainda permite a modificação favorável das propriedades catalíticas de algumas enzimas, as quais passam a apresentar maior estabilidade ao pH e a temperatura.

Como as enzimas não são consumidas na reação, sua ação catalítica é semelhante aos catalisadores inorgânicos. Porém, é diferente dos catalisadores sintéticos comuns pela forma amena que realiza a catálise, geralmente em soluções aquosas neutras, temperatura e pressão ambiente e, principalmente, com elevado grau de especificidade em relação ao substrato. O processo de imobilização tem sido bastante estudado para viabilizar o uso de enzimas industrialmente, permitindo a recuperação e o reaproveitamento da mesma, pois o uso da enzima livre é, em várias situações, inviável economicamente (Segel, 1979; Ribeiro, 1989; Coutinho Filho, 1996; Vicente, 2000).

A partir de 1960, foi observado um aumento progressivo nas publicações de trabalhos científicos com enzimas imobilizadas, refletindo o interesse mundial despertado por esta tecnologia. Entretanto, o primeiro processo industrial de imobilização enzimática foi implantado no Japão em 1969, para a produção de L-aminoácidos; seguido da aplicação de glicose isomerase imobilizada, implantada nos Estados Unidos em 1972, para a isomerização de glicose em frutose. Desde então, novos processos de imobilização e novas aplicações industriais têm sido relatados na literatura (Zanin e Moraes, 2004).

2.4.1. Métodos de Imobilização de Enzimas em Suportes

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do derivado imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada. Os principais métodos de imobilização são: adsorção, ligação covalente, quelação e encapsulação, conforme Figura 4 (Haider e Husain, 2009; Girelli e Mattei, 2006; Malcata *et al.*, 1990; Kennedy *et al.*, 1988).

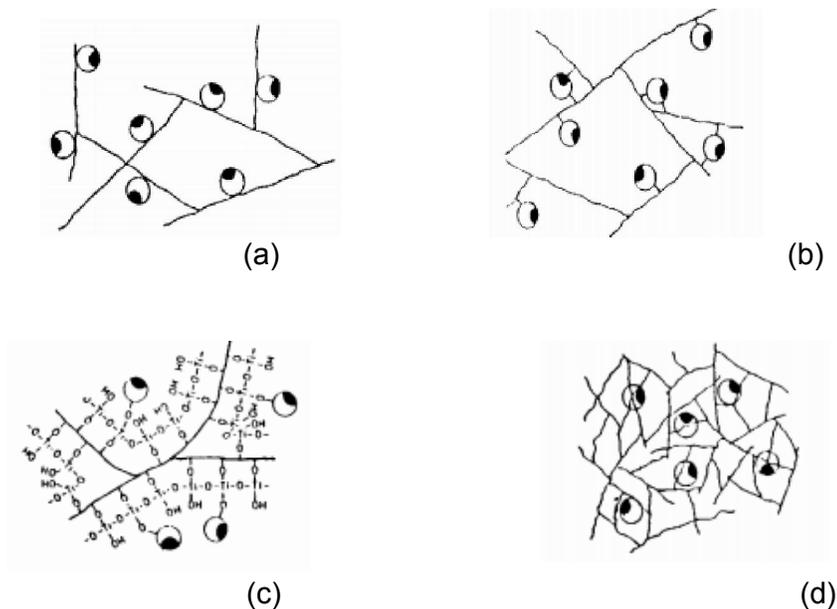


Figura 4. Métodos de imobilização de enzimas em suportes: (a) adsorção; (b) ligação covalente; (c) quelação; (d) encapsulação.

(a) Adsorção Física

É o método mais simples e utilizado para imobilização de enzimas. A enzima é imobilizada sobre um suporte sólido por ligações fracas, tais como interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações iônicas.

A escolha do suporte depende de suas propriedades que são importantes para aplicações industriais como: resistência mecânica e estabilidade física, caráter hidrofóbico e custo. Suportes como pérolas de vidro poroso, Celite e biopolímeros são muito utilizados nestes processos (Villeneuve *et al.*, 2000).

(b) Ligação Covalente

Neste método, a enzima é covalentemente ligada a um material insolúvel, em água, pela reação entre grupos funcionais da proteína e grupos reativos do material ativado. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. Neste caso, são envolvidos os resíduos de aminoácidos não essenciais à catálise enzimática e grupos reativos da superfície do suporte. Entre os grupos funcionais de resíduos de aminoácidos que podem participar da reação encontram-se: grupos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico; grupos amino da lisina e da hidroxilisina; hidroxila da serina e outros (Dalla-Vechia *et al.*, 2004; Taylor, 1991; Kennedy *et al.*, 1988).

(c) Quelação

Esta técnica envolve o uso de compostos de metais de transição que compõe como uns dos meios ativadores da superfície do suporte, permitindo a união direta da enzima, sem pré-derivação do suporte ativado, formando assim os quelantes. Os suportes usados são: vidro, quitina, celite, gelatina e celulose. Uma extensão para este processo é a derivatização do suporte ativado com o ácido 5-aminosalicílico para aumentar a força de ligação da enzima ao sistema. Também é possível formar o hidróxido ou óxido hídrico na presença de metais de transição. Enzimas imobilizadas ativas têm sido preparadas utilizando-se a técnica da ativação da superfície do suporte com metais de transição, formando ao final, um quelato entre a enzima e a superfície ativa do suporte, como apresentado na Figura 4c.

(e) Encapsulação

Este método está fundamentado na diferença de tamanho entre a molécula do catalisador e do soluto, e aqui duas aproximações têm sido adotadas: (a) a formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a numa estrutura tridimensional, ou (b) o biocatalisador é retido em uma membrana porosa. Nestes casos a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o

suporte. Conseqüentemente, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzimas imobilizadas. Este método pode compreender a encapsulação em gel, fibras e a microencapsulação. Na Figura 3d é mostrado um esquema de encapsulação em géis.

As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima, no interior de um volume relativamente pequeno, e a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: (a) a restrição de que os biocatalisadores somente podem ser aplicados com substratos de baixo peso molecular; (b) a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; (c) a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação; e, (d) os possíveis efeitos de inibição por produtos ou substrato no interior da matriz porosa.

Na Tabela 4, apresenta-se um resumo das dificuldades de cada método de imobilização, citados anteriormente.

Tabela 4. Comparação entre os diferentes métodos de imobilização.

Característica	Adsorção Física	Ligação covalente	Quelação	Encapsulação
Dificuldade de preparação	Simple	Difícil	Simple	Difícil
Força de ligação	Fraca	Forte	Intermediária	Intermediária
Atividade enzimática	Intermediária	Alta	Alta	Baixa
Regeneração do suporte	Possível	Rara	Possível	Impossível
Custo de imobilização	Baixo	Alto	Intermediário	Intermediário
Estabilidade	Baixo	Alta	Intermediária	Alta
Aplicabilidade geral	Sim	Não	Sim	Sim

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos, para cada aplicação de uma enzima imobilizada, é necessário se escolher o procedimento mais simples e mais barato, que resulte numa enzima imobilizada com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional.

2.4.2. Imobilização em Alginato de Sódio com Carvão Ativado

A imobilização via microencapsulamento consiste em confinar a enzima em um polímero insolúvel (envolvido em fibra ou gel) ou em uma microcápsula (microencapsulamento). Desta forma, moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como subprodutos e produtos, difundem-se. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima interage quimicamente com o polímero, evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana, bem como a massa molar dos mesmos, são fatores limitantes (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Gonçalves, 2007).

O encapsulamento celular representa um método promissor para várias proteínas e antibióticos. A biocompatibilidade das microcápsulas é claramente importante, bem como os requerimentos para ótima biocompatibilidade, incluindo uma ótima microgeometria da estrutura da membrana, um procedimento de encapsulamento com uma ótima capacidade para envolver as células com grânulos perfeitos e o uso de materiais apropriados (Orive *et al.*, 2002).

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados como suporte na imobilização de inúmeros tipos de recheio incluindo proteínas, enzimas, micro-organismos, aditivos alimentícios, pesticidas e compostos com atividade farmacológica. Alguns polímeros gelificam por geleificação iônica, geleificação térmica ou por uma combinação desses dois mecanismos. A preparação de microcápsulas através da geleificação iônica envolve a geleificação de uma solução polimérica aquosa com um íon de baixa massa molar, onde polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo. Mediante essa técnica, o material de recheio é extrusado como gota dentro de uma solução, formando uma gota gelificada.

Entre os hidrocolóides utilizados na forma de microcápsulas, encontram-se pectinas de baixo teor de esterificação, carragena e alginato de cálcio, todos requerendo um íon para a reticulação da matriz. A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade de ser termoestável, podendo ser armazenado à temperatura ambiente. O alginato tem sido o polímero mais utilizado para

encapsulação celular (Rocha e Grosso, 2006; Orive *et al.*, 2002). Com a adição de glutaraldeído a enzima se torna mais estável, ou seja, mantém seu potencial catalítico por mais tempo.

Dentre os fatores que contribuem para a queda de potencial catalítico durante os consecutivos ciclos destaca-se: desprendimento da enzima do suporte, desativação da enzima pelo substrato; obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; perda do suporte por atrito ou dissolução; obstrução do leito fixo causando canais preferenciais e crescimento de micro-organismo (Brígida, 2006).

2.4.3. Imobilização em Argilas do tipo Poço A

O uso de argilas como suportes para imobilização consiste na presença de grupos silanol que, após ativação por diferentes grupos funcionais, atuam como sítios de ligação para espécies bioativas. Além disso, as argilas possuem a possibilidade de serem sintetizadas, podendo, dessa forma, fornecer uma série reprodutível de materiais inorgânicos sólidos cujas propriedades físicas e/ou químicas podem ser alteradas de forma sistemática para identificar o suporte inorgânico mais adequado para uma determinada aplicação como suporte biocatalítico (Yesiloglu, 2005). Por essa razão, a síntese de algumas argilas como bentonitas e esmectitas torna-se um assunto de relevância científica, devido à produção de argilas com alta pureza química e a capacidade de ajustar a sua composição e estrutura para as mais diversas aplicações tais como: clarificação de tintas e óleos minerais, fabricação de cosméticos e produtos farmacêuticos e, no caso particular deste estudo, para a imobilização de enzimas. Segundo Yesiloglu (2005), a bentonita é uma matriz barata para a imobilização de enzimas e tem sido frequentemente utilizada para esse fim. Além do seu baixo custo, a bentonita possui várias vantagens para utilização como suporte, incluindo a sua baixa toxicidade e reatividade química, permitindo, facilmente, desta forma, a fixação e permanência das enzimas sob sua estrutura. A bentonita é uma partícula de argila mineral

composta de 2 folhas tetraédricas de silício (Si) e uma central octaédrica de alumínio (Al), unidas entre si por átomos de oxigênio comuns às folhas. Apresenta uma granulometria muito fina (inferior a 0,03% do grão médio da caulinita) que geralmente aumenta de volume de modo substancial em meio aquoso. Consiste principalmente de montmorillonita (de 60 a 80%), podendo conter outras argilas em menor proporção (normalmente, illita e caulinita), além de quartzo, feldspato, pirita ou calcita (Rossetto *et al.*, 2009).

2.5. Aplicação de Enzimas Imobilizadas

Embora as enzimas apresentem muitas vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, como alta especificidade, condições brandas de reação, baixo consumo de energia, e maior atividade catalítica, sua utilização em processos industriais têm sido limitada. Isto se deve, principalmente, à baixa estabilidade operacional, ao elevado custo de obtenção e à dificuldade de separação do produto final, impedindo seu uso em processos contínuos. Com a finalidade de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, têm-se estudado métodos para tornar enzimas insolúveis ao meio de reação, resultando nas técnicas de imobilização enzimática (Zanin e Moraes, 2004; Ladero *et al.*, 2002).

Dentre as aplicações das enzimas imobilizadas em larga escala, pode-se citar a produção de xaropes de glicose e frutose a partir do amido de milho; a produção do ácido 6-amino penicilínico e penicilina semi-sintética, com a enzima penicilina-G ou L-acilase; produção de acrilamida empregando células imobilizadas; produção de aspartame com termolisina imobilizada; e a hidrólise de lactose presente no soro de leite.

Apesar do grande número de trabalhos publicados no campo da imobilização enzimática, poucos processos são aplicados em escala industrial. Tal fato deve-se ao elevado custo dos suportes e reagentes utilizados no processo de imobilização, baixa eficiência de retenção catalítica da maioria dos

processos, baixa estabilidade operacional de muitas enzimas imobilizadas e pouca versatilidade em equipamentos de operação contínua. Além disso, a pequena demanda do produto normalmente não incentiva a produção em larga escala (Zanin e Moraes, 2004).

Inúmeros métodos têm sido descritos na literatura para contornar os possíveis problemas de instabilidade da enzima livre, e otimizar as várias aplicações.

2.6. A Importância Industrial de Ésteres de Ácidos Graxos

Os ésteres são importantes compostos orgânicos com um número crescente de aplicações comerciais. Estes compostos são amplamente utilizados para a preparação de compostos aromáticos, cosméticos, detergentes, sabores e produtos farmacêuticos. Os ésteres também podem ser utilizados como plastificantes e lubrificantes. O oleato de etila é utilizado, por exemplo, como aditivo biológico, plastificante e fluido hidráulico. Os ésteres obtidos a partir de fontes naturais não estão disponíveis em grandes quantidades, e são normalmente demasiado caro para serem utilizados em aplicações comerciais.

Portanto, muitos dos ésteres disponíveis são produzidos por sínteses químicas ou enzimáticas. A produção biotecnológica de ésteres utilizando lipases tem recebido grande atenção devido às condições de reações brandas (temperatura, pH e pressão) envolvidas, o elevado grau de pureza alcançado, bem como a aceitação destes produtos na indústria de alimentos (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008).

Os ésteres podem ser obtidos através de diferentes metodologias: 1) reação entre álcoois e ácidos carboxílicos (esterificação) com a eliminação de água; 2) reações de interesterificação, onde ocorrem trocas de grupos acilas entre ésteres e ácidos carboxílicos (acidólise), entre ésteres e álcoois (alcoólise) ou gliceróis (glicerólise) e entre ésteres (transesterificação); 3) através de fontes naturais por destilação e extração com solventes adequados

ou por processos químicos e, mais recentemente por biocatálise (Adachi e Kobayashi, 2005; Güvença *et al.*, 2002; Chowdary *et al.*, 2001; Alvarez-Macarie e Baratti, 2000).

Os processos enzimáticos apresentam inúmeras vantagens em relação aos processos químicos industriais. Por isso, a síntese enzimática do oleato de etila e de outros ésteres do ácido oleico em solventes orgânicos têm sido estudada utilizando-se lipases de pâncreas suíno e de várias fontes microbianas, como as de *Mucor miehei*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus oligosporus*, *R. delemar*, *R. arrhizus*, *Candida rugosa*, *Penicillium simplicissimum* e *Pseudomonas cepacia* (*Burkholderia cepacia*) (Bucalá *et al.*, 2006; Foresti e Ferreira, 2005; Foresti *et al.*, 2007; Hazarika *et al.*, 2002; María *et al.*, 2002).

Os produtos resultantes de ácidos e álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são importantes componentes de aromas e flavorizantes utilizados nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Já os produtos de esterificação de ácidos carboxílicos de cadeia longa (12-20 átomos de carbono) com álcoois de cadeia longa são utilizados como lubrificantes e plastificantes em máquinas de alta precisão. Os ésteres resultantes das reações entre ácidos de cadeia longa com álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são utilizados nas indústrias como aditivos em alimentos, detergentes, cosméticos e em medicamentos (Güvença *et al.*, 2002). Os ésteres de sacarose, por exemplo, são conhecidos como bons emulsificantes no campo da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética; o palmitato de isopropila é usado em preparações medicinais para cosméticos, nas quais é necessária uma boa absorção do produto através da pele. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, como os oleatos, palmitatos e linolenatos são os principais constituintes do biodiesel (Hazarika *et al.*, 2002).

2.7. Considerações Parciais

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, procurou-se apresentar o estado da arte a respeito da produção, concentração e

imobilização de enzimas, bem como a aplicação de enzimas de interesse, em especial, as lipases.

Também pode-se citar que o uso de lipases obtidas a partir de micro-organismos isolados e pré-selecionados, como catalisadores, apresenta-se como uma rota promissora na área biotecnológica, incluindo o estudo da sua produção em meios de baixo custo, sendo assim, de grande importância a utilização de enzimas não-comerciais.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo abordar, a concentração e imobilização de lipases microbianas produzidas no próprio Laboratório de Biotecnologia de Alimentos-URI-Campus de Erechim e a aplicação dessas enzimas e também da lipase comercial de pâncreas de porco, na catálise de reações de interesse para a indústria química e de alimentos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental relacionado à obtenção dos extratos enzimáticos brutos e concentrados liofilizados e a imobilização dos mesmos. As metodologias e equipamentos empregados nos testes de aplicação das lipases na catálise em reações de interesse também serão apresentados.

3.1. Produção de lipase de *Sporidiobolus pararoseus* e *Penicillium crustosum*

3.1.1. Micro-organismos

Levedura *Sporidiobolus pararoseus*

Este micro-organismo (Figura 4a) foi isolado previamente por Griebler *et al.* (2009), a partir de farelo de soja, e selecionado como um potencial produtor de lipases. O micro-organismo foi identificado no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do CENA-USP-Piracicaba como a levedura *Sporidiobolus pararoseus*.

Manutenção da cepa

Para a manutenção da levedura, esta foi incubada em meio PC (% m/v em água destilada 0,5% de peptona; 0,1% de dextrose; 0,25% de extrato de levedura) a 27 °C por 24 h. Após o desenvolvimento da levedura foi adicionado aos microtubos estéreis de 1,5 mL, o meio com a cultura e o glicerol na proporção (1:1). Os tubos foram mantidos em freezer a -18 °C. A levedura foi também conservada em tubos com PDA inclinado com camada de óleo mineral

sob refrigeração. Foram realizados repiques semanais em placas de Petri contendo meio PDA incubando-se a 27 °C por 3 a 5 dias; sendo as placas armazenadas sob refrigeração por até uma semana após a incubação.

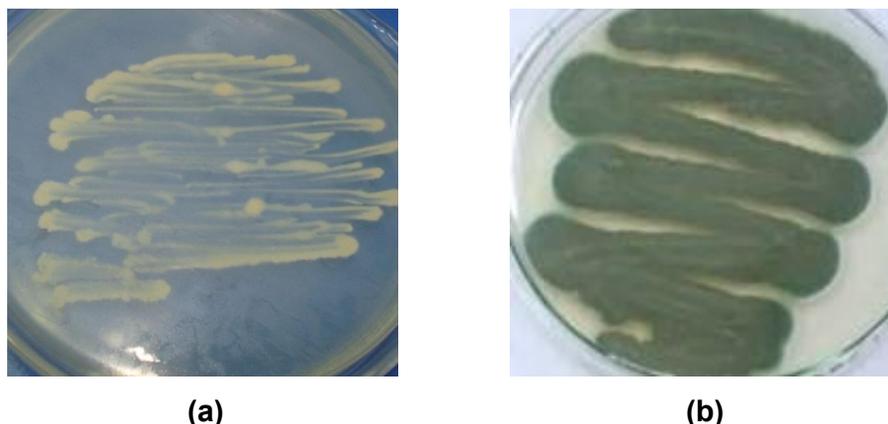


Figura 5. Aspecto da levedura *Sporidiobolus pararoseus* (a) e do fungo *Penicillium crustosum* (b) semeados em meio PDA.

Fungo Filamentoso *Penicillium crustosum*

O fungo filamentoso *Penicillium crustosum* (Figura 5b) foi isolado previamente por Griebeler *et al.* (2009). Este fungo foi selecionado como bom produtor de lipases utilizando-se metodologias de seleção em meios sólido de produção (Freire *et al.*, 1997).

Manutenção da cepa

A cepa isolada foi crescida em meio PDA durante sete dias a 27 °C e então as colônias foram raspadas usando alça de platina e adicionadas em tubos com solução aquosa estéril contendo glicerol na proporção (1:1), Tween 80 (0,1% v/v) e NaCl (0,9% m/v). A solução contendo os esporos foi transferida para criotubos de 1,5 mL estéreis e conservada a -18 °C.

O fungo filamentoso também foi conservado em tubos com PDA inclinado com camada de óleo mineral sob refrigeração. Foram realizados repiques semanais em placas de Petri contendo meio PDA incubando-se a 27

°C por 7 dias; sendo as placas armazenadas sob refrigeração por até uma semana após a incubação.

3.1.2. Inóculo e substrato

Levedura *Sporidiobolus pararoseus*

Utilizou-se o meio PC para a produção do inóculo. Inicialmente preparou-se o pré-inóculo adicionando o micro-organismo das placas em tubos de ensaio com tampa contendo 10 mL de meio PC previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. A mistura foi incubada a 27 °C por 24 horas.

O inóculo foi preparado pela adição do pré-inóculo em erlenmeyer de 250 mL, tampado com bucha de algodão contendo 90 mL de meio PC previamente esterilizado. Os frascos foram incubados em agitador orbital (Marconi MA410) a 30 °C e 150 rpm por 24 horas. Esse caldo (inóculo) foi utilizado para a inoculação do meio fermentativo sólido, bem como para o ajuste de umidade (concentração média de 0,3 g/L de massa celular seca).

Fungo filamentososo *Penicillium crustosum*

O meio para produção do inóculo do fungo constituiu de frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio (PDA). O meio esterilizado foi inoculado com 0,5 mL de suspensão de esporos obtida a partir de estoques, sendo então incubado por 7 dias a 27 °C. A coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 10 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1% v/v) e pérolas de vidro estéreis ao frasco para uma melhor remoção dos mesmos.

A suspensão resultante foi armazenada a 4 °C até sua utilização, por um tempo máximo de 15 dias. Para contagem dos esporos, 1 mL da suspensão era retirado assepticamente e diluído de 10 a 1000 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1% v/v). A suspensão resultante era então transferida para câmara de Neubauer (Prolab) para contagem dos esporos. A

concentração da suspensão foi ajustada em $1,0 \times 10^8$ esporos/g de substrato seco (Rigo *et al.*, 2010).

Substrato

O substrato utilizado como suporte no processo fermentativo com os micro-organismos *Penicillium crustosum* e *Sporidiobolus pararoseus*, para a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foi o farelo de soja. Este consiste em um resíduo da extração do óleo de soja, obtido após a prensagem de grãos e extração com solventes, oriundo de uma indústria de óleo de soja local (Olfar, Erechim, RS). O substrato foi estocado a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e foi utilizado como recebido, sem tratamento prévio.

3.1.3. Fermentação em Estado Sólido (FES)

Para a produção de lipase de *Sporidiobolus pararoseus* foram utilizados béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10 g de farelo de soja seco e umidade ajustada para 60% em forma de inóculo. Após esterilização ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min) os béqueres foram inoculados e incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410) à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas de fermentação (Ferraz *et al.*, 2012).

O mesmo procedimento foi seguido para a produção de lipase de *Penicillium crustosum* sendo que a umidade foi ajustada, com água destilada, para 55%, a temperatura de incubação foi de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o tempo de fermentação de 48 horas, conforme estabelecido por Vargas *et al.* (2008).

3.1.4. Processo de Extração da Enzima

O processo de extração foi realizado em erlenmeyers de 250 mL, onde ao meio fermentado era adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na razão 1:4 (10 g de farelo fermentado para 40 mL de tampão). Estes frascos foram incubados por 30 min a 35 °C e 150 rpm em agitador orbital. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se tecido de nylon e pressão manual obtendo-se o extrato enzimático bruto (Vargas *et al.*, 2008; Freire *et al.*, 1997).

3.1.5. Liofilização

A determinação da atividade de esterificação deve ocorrer em sistema com baixo conteúdo de umidade. Assim, foi necessário realizar a desidratação do extrato aquoso obtido após o processo de extração da enzima da matriz sólida. Para tanto, foi empregado o processo de liofilização.

Os extratos foram dispostos em camadas de um centímetro de espessura em placas de Petri e então submetidas ao congelamento a -80 °C por no mínimo 24 h, como fase preparatória do procedimento de liofilização (Persson *et al.*, 2002). As amostras foram então levadas ao liofilizador, por cerca 48 horas, onde através do processo de sublimação em condições de vácuo, a água livre presente no congelado foi removida.

3.2. Concentração do Extrato Enzimático Bruto das Lipases Produzidas

O ensaio de precipitação foi realizado com a adição de 150 mL do extrato enzimático bruto em um béquer de 500 mL onde foi acrescentado o sulfato de amônio (Vetec) até a concentração desejada da condição de saturação (Tabela 5). O béquer contendo a mistura foi mantido a 4 °C em banho de gelo, com agitação constante, controlando-se o pH em 7,0 com

adição de NaOH 20%, de acordo com metodologia adaptada por Menoncin *et al.* (2009).

O extrato enzimático acrescido do sal foi transferido para tubos de centrífuga e mantido a -10 °C para precipitação das proteínas, este procedimento foi realizado por um período que variou de 5 a 13 h de acordo com o planejamento de experimentos descrito na Tabela 5. Após, o mesmo foi centrifugado (4 °C; 5400xg durante 30 minutos), para promover a separação da fração proteica. O sobrenadante foi descartado e o precipitado removido com 5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Menoncin *et al.*, 2009).

As amostras foram então congeladas a -80 °C e liofilizadas por 48 horas para posterior medição da atividade enzimática de esterificação.

A Tabela 5 demonstra as variáveis e níveis estudados no planejamento de experimentos para a análise da porcentagem de saturação, aplicadas no processo de precipitação das enzimas obtidas.

Tabela 5. Variáveis e níveis estudados no planejamento DCCR para o processo de precipitação da lipase.

	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
% saturação	32	40	60	80	88
Tempo (h)	5	6	9	12	13

3.3. Lipase Comercial

A enzima comercial empregada neste estudo foi a lipase Tipo II em estado bruto obtida de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich), também conhecida como triacilglicerol acilhidrolase, com aspecto físico na forma de pó liofilizado, na cor amarelo claro, pH ótimo na faixa de 6,5 a 7,5 e com característica de hidrossolubilidade moderadamente solúvel.

3.4. Imobilização de Enzimas: métodos e suportes

Os extratos enzimáticos brutos e precipitados obtidos da levedura e do fungo filamentosos foram imobilizados em alginato de sódio com carvão ativado conforme metodologia de Risso (2004), com algumas modificações e posteriormente em argila Poço A (Coghetto *et al.*, 2012). O mesmo procedimento foi adotado para a lipase comercial de pâncreas suíno, igualmente, imobilizada nos dois suportes.

3.4.1. Imobilização em Alginato de Sódio com Carvão Ativado

Após a obtenção das enzimas foi preparada uma mistura contendo solução de gel com a solução enzimática (3g de extrato enzimático liofilizado em 5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0). Para o preparo da solução de gel foi adicionado 10 g de água destilada e 0,26 g de alginato de sódio, os quais foram aquecidos para a dissolução total do alginato. Em seguida 6,5 g de sacarose foram adicionadas à solução.

Depois da dissolução do alginato de sódio e do resfriamento da solução de gel, foi adicionado 3 mL da solução enzimática com a atividade pré-estabelecida, 0,65 mL de glutaraldeído e 0,39 g de carvão ativado (Risso, 2004).

Para a formação das esferas, foi utilizado a bomba peristáltica modelo 7518-10, marca Masterflex L/S (Figura 6), para fazer o bombeamento da mistura sobre uma solução de cloreto de cálcio 0,2 M em tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 com 3,5% de glutaraldeído a 10 °C, sob agitação (Risso, 2004).



Figura 6. Aparato experimental utilizado no processo de imobilização.

As enzimas imobilizadas e em solução, foram deixadas em descanso na geladeira por 24 horas. A seguir, lavadas com água destilada, e a sua última lavagem foi realizada em tampão acetato 0,1 M a pH 4,8.

Com o objetivo de manter a estrutura das enzimas, as esferas foram imersas em solução de cloreto de cálcio 0,05 M e tampão acetato 0,1 M a pH 4,8.

3.4.2. Imobilização em Argila Poço A

O outro suporte testado foi o suporte inorgânico montmorillonita natural poço A, fornecida por Colorminas Colorifício e Mineração S/A.

O processo de imobilização foi realizado conforme pesquisa realizada por Coghetto *et al.* (2012): 2 g do suporte - argila montmorillonita Poço A, com adição de 60 mL de uma solução contendo o extrato enzimático e tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8, em uma diluição extrato enzimático/tampão (3:10). Esta solução foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 4 °C (banho de gelo), por um tempo reacional de 10 minutos. Após o término do

processo de adsorção, a solução foi filtrada a vácuo, permanecendo posteriormente 48 horas em dessecador.

3.5. Determinação da Atividade Enzimática de Síntese

A atividade de esterificação das lipases nas diferentes formas de apresentação foi quantificada através da reação de síntese do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) (Langone *et al.*, 2002; Bernardes *et al.*, 2007). A reação foi conduzida a 40 °C, 160 rpm por 40 min. Esta foi iniciada pela adição da enzima (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa, mantidos em agitador orbital. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata no início da reação (branco) e tituladas. Após transcorrido o tempo de reação (40 min), alíquotas de 500 µL foram retiradas em triplicata e tituladas. A cada amostra foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido oleico.

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação (até pH 11) com NaOH 0,02 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação 1.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \cdot M_{EL} \times V_c}$$

Equação 1

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40min (mL);

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

V_f = volume final de meio reacional (mL);

t = tempo (min);

M_{EL} = massa da preparação enzimática liofilizada utilizada na reação (g);

V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

3.6. Aplicação de Lipases na Catálise de Reações de Interesse

Nesta etapa são apresentadas as metodologias e equipamentos empregados nos testes relativos à aplicação das lipases na catálise em reações de interesse.

3.6.1. Transesterificação Enzimática de Óleos Vegetais em Meio Orgânico

Para a produção de ésteres etílicos usando solvente orgânico, pesou-se 0,2315 g (20% (p/p)) de ambas as enzimas não-comerciais, de *Penicillium crustosum* e de *Sporidiobolus pararoseus*, nas diferentes formas de obtenção: EEB, EEBI, EEP, EEPI e a enzima comercial de pâncreas suíno livre (ECL) e imobilizada (ECI), e adicionou-se à mistura de 1 g de óleo comercial SOYA, 0,1579 g de etanol MERCK (99,9% de pureza) na razão molar 1:3 e 40 mL de n-hexano MERCK (solvente com 99,9% de pureza), em erlermeyers de 250 mL, fechados com tampa de vidro. Os mesmos foram incubados em agitador rotativo (shaker) a 200 rpm à temperatura de 40 °C por 8 horas.

As condições experimentais apresentadas foram otimizadas em trabalhos anteriores do grupo (Faccio, 2004). Decorrido o tempo de reação, as amostras foram filtradas com n-hexano, objetivando a retenção da enzima, e o meio reacional levado à evaporação do solvente em estufa à temperatura de \pm 60 °C, até peso constante. As amostras foram mantidas sob refrigeração para posterior injeção em cromatógrafo gasoso, conforme descrito no item 3.6.4.

3.6.2. Esterificação Enzimática de Ácido Oleico em Sistema Livre de Solvente

Para as reações de esterificação enzimática para a produção de etil oleato, livre de solvente orgânico, pesou-se (20 %(p/p) em relação aos substratos) de ambas as enzimas não-comerciais, de *Penicillium crustosum* e de *Sporidiobolus pararoseus*, nas diferentes formas de obtenção: EEB, EEBI, EEP, EEPI, e a enzima comercial de pâncreas suíno livre (ECL) e imobilizada (ECI), e adicionou-se ácido oleico SIGMA-ALDRICH e etanol MERCK (99,9% de pureza) na razão molar de 1:3, em erlemeyers de 250 mL, fechados com tampa de vidro. Os mesmos foram incubados em agitador rotativo (shaker) à 200 rpm à temperatura de 40 °C por 8 horas (Zinevicz, 2011). Decorrido o tempo de reação, as amostras foram filtradas com n-hexano, e o meio reacional levado à evaporação do solvente em estufa à temperatura de \pm 60 °C, até peso constante. As amostras foram mantidas sob refrigeração para posterior preparo e injeção em cromatógrafo gasoso, conforme descrito no item 3.6.4.

3.6.3. Esterificação Enzimática de Geraniol e Ácido Propiônico

A esterificação enzimática para a produção de geranil propionato foi realizada conforme condições otimizadas em trabalho anterior (Paroul, 2011), onde misturou-se álcool (geraniol, 99% de pureza, da VETEC) e ácido (propiônico, 99% de pureza, QUIMEX) na proporção molar de 3:1. Esses substratos foram adicionados em erlemeyers de 50 mL com volume médio racional de 5 mL.

Pesou-se 0,5 g (10%(p/p) em relação aos substratos) de ambas as enzimas obtidas nas suas diferentes formas de apresentação, adicionou-se ao meio reacional e o tempo de reação foi fixado em 6 horas.

Todos os experimentos foram realizados em shaker com agitação constante de 150 rpm e temperatura de 40 °C. Após o término da reação, o

biocatalisador foi filtrado em papel filtro. Todas as amostras foram mantidas na geladeira, para posterior diluição e transferência para os vials, dando sequência a análise em cromatógrafo gasoso, conforme descrito a seguir.

3.6.4. Preparo das Amostras e Determinação da Conversão das Reações

Produção de biodiesel e etil oleato

Foram coletadas 0,250 g de amostra reacional em balão volumétrico de 10 mL, completando o volume de diluição com n-heptano, (amostra). Retirava-se uma alíquota de 50 μ L da solução da amostra para um balão de 1 mL, no mesmo adicionava-se uma solução de 50 μ L de padrão interno (heptadecanoato de metila) na concentração de 5000 mg/L, completando o mesmo com n-heptano. A amostra era agitada e uma alíquota (cerca de 1 mL) transferida para os vials, dando sequência à análise cromatográfica (Zinevicz, 2011).

As amostras foram injetadas em triplicata em um cromatógrafo gasoso (Figura 7) conforme EN14103 (2001), com detector de ionização de chama (CG/FID Shimadzu modelo 2010) equipado com uma coluna capilar apolar modelo RT-WAX (contendo polietileno glicol na fase estacionária), de 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e com as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 150 °C, permanecendo por 1 minuto nesta condição, taxa de aquecimento de 10 °C/min até atingir a temperatura final a coluna de 250 °C, permanecendo por 1 minuto nesta condição. A temperatura do injetor e do detector foi estabelecida em 250 °C. A quantidade da solução de amostra injetada foi de 1 μ L.



Figura 7. Cromatógrafo gasoso utilizado para determinação das conversões em ésteres.

A Equação 2 apresenta a expressão utilizada para o cálculo da conversão em ésteres etílicos de óleo de soja e em etil oleato:

$$C = \frac{(\Sigma A) - A_{ei}}{A_{ei}} \times \frac{C_{ei} \times V_{ei}}{W} \times 100$$

Equação 2

Onde:

ΣA = área total de picos entre os padrões C14 e C24: 1;

A_{ei} = é a área correspondente ao pico do padrão interno, C17: 0;

C_{ei} = é a concentração, em mg/mL, da solução de padrão interno, C17:0;

V_{ei} = é o volume da solução de padrão interna adicionada a amostra;

W = é a massa, em mg, da amostra.

Produção de geranyl propionato

Para a quantificação dos ésteres, os meios reacionais obtidos foram injetados em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (GC/FID Shimadzu modelo 2010), equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar modelo RT-WAX de 30m de

comprimento, diâmetro interno de 0,25mm e com a seguinte programação: temperatura inicial da coluna de 40 °C (permanecendo por 8 minutos nesta condição), 220°C (7 °C/min), 250°C (10 °C/min, por 10 minutos), temperatura do injetor 250 °C, detector a 275 °C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H₂ (56 kPa) e amostra diluída em n-hexano (1:10). A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução da área do agente limitante.

3.7. Estudo da Produção de Geranil Propionato

Após os testes preliminares, optou-se por dar continuidade ao estudo de produção do geranil propionato a partir do extrato enzimático imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado do fungo filamentoso *Penicillium crustosum*.

A técnica de planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que permite determinar os fatores que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar as possíveis inter-relações entre as variáveis de um processo. Além disso, permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de maximizar ou minimizar uma determinada resposta (Rodrigues *et al.*, 2005).

3.7.1. Efeito da Temperatura e Concentração de Enzima

Os ensaios foram conduzidos com base em um planejamento fatorial 2², o qual buscou investigar as variáveis de forma a verificar os efeitos destas sobre o processo.

A Tabela 6 apresenta as variáveis e a faixa de estudo para o delineamento experimental realizado nesta etapa. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata, a resposta avaliada foi à conversão em geranil propionato e os resultados foram tratados por meio do software Statistica.

Tabela 6. Variáveis e níveis dos fatores investigados no planejamento experimental.

Variável	Níveis		
	-1	0	1
[] Enzima %	10	30	50
Temperatura (C°)	40	50	60

3.7.2. Efeito da Razão Molar Geraniol:Ácido Propiônico na Cinética de Esterificação Enzimática

A partir da análise dos resultados do planejamento experimental, novos testes reacionais foram realizados, fixando a temperatura em 60°C, em acordo com a melhor conversão verificada (ensaio 4 Tabela 13), e variando apenas a concentração de enzima em 60 e 70% (m/m substratos).

Na sequência do presente trabalho, novos experimentos foram conduzidos para o estudo cinético do efeito da razão molar geraniol:ácido propiônico para dois pontos do planejamento experimental desenvolvido (ensaios 2 e 4, Tabela 13). Os ensaios adotados para este estudo apresentaram níveis extremos em conversão, sendo que nos dois casos foram usados 50% de extrato enzimático (m/m substratos), a agitação foi de 150 rpm e o tempo foi de 6 horas de reação, justificando assim, a necessidade do estudo cinético, a fim de esclarecer as diferentes conversões obtidas.

As razões molares, concentração da enzima [E] (%) (m/m substratos) e temperaturas utilizadas nesta etapa, são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de geraniol propionato.

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (álcool/ácido)
40	50	1:1; 3:1; 5:1
60	50	1:1; 3:1; 5:1

3.7.3. Avaliação do Reuso do Extrato Enzimático não Comercial de *Penicillium crustosum* Imobilizado

Após estabelecidas as condições de maximização da produção de geranil propionato, o estudo do reuso do extrato enzimático não comercial imobilizado foi realizado. Os testes preliminares realizados para determinar como seria feito a lavagem do imobilizado foram conduzidos com etanol, hexano e tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 e avaliados em termos de atividade de síntese.

Na sequência, prosseguiu-se com os experimentos para estudo do reuso do imobilizado em questão, em termos de atividade de síntese e conversão em geranil propionato.

Todas as determinações foram realizadas sobre a mesma amostra de extrato enzimático imobilizado de *Penicillium crustosum*, em *shaker* com agitação constante de 150 rpm, temperatura de 40 °C, razão molar de 5:1 e 50% (m/m) de enzima. Os experimentos foram conduzidos por um tempo de 50 minutos. Após o término da reação, as enzimas foram recuperadas, por no mínimo 24 horas, para serem reutilizadas em nova batelada.

3.8. Caracterização Parcial do Catalisador Empregado

A análise textural do extrato enzimático de *P. crustosum* imobilizado em alginato com carvão ativado empregado como catalisador no estudo da maximização da produção de geranil propionato foi realizada a partir das isotermas e adsorção/dessorção de N₂. As medidas foram realizadas para a determinação das áreas superficiais, volume total de poros, volume de microporos e diâmetro médio de poros e distribuição de tamanhos de poros e os resultados foram comparados com a enzima comercial Novozym 435.

Foi empregado o equipamento AUTOSORB-1 da Quantachrome (Nova-2200e). Antes da análise, as amostras foram tratadas a vácuo, a uma temperatura de 100 °C para garantir a secagem completa. As medidas foram

realizadas na temperatura do N₂ líquido (-196 °C). Os parâmetros texturais foram determinados a partir das isotermas obtidas. A área superficial específica foi determinada pelo método BET e para o diâmetro médio dos poros utilizou o método BJH (Barret, Joynere, Halenda) na faixa da adsorção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo referente aos extratos enzimáticos não comerciais de *Sporidiobolus pararoseus* e de *Penicillium crustosum* e a enzima comercial de pâncreas suíno, em termos de atividade de esterificação, em diferentes formas de obtenção. Os resultados e discussões relativos à produção enzimática de ésteres etílicos, etil oleato e geranil propionato, aplicando as lipases obtidas em diferentes formas e a maximização de produção de geranil propionato também serão apresentados.

4.1. Concentração dos Extratos Enzimáticos Brutos

A técnica de precipitação com sais é considerada uma ferramenta importante para concentração de proteínas. O processo de concentração promove a separação das proteínas da maioria dos demais compostos do meio, facilitando os processos subsequentes (Martins, 2008). A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas proteicas se agregam, e precipitam (Borzani *et al.*, 2001).

A precipitação de proteínas pela adição de sais baseia-se na diminuição da sua solubilidade em altas concentrações de sal. O sulfato de amônio é o sal mais utilizado, por ser inofensivo para a enzima (é usualmente empregado na conservação de enzimas) e bastante solúvel, o que proporciona forças iônicas suficientemente elevadas para precipitar quase todas as proteínas presentes no meio (Illanes, 2008).

Para o estudo da precipitação, fermentações foram conduzidas para obtenção dos extratos enzimáticos conforme condições já estabelecidas em

trabalho anterior para a levedura (Ferraz *et al.*, 2012) e para o fungo filamentoso (Vargas *et al.*, 2008).

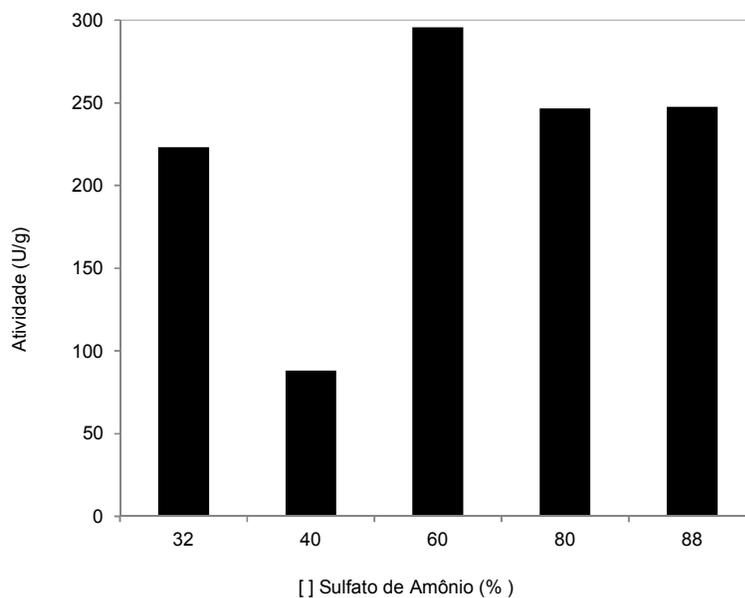
A concentração foi então realizada com os extratos brutos provenientes dos micro-organismos avaliados (a levedura *Sporidiobolus pararoseus* e o fungo filamentoso *Penicillium crustosum*), utilizando o sulfato de amônio como sal para conduzir a precipitação das proteínas, segundo planejamento de experimentos.

As atividades de esterificação dos extratos enzimáticos brutos (EEB) inicialmente obtidos foram 290,63 U/g para a levedura e 202,67 U/g para o fungo. Posteriormente à medida de atividade do extrato bruto, partiu-se para o estudo da concentração de proteínas dos mesmos. A Figura 8 (a e b) demonstra os níveis de saturação dos extratos enzimáticos (levedura e fungo, respectivamente) com sulfato de amônio, estudados no presente trabalho e as respectivas atividades de esterificação para 48 horas de fermentação.

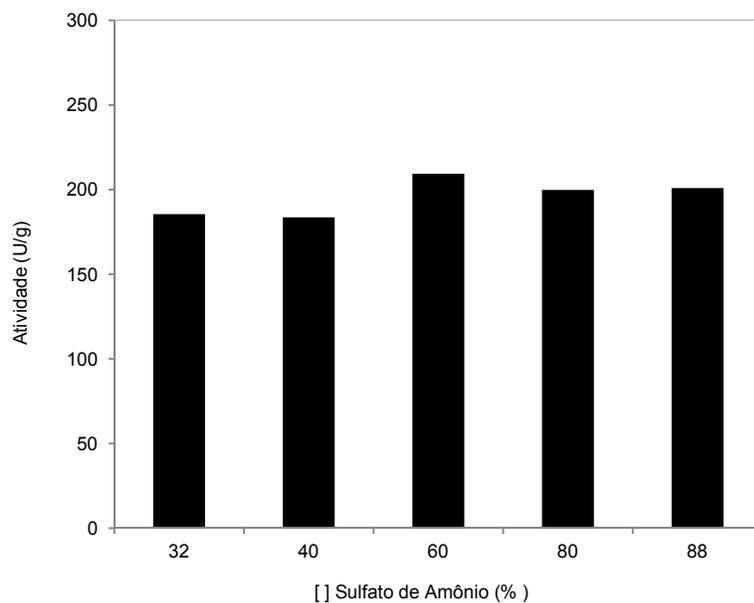
Através da Figura 8 observa-se que para os extratos enzimáticos obtidos por meio de FES a partir da levedura *Sporidiobolus pararoseus* (Figura 8 a) e para o fungo *Penicillium crustosum* (Figura 8 b), utilizando farelo de soja como substrato, as mais altas atividades de esterificação dos extratos precipitados foram de 295,67 e 209,28 U/g, para a levedura e para o fungo, respectivamente, quando se realizou a precipitação da proteína com 60% de saturação com sulfato de amônio e mantido 9 horas de repouso em tubos de centrífuga a -10 °C para precipitação das proteínas.

A faixa de concentração de 60-70% de saturação foi descrita como adequada para precipitação de enzimas produzidas com diferentes micro-organismos e substratos (Silva *et al.*, 2011b).

Silva *et al.* (2011b) encontraram para o extrato concentrado, com 60 % de saturação com sulfato de amônio, obtido a partir da FES de *P. brevicompactum* em farelo de mamona, atividade de esterificação de 111,30 U/g, na condição de 70% de umidade, meio suplementado com 2% de óleo de soja a 30 °C e 96 h de fermentação.



(a)



(b)

Figura 8. Comportamento dos extratos enzimáticos obtidos a partir da levedura *Sporidiobolus pararoseus* (a) e do fungo *Penicillium crustosum* (b) em termos de atividade de esterificação em relação à concentração de sulfato de amônio utilizado para a precipitação.

De acordo com estudos apresentados por Silva (2010), a precipitação de lipases com sulfato de amônio em distintas concentrações varia de acordo com as referidas pesquisas. As concentrações indicadas variam de 80 a 20% de saturação do sal. Para lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Aspergillus niger*, foi usada a concentração de sulfato de amônio de 80% de saturação. Algumas lipases foram ainda precipitadas com 70% de saturação, como a de *Antrodia cinnamomea* e *Bacillus sp.* RSJ-1; 60% a de *Bacillus coagulans* MTCC-6375; 40% para a de *Clostridium tetanomorphum* e 20% a proveniente de *Favobacterium odoratum*.

Observa-se, portanto, que há uma diferença entre as atividades encontradas na literatura, variando de acordo com a condição experimental e o micro-organismo utilizado, o que justifica o confronto criterioso que deve ser realizado entre os resultados obtidos neste trabalho e os citados na literatura.

Como qualquer método de precipitação, a adição de sais como o sulfato de amônio não é muito seletiva e geralmente a preparação final não apresenta pureza elevada, o que limita o uso desse método (Bon *et al.*, 2008). É, contudo, útil como uma etapa inicial de concentração, já que a proteína precipitada pode ser prontamente dissolvida em uma pequena quantidade de água (Smaniotto, 2010).

A partir da escolha do melhor nível de precipitação com sulfato de amônio, 60% de saturação, partiu-se para a imobilização dos extratos obtidos de ambos os micro-organismos brutos e precipitados. As enzimas produzidas foram então avaliadas em termos de atividade de esterificação, nas diferentes formas de obtenção, de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.

4.2. Técnicas de Imobilização

A fim de obter as lipases em diferentes formas e avaliar os diferentes suportes, para posterior estudo da aplicação, os extratos enzimáticos brutos e precipitados produzidos em FES a partir da levedura e do fungo filamentosos foram imobilizados em alginato de sódio com carvão ativado e em suporte

inorgânico Poço A. A lipase comercial foi também imobilizada em ambos os suportes.

4.2.1. Imobilização em Alginato de Sódio com Carvão Ativado

Os extratos enzimáticos das lipases de *Sporidiobolus pararoseus* e *Penicillium crustosum* (Figura 9) foram submetidos ao processo de imobilização utilizando carvão ativado e alginato de sódio como suporte, conforme já descrição no capítulo anterior. A lipase comercial de pâncreas suíno também foi imobilizada com o mesmo suporte e avaliada em termos de atividade de síntese, não apresentando atividade significativa (Tabela 7), quando comparada às atividades de síntese dos extratos microbianos.

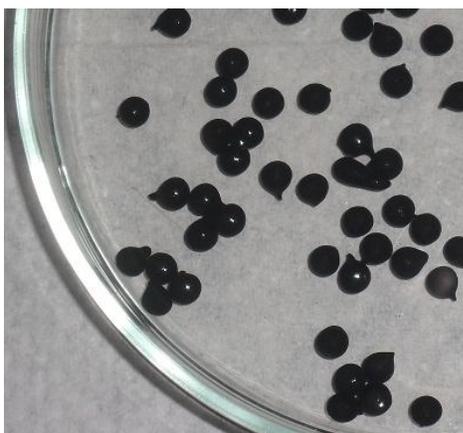


Figura 9. Aspecto do extrato enzimático do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.

A Tabela 8 demonstra os resultados obtidos, em termos de atividade de síntese para extratos enzimáticos brutos e precipitados obtidos a partir de *Sporidiobolus pararoseus* e *Penicillium crustosum* antes e depois da imobilização.

Tabela 8. Atividade de síntese (U/g) dos extratos enzimáticos brutos e precipitados antes e depois da imobilização em alginato de sódio com carvão ativado.

Micro-organismo	Atividade de síntese (U/g)			
	EEB ¹	EEBI ³	EEP ²	EEPI ⁴
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	290,63	209,46	295,67	203,03
<i>Penicillium crustosum</i>	202,67	240,59	209,28	228,76
			ECL	ECl
Lipase comercial			124,19	154,46

EEB¹ – extrato enzimático bruto, EEP² – extrato enzimático precipitado, EEBI - extrato enzimático bruto imobilizado, EEPI- extrato enzimático precipitado imobilizado, ECL – enzima comercial livre, ECl – enzima comercial imobilizada

Ao avaliar a Tabela 8 é possível observar que para os extratos provenientes da levedura, as atividades lipásicas para EEBI e EEPI tiveram um decréscimo, comparadas as atividades do EEB. Isto provavelmente se deve a pouca afinidade da enzima por este suporte tanto na forma bruta quanto na forma precipitada com sulfato de amônio.

Já os extratos provenientes do fungo *Penicillium c.* apresentaram um acréscimo nas suas atividades lipásicas, para EEBI e EEPI, quando comparadas ao EEB, sendo ainda que a melhor atividade obtida foi para EEBI, demonstrando que a técnica de concentração de proteínas neste caso não apresentou efeito significativo para a imobilização da enzima.

De acordo com alguns relatos encontrados na literatura (Bryjak *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 1997) imobilização é um método de fixação ou encapsulação de uma enzima, que possibilita diversas aplicações deste catalisador com manutenção da atividade catalítica. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante um processo, em comparação à sua forma livre. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, nem modificações no sítio ativo. Desta forma, levando em conta as vantagens de imobilizar enzimas para utilização como catalisadores em reações de interesse, os resultados obtidos neste, em termos de atividade de esterificação para EEBI e EEPI (Tabela 8) podem ser considerados satisfatórios, pois o carvão ativado

tem baixo custo, despertando assim, um aumento no interesse quanto ao uso deste suporte na imobilização de enzimas como as lipases (Kaewthong *et al.*, 2005).

O processo de imobilização pode ser influenciado pelo pH do meio e o tampão utilizado (Rocha *et al.*, 2006; Kaewthong *et al.*, 2005). Sendo assim, para que não ocorresse nenhum tipo de interferência devido ao tampão utilizado e o pH do mesmo no processo de imobilização, fez-se uso somente do tampão acetato 0,1 M a pH 4,8.

O suporte pode conferir uma maior estabilidade térmica e aumentar o tempo de uso das enzimas em reações de biocatálise (Mendes *et al.*, 2011). Por outro lado, de acordo com Foresti e Ferreira (2005), a imobilização de lipases pode conduzir a uma diminuição na sua estabilidade (se o suporte interagir negativamente com a proteína), e também reduzir a atividade catalítica se a conformação da enzima for alterada durante o processo de imobilização, ou seja, alguns dos aminoácidos do centro ativo se envolvem nos laços estabelecidos com o suporte.

Segundo estudos da literatura (Betancor *et al.*, 2006), o controle de suportes ativado com glutaraldeído é muito importante, pois os monômeros e os dímeros presentes no glutaraldeído apresentam reatividade diferente: enquanto o dímero imobiliza rapidamente proteínas por ligação covalente, o monômero diminui a taxa de imobilização. Isto ocorre devido à presença de compostos iônicos (grupos amins), que promovem uma troca iônica com o suporte, alterando a força iônica durante a imobilização e alterando a região (sítio ativo) onde a enzima faz interação com o suporte.

4.2.2. Imobilização em Argila Poço A

Os extratos enzimáticos microbianos, bem como a lipase comercial de pâncrea suíno (Figura 10) foram também submetidos ao processo de imobilização em argila Poço A, conforme descrito no item 3.4.2. A avaliação foi realizada em termos de atividade de síntese para posterior aplicação dos

resultados mais relevantes, em termos de fonte de enzima e suporte, na catálise de diferentes reações.



Figura 10. Aspecto da enzima comercial de pâncreas suíno immobilizada em argila Poço A.

Os resultados em termos de atividade síntese dos extratos lipolíticos obtidos por micro-organismo e lipase comercial livre (ECL) antes do processo de imobilização e do extrato comercial imobilizado (ECI) são demonstrados na Tabela 9. Para os extratos microbianos as atividades observadas foram muito inferiores aos encontrados anteriormente quando imobilizadas em alginato com carvão, sendo que o fungo filamentososo apresentou as mais altas atividades (para EEBI, 169,42 U/g e para EEPI, 179,26 U/g).

Tabela 9. Atividade de síntese (U/g) dos extratos enzimáticos brutos e precipitados antes e depois da imobilização em Poço A

Micro-organismo	Atividade de síntese (U/g)			
	EEB ¹	EEBI ³	EEP ²	EEPI ⁴
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	290,63	124,75	295,67	137,08
<i>Penicillium crustosum</i>	202,67	169,42	209,28	179,26
			ECL ⁵	ECI ⁶
Lipase comercial			341,18	443,57

EEB¹ – extrato enzimático bruto, EEP² – extrato enzimático precipitado, EEBI - extrato enzimático bruto imobilizado, EEPI- extrato enzimático precipitado imobilizado, ECL – enzima comercial livre, ECI – enzima comercial imobilizada.

Ao avaliar a Tabela 9 observa-se que a atividade lipásica da enzima comercial após o processo de imobilização teve um acréscimo, o que pode ser considerado promissor em se tratando de imobilização. Este resultado pode estar provavelmente relacionado à área superficial deste suporte e interação com a enzima comercial, conduzindo à maior acessibilidade dos substratos ao sítio ativo da enzima, levando assim a maiores atividades enzimáticas (Scherer, 2010).

De acordo com estudos, algumas argilas têm um enorme potencial para serem utilizadas como adsorvente, devido ao seu baixo custo, uma vez que as mesmas estão disponíveis naturalmente e possui uma elevada área superficial (Yesiloglu e Yesim, 2005). De um modo geral, as enzimas imobilizadas em suportes inorgânicos são mais estáveis do que as imobilizadas em suporte orgânico (Chibata, 1978).

No estudo de Scherer (2010), utilizando diferentes suportes inorgânicos para imobilização de lipase de pâncreas suino, foi observado que o processo de imobilização demonstrou-se mais eficiente para as argilas KSF, Poço A e K-10, com rendimentos de imobilização superiores e próximos a 50% em relação à quantidade de enzima utilizada no início do processo. Segundo o autor, isto provavelmente se deve à maior afinidade da enzima por estes suportes.

Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens e as razões para a escolha de um derivado imobilizado variam de aplicação para aplicação, incluindo: utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros; facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja batelada, ou ajuste do tempo de residência se é usado um reator contínuo (Mendes *et al.*, 2011).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário

escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (Mendes *et al.*, 2011).

4.3. Aplicações das Lipases como Catalisadores de Reações de Interesse

Nesta etapa são apresentados e discutidos os resultados referentes à consecução de reações de interesse através da aplicação dos extratos enzimáticos não-comerciais, de *Penicillium crustosum* e de *Sporidiobolus pararoseus*, nas suas diferentes formas de obtenção: EEB, EEBI, EEP, EEPI; e a enzima comercial de pâncreas suíno livre (ECL) e imobilizada (ECI).

4.3.1. Transesterificação Enzimática de Óleos Vegetais em Meio Orgânico

Com o intuito de explorar o potencial de aplicação de lipases microbianas e da lipase de pâncreas suíno como catalisadores de reações de transesterificação enzimática para produção de biodiesel, nesta etapa serão apresentados e discutidos os resultados de conversão em biodiesel em solvente orgânico (n-hexano).

Os resultados obtidos para a produção de ésteres etílicos, utilizando diferentes lipases como catalisadores, são apresentados na Tabela 10 (a, b e c, utilizando os extratos de *Sporidiobolus pararoseus*, *Penicillium crustosum* e da lipase comercial de pâncreas suíno, respectivamente em suas diferentes formas de apresentação).

Tabela 10. Conversões em ésteres etílicos utilizando os extratos em diferentes formas de obtenção de *Sporidiobolus pararoseus* (a), de *Penicillium crustosum* (b) e da lipase comercial de pâncreas suíno (c).

<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Extrato enzimático bruto (EEB)	290,63	0,18
Extrato enzimático precipitado (EEP)	295,67	0,15
Extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI)	209,46	0,21
Extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI)	203,03	0,74

(a)

<i>Penicillium crustosum</i>	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Extrato enzimático bruto (EEB)	202,67	3,86
Extrato enzimático precipitado (EEP)	209,28	0,64
Extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI)	240,59	4,68
Extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI)	228,76	0

(b)

Lipase comercial de pâncreas suíno	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Enzima comercial livre (ECL)	341,18	1,21
Enzima comercial imobilizada (ECI)	443,57	4,58

(c)

A partir dos resultados da Tabela 10, pode-se observar que a maior conversão em biodiesel foi de 4,68%, obtida com o extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI) de *Penicillium crustosum*, seguida de 4,58%, obtida com ECI de pâncreas suíno. Resultados estes, considerados insatisfatórios, estando de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura, quando utilizado os mesmos substratos e lipases não comerciais.

Silva *et al.* (2007) sugerem que razões molares mais altas de óleo:álcool podem resultar em uma reação de transesterificação mais eficiente, devido talvez ao aumento da área de contato entre o álcool e os triglicerídeos. Zenevich (2011), avaliando a produção de ésteres etílicos, utilizando diferentes lipases como catalisadores em diferentes formas de obtenção, em meio orgânico utilizando a lipase comercial Novozym 435 imobilizada, como catalisador, obteve 22,3% de conversão em biodiesel.

Os mesmos autores, em sequência ao trabalho descrito anteriormente, obtiveram resultados similares de produção de ésteres etílicos em solvente orgânico utilizando lipases não comerciais obtidas por fermentação em estado sólido de *Penicillium brevicompactum* e *Rhizopus* sp. Neste, os extratos enzimáticos em suas diferentes formas de obtenção, conduziram a produções insignificantes de biodiesel, variando numa faixa de 0,1 a 3,7% de conversão. Isto se deve, segundo os autores, ao fato da ausência de possíveis interferentes que se liguem ao sítio ativo da enzima fazendo com que ela perca sua atividade, diminuindo a produção de ésteres.

Predrabon (2011) realizou um estudo testando a alcoólise enzimática de diferentes óleos vegetais utilizando lipase de *Penicillium brevicompactum* fermentada em diferentes misturas de farelos. As maiores conversões foram obtidas na amostra de extrato obtido utilizando a mistura de farelo de arroz e casca de arroz como substratos (2,88%) e na amostra de extrato da mistura farelo de soja mais casca de arroz obteve-se 2,48% de conversão, ambas utilizando óleo de oliva como substrato para a alcoólise.

Os extratos enzimáticos brutos de *Penicillium brevicompactum* obtidos a partir de torta de babaçu e farelo de mamona foram estudados por Silva (2010), como catalisadores para a produção de biodiesel. Conversões de 1,21 e 0,93% em biodiesel foram obtidas, respectivamente para cada extrato testado. Porém, quando os extratos de torta de babaçu (80% de umidade, 72 h) e de farelo de mamona (70% de umidade, 96 h) foram precipitados, conversões de 15,05 e 6,47% foram obtidas, respectivamente.

Melhores resultados foram obtidos, porém, por Chang *et al.* (2005), em estudo de alcoólise enzimática usando Novozym 435 imobilizada como

catalisador, óleo de canola e metanol como substratos e n-hexano como solvente. Os autores verificaram que, entre vários tratamentos, a maior conversão em biodiesel metílico (96,5%) foi obtida após 12 h de reação, 45 °C, 50% de enzima, razão molar metanol:óleo de 4:1. A menor conversão (22,4%) foi obtida após 16 h de reação, 55 °C, 20% de enzima e razão molar entre os substratos de 5:1 com adição de 5% de água.

Rampim (2007), em seu trabalho, verificou que o metanol foi mais conveniente para a conversão das lipases de *Penicillium fluorescens* e *R. miehei*. A lipase de *Penicillium fluorescens* apresentou mais de 90% de conversão para o óleo de girassol enquanto a lipase de *R. miehei* foi capaz de conduzir a 80% de conversão.

De acordo com Silva (2008), apesar de o metanol propiciar melhores rendimentos em condições mais amenas de temperatura, o contexto brasileiro sugere a utilização do etanol, devido à grande capacidade produtora no país e por esse álcool ser obtido de uma fonte renovável de energia.

4.3.2. Esterificação Enzimática de Acido Oleico e Etanol

Nesta etapa serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nas reações de esterificação enzimática para a produção de etil oleato. Realizou-se esta etapa a fim de estudar o comportamento das diferentes enzimas para reações de esterificação, já que as mesmas apresentam atividades significativas.

A Tabela 11 (a, b e c, extratos de *Sporidiobolus pararoseus*, *Penicillium crustosum* e da lipase comercial de pâncreas suíno, respectivamente) apresenta os resultados obtidos para a esterificação enzimática a partir dos extratos nas suas diferentes formas de obtenção.

Pode-se observar que as conversões de etil oleato para a lipase obtida da levedura (Tabela 11 a) nas diferentes formas, sofreram variação entre 24,69 e 42,31%, sendo que a maior conversão apresentada foi para EEBl.

Tabela 11. Esterificação enzimática utilizando os extratos em diferentes formas de obtenção de *Sporidiobolus pararoseus* (a), de *Penicillium crustosum* (b) e da lipase comercial de pâncreas suíno (c).

<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Extrato enzimático bruto (EEB)	290,63	27,24
Extrato enzimático precipitado (EEP)	295,67	24,87
Extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI)	209,46	42,31
Extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI)	203,03	24,69
(a)		
<i>Penicillium crustosum</i>	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Extrato enzimático bruto (EEB)	202,67	56,44
Extrato enzimático precipitado (EEP)	209,28	52,41
Extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI)	240,59	64,48
Extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI)	228,76	57,86
(b)		
Lipase comercial de pâncreas suíno	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Enzima comercial livre (ECL)	341,18	54,72
Enzima comercial imobilizada (ECI)	443,57	57,75
(c)		

Para os extratos enzimáticos obtidos a partir do fungo (Tabela 11 b) e da lipase comercial (Tabela 11 c), maiores conversões foram encontradas, quando em comparação com os extratos provenientes da levedura sendo que, a maior conversão obtida foi de 64,48% para extrato enzimático bruto imobilizado oriundo de *Penicillium crustosum*. Isso se deve, provavelmente devido à especificidade da enzima pelos substratos.

Tendo em vista que, as maiores conversões apresentadas para as duas diferentes reações (transesterificação enzimática e esterificação enzimática) foram para extratos imobilizados, ressaltamos a importância da imobilização.

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve *et al.*, 2000).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

O oleato de etila é um éster formado pela condensação dos ácidos graxos, ácido oleico e etanol. É um líquido incolor ou amarelado claro. É produzido pelo corpo durante a intoxicação de etanol. Usado como solvente para preparação farmacêutica de drogas envolvendo lipofílica substância como esteróide, também é usado como um lubrificante e um plastificante. Também o oleato de etila é regulamentado como um aditivo alimentar pelo Food and Administration em aditivos alimentares autorizados para Adição Direta de Alimentos para Consumo Humano.

No estudo realizado por Zenevicz (2011), conversões em etil oleato semelhantes, variando entre 23,1 e 32,8%, foram encontradas para a esterificação enzimática em GLP pressurizado com enzima microbiana de *P. brevicompactum* em suas diferentes formas de obtenção. Esse mesmo autor observou conversões variando entre 26,1 e 28,7% com extratos enzimáticos de

Rhizopus sp., nas suas diferentes formas de obtenção em mesmas condições.

Segundo o autor, a esterificação do ácido oleico utilizando as lipases de *P. brevicompactum* e *Rhizopus* sp. nas suas diferentes formas de apresentação conduziu a resultados satisfatórios, em termos de conversão, podendo vir a significar baixo custo de produção dos ésteres, podendo ser considerado de interesse industrial e econômico. Podemos ressaltar, dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho.

De um modo geral, as enzimas testadas para a esterificação enzimática utilizando os extratos em diferentes formas de obtenção de *Sporidiobolus pararoseus*, *Penicillium crustosum* e da lipase comercial de pâncreas suíno conduziram a conversões satisfatórias, indicando que um estudo mais detalhado deva ser realizado, buscando talvez, a otimização do processo, para os extratos que apresentam, neste sistema reacional, maior potencial de aplicação como biocatalisador.

4.3.3. Esterificação Enzimática de Geraniol e Acido Propiônico

Nesta etapa serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nas reações de esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico.

A Tabela 12 (a e b, extratos de *Penicillium crustosum* e da lipase comercial de pâncreas suíno, respectivamente) apresenta os resultados obtidos para a esterificação enzimática a partir dos extratos nas suas diferentes formas de obtenção.

Para os extratos provenientes da levedura *Sporidiobolus pararoseus*, não houve formação de produto, quando utilizados como catalisador na reação de esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico. Isso se deve, provavelmente à especificidade desta enzima pelos substratos testados.

A partir da Tabela 12 (a) pode ser observado que nas condições estabelecidas para essas reações nesses ensaios preliminares, resultados satisfatórios foram obtidos para conversões em geraniol propionato quando

catalisadas por EEB (32,22%) e EEBI (34,42%). Para a lipase comercial de pâncreas suíno (Tabela 12 b), maior conversão foi obtida, quando utilizada ECL (35,9%) na esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico.

Tabela 12. Esterificação enzimática utilizando como catalisador os extratos em diferentes formas de *Penicillium crustosum* (a) e da lipase comercial de pâncreas suíno (b) para conversão em geranil propionato.

<i>Penicillium crustosum</i>	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Extrato enzimático bruto (EEB)	290,63	38,89
Extrato enzimático precipitado (EEP)	295,67	34,42
Extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI)	209,46	37,09
Extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI)	203,03	13,54

(a)

Lipase comercial de pâncreas suíno	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Enzima comercial livre (ECL)	341,18	35,9
Enzima comercial imobilizada (ECI)	443,57	31,9

(b)

Tendo em vista trabalhos já publicados indicando que fatores como razão molar, tempo de reação, temperatura e concentração de enzima influenciam fortemente no rendimento das reações (Paroul, 2011), optou-se por dar continuidade aos estudos a fim de otimizar a produção enzimática desse aroma.

Alguns estudos apresentados na literatura relatam a esterificação enzimática em sistema livre de solvente com diferentes ácidos graxos e alcoóis. Paroul (2011), otimizou a produção de geranil propionato na condição de razão molar 3:1 (geraniol:ácido propiônico) e 10% de enzima Novozym 435, alcançando uma conversão média de 94,6% de produto.

Yee *et al.* (1997) estudaram os efeitos das condições reacionais na produção de geranil butirato e geranil caproato em sistemas com n-hexano e

lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada. Os parâmetros investigados foram a concentração de enzima, a concentração de substratos, a adição de água, a temperatura, o pH e a reutilização de enzima. Conversões de 96 e 99% foram alcançadas para citronelil butirato e geranil caproato, respectivamente, com concentração de enzima 15% (m/m do substrato), temperatura reacional entre 30°C e 50°C, adição 2% de água depois de 24 horas de incubação.

A esterificação de ácido palmítico com etanol foi investigada a várias temperaturas (35-70°C) na presença de três lipases (Novozym 435, Lipolase 100T e lipase de pâncreas suíno) em dióxido de carbono supercrítico (CO₂ supercrítico) e sob condições livres de solvente. Todas as enzimas mostraram uma temperatura de 55°C em ambas as condições. A conversão obtida com CO₂ e sob condições livres de solvente com Novozym em condições ótimas foi de 74 e 97%, respectivamente (Kumar *et al.*, 2004).

Aromas produzidos biotecnologicamente são considerados naturais, promovendo maior aceitação por parte do consumidor (Maróstica, 2006). São obtidos principalmente através de processos fermentativos e enzimáticos, sendo menos agressivos ao meio ambiente. Os ésteres são compostos orgânicos com propriedades aromáticas. Ésteres produzidos a partir de ácidos alifáticos e alcoóis terpênicos de origem natural estão sendo utilizados nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentos (Paroul, 2011).

De *et al.* (1999) investigaram a síntese de geranil e citronelil ésteres a partir alcoólise de óleo de coco usando lipase de *Rhizomucor miehei*. As condições otimizadas das reações foram: temperatura, 50 °C; período de incubação, 5 horas; concentração de enzima, 10% (m/m). Dentro das condições estudadas, o rendimento da reação foi superior a 50% para geranil e citronelil.

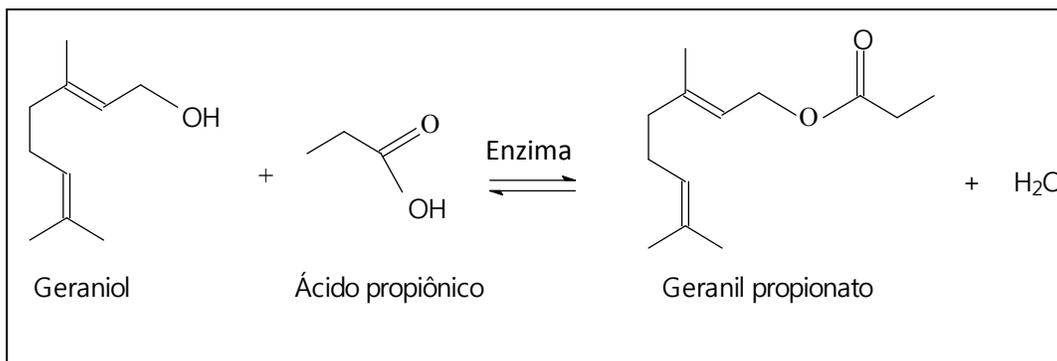
Ikeda & Kurokawa (2001) usaram lipase de *Candida antarctica* imobilizada em fibra de gel de acetato de celulose - TiO₂ para conduzir a síntese de geranil acetato. Após 100 horas de reação, o rendimento da reação foi de 85%.

4.4. Estudo da Produção de Geranil Propionato

De um modo geral, os melhores resultados foram apresentados pelos extratos enzimáticos provenientes do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* que mostrou-se mais estável frente às atividades de síntese (U/g) e apresentou os melhores resultados em termos de conversões em geranil propionato (%).

Após os experimentos preliminares, foi definido o sistema de transformação enzimática a ser avaliado. Optou-se por dar continuidade ao estudo de produção do geranil propionato, a partir do álcool primário geraniol e ácido propiônico na razão molar 3:1, respectivamente. O extrato enzimático do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado foi utilizado como catalisador em todas as etapas que seguem.

Para que as condições de produção de geranil propionato (Esquema 1) fossem investigadas, utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos.



Esquema 1. Reação de síntese de geranil propionato.

4.4.1. Efeito da Temperatura e Concentração de Enzima

Visando avaliar a influência das variáveis independentes na produção de geranil propionato, um planejamento experimental 2² foi realizado. As variáveis estudadas foram temperatura (T) e concentração de enzima [E] (% m/m em relação aos substratos). A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento com

os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões em geranyl propionato.

Tabela 13. Matriz do planejamento experimental 2^2 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em geranyl propionato nas reações conduzidas em condição de razão molar 3:1 (geraniol:ácido propiônico) agitação de 150 rpm, 6 horas de reação, utilizado como catalisador extrato enzimático de *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.

Ensaio	Concentração de enzima (%)	Temperatura (°C)	Conversão (%)
1	(-1) 10	(-1) 40	25,49
2	(+1) 50	(-1) 40	22,62
3	(-1) 10	(+1) 60	30,91
4	(+1) 50	(+1) 60	53,28
5	(0) 30	(0) 50	40,56
6	(0) 30	(0) 50	42,04
7	(0) 30	(0) 50	43,52

A partir desta tabela pode ser observado que a maior taxa de conversão foi obtida no ensaio 4 (53,28%), onde maior concentração de enzima foi utilizada e a temperatura a qual a reação foi submetida foi de 60°C. Em sequência, as conversões observadas na repetibilidade do ponto central, apresentaram o segundo melhor resultado, sendo que neste, também a segunda maior concentração de enzima foi adicionada na catalise da reação e as amostras foram submetidas a temperatura de 50 °C. Cabe ressaltar que a menor taxa de conversão foi apresentada no ponto 2, também com 50% de enzima, porém com a reação submetida a temperatura mais baixa, de 40 °C.

Os resultados de conversão em geranyl propionato apresentados na Tabela 13 foram tratados estatisticamente. Os efeitos absolutos estão apresentados na forma de Gráfico de Pareto, na Figura 11.

Observou-se que em 6 horas de reação de geraniol com ácido propionico as variáveis independentes apresentaram efeitos positivo significativo ($p < 0,05$) na conversão.

Este fato indica que para a síntese de geranil propionato, maiores níveis de concentração de enzima conduzem a maiores conversões, o que neste caso não seria um inconveniente, tendo em vista o baixo custo para a produção da enzima em discussão. Ainda, para a síntese enzimática de geraniol e ácido propionico, melhores taxas de conversão são obtidas com o aumento da temperatura em que a reação for submetida durante o processo de esterificação.

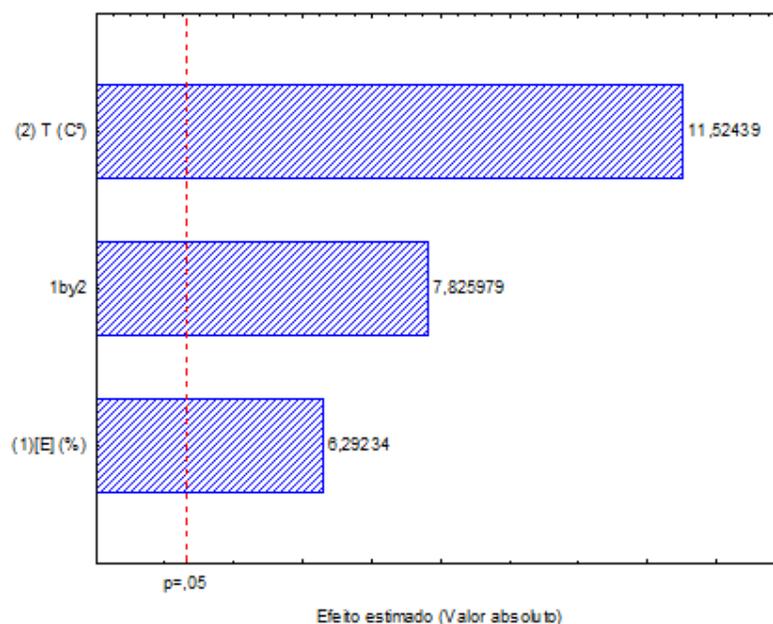


Figura 11. Gráfico de Pareto da produção de geranil propionato (6 horas de reação) utilizando como catalisador extrato enzimático de *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.

O geranil propionato é um agente aromatizante sintético usado para baga, gerânio, maçã, pêra, abacaxi, mel e aromas para bebidas, gelados, sorvetes, doces, pães, sobremesas de gelatina e goma de mascar.

Apesar do fato de que a maioria destes compostos são obtidos por síntese química ou por extração a partir de plantas, a aplicação de novos processos biotecnológicos aumentou recentemente (He *et al.*, 2002; Tan *et al.*,

2006). Neste sentido, a biocatálise pode representar uma alternativa potencial para a síntese química, especialmente em casos em que a produção de compostos com elevada pureza estereo ou regioseletividade está envolvida. Além disso, a crescente preferência por produtos naturais pelos consumidores impulsionou o mercado de sabor e aroma com base na via biotecnológica (Zhong *et al.*, 2013).

Paroul (2011) avaliou o efeito das variáveis independentes na produção de geranil ésteres, o ácido oleico apresentou as maiores taxas de conversão, 98,71% e 97,27%. Para o ácido propiônico as maiores conversões em geranil propionato obtidas foram de 90% e 85%.

A produção de hexil laurato utilizando a enzima Lipozyme IM 77 em sistema livre de solvente, foi estudada por Chang *et al.* (2006). As condições ótimas de síntese foram encontradas no tempo de reação de 40 minutos, 58 °C, concentração da enzima de 25,4mg/volume e um pH de 5,9, com 69,7% de conversão.

4.4.2. Efeito da Razão Molar Geraniol:Ácido Propiônico na Cinética de Esterificação Enzimática

Tendo em vista que a concentração de enzima apresentou-se significativa no processo, novos testes foram realizados, fixando a temperatura em 60 °C, onde a melhor conversão foi verificada (ensaio 4 do planejamento), e variando apenas a concentração de enzima em 60 e 70% (m/m substratos). As conversões obtidas foram de 27,7 e 50,03%, respectivamente, o que demonstra um resultado insatisfatório quando comparado à conversão de 53,28% em geranil propionato quando inserido no meio reacional concentração de 50% de enzima (m/m substratos) em temperatura de 60 °C (ensaio 4 Tabela 13).

Na sequência do trabalho novos experimentos foram conduzidos para o estudo cinético do efeito da razão molar geraniol:ácido propiônico para dois pontos do planejamento experimental desenvolvido, onde para o ensaio 2 fixo-

se a temperatura em 40 °C (Figura 12) e no ensaio 4, 60 °C foi a temperatura fixada (Figura 13). Como pode ser observado na Tabela 13, esses ensaios apresentaram níveis extremos em conversão, porém ambos com 50% de extrato enzimático (m/m substratos) e agitação em 150 rpm, justificando a escolha dos mesmos para o estudo cinético .

A Figura 12 apresenta as curvas de conversão obtidas em função do tempo, variando a razão molar geraniol:ácido propiônico em 1:1, 3:1 e 5:1 à temperatura de 40 °C. A partir dessa figura é possível visualizar que a razão molar influencia no rendimento da reação no transcorrer do estudo cinético para a razão molar 5:1, que de modo geral apresentou os mais altos níveis de conversão em geraniol propionato.

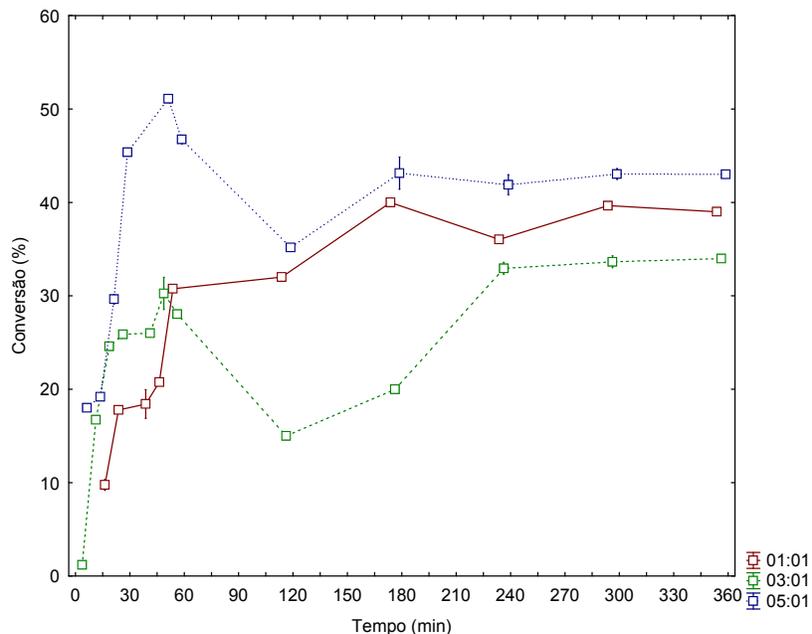


Figura 12. Efeito da razão molar sobre a conversão de geraniol propionato à temperatura de 40 °C, concentração de enzima de 50% (m/m substratos) e agitação de 150 rpm, utilizando como catalisador extrato enzimático de *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.

De acordo com a figura, valor máximo em conversão foi observado para esta razão molar, atingindo 51% de rendimento nos primeiros 50 minutos de síntese. Cabe salientar que após 210 minutos observa-se uma tendência de estabilização nas curvas de rendimentos para as razões molares em estudo.

Nos estudos realizados por Paroul *et al.* (2010), os autores observaram que a razão molar influenciou no rendimento da reação nos primeiros 30 minutos atingindo 88% de conversão para razão molar 5:1 e a 99% depois de 6 horas de reação. Sendo que a mesma síntese em questão foi avaliada e as condições foram de 50 °C para temperatura, concentração de enzima (Novozym 435) em 10% (m/m substratos) e agitação em 150 rpm.

Resultados semelhantes foram encontrados para o perfil cinético do segundo ponto escolhido para o estudo cinético, onde apenas a temperatura foi alterada para 60 °C (Figura 13). A partir da Figura 13 é possível observar que de modo análogo a Figura 12, a razão molar 5:1 apresentou maior influencia no rendimento da reação durante o percurso.

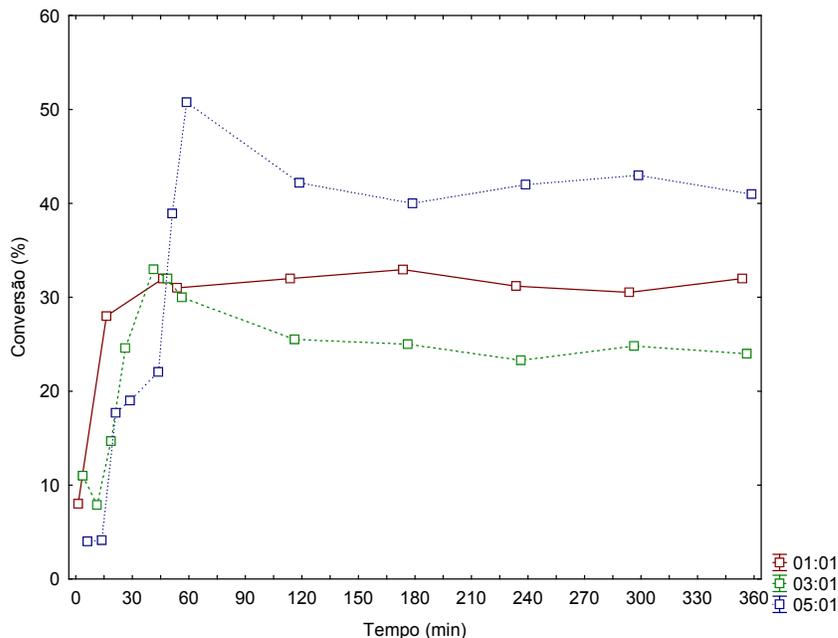


Figura 13. Efeito da razão molar sobre a conversão de geranil propionato à temperatura de 60 °C, concentração de enzima de 50% (m/m substratos) e agitação de 150 rpm, utilizando como catalisador extrato enzimático de *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado.

O valor máximo em conversão foi obtido para a mesma razão molar (5:1), atingindo 50% de rendimento em 60 minutos de síntese. Após esse período as curvas de rendimento para as diferentes razões molares avaliadas tendem a estabilizar.

Dörmo *et al.* (2004) analisaram o efeito da razão molar de ácido:álcool na esterificação de isoamil oleato na temperatura de 40 °C, 0,5% de enzima (Novozym 435), agitação de 150 rpm e 7 horas de reação, sem a utilização de solvente. Avaliaram o efeito da razão molar em 1:1, 1:2, 1:5 e 2:1 de ácido:álcool e obtiveram mais altas conversões em 4 horas de reação (70-80%) com as razões molares de 1:2 e 1:5.

Os resultados do estudo cinético demonstram que os valores máximos em conversões são atingidos para as temperaturas testadas (40 e 60 °C) já na primeira hora de reação para a razão molar 5:1, concentração de enzima de 50% (m/m substratos) e agitação de 150 rpm, chegando aproximadamente a 51% (Figura 12) e 50% de conversão (Figura 13).

4.4.3. Avaliação do Reuso do Extrato Enzimático não Comercial de *Penicillium crustosum* Imobilizado

Após estabelecidas as condições de maximização da produção de geranil propionato, temperatura de 40 °C, concentração de enzima de 50% (m/m substratos) e razão molar 5:1, o estudo do reuso do extrato enzimático não comercial foi realizado. Os testes preliminares para determinar a recuperação do extrato enzimático foram realizados em termos de atividade de síntese com etanol, hexano e tampão acetato 0,1 M a pH 4,8.

Melhor aspecto de conservação das esferas e maior atividade de síntese foram verificados após a lavagem com o solvente hexano. Na sequência, prosseguiu-se com os experimentos para estudo do reuso do extrato lipolítico em questão.

Para este estudo, todas as determinações foram realizadas sobre a mesma amostra de extrato enzimático imobilizado de *Penicillium crustosum*. A Figura 14 apresenta a atividade de síntese, representada como atividade relativa (%) e a conversão em geranil propionato no sistema, acompanhados por 6 ciclos durante o estudo de reuso.

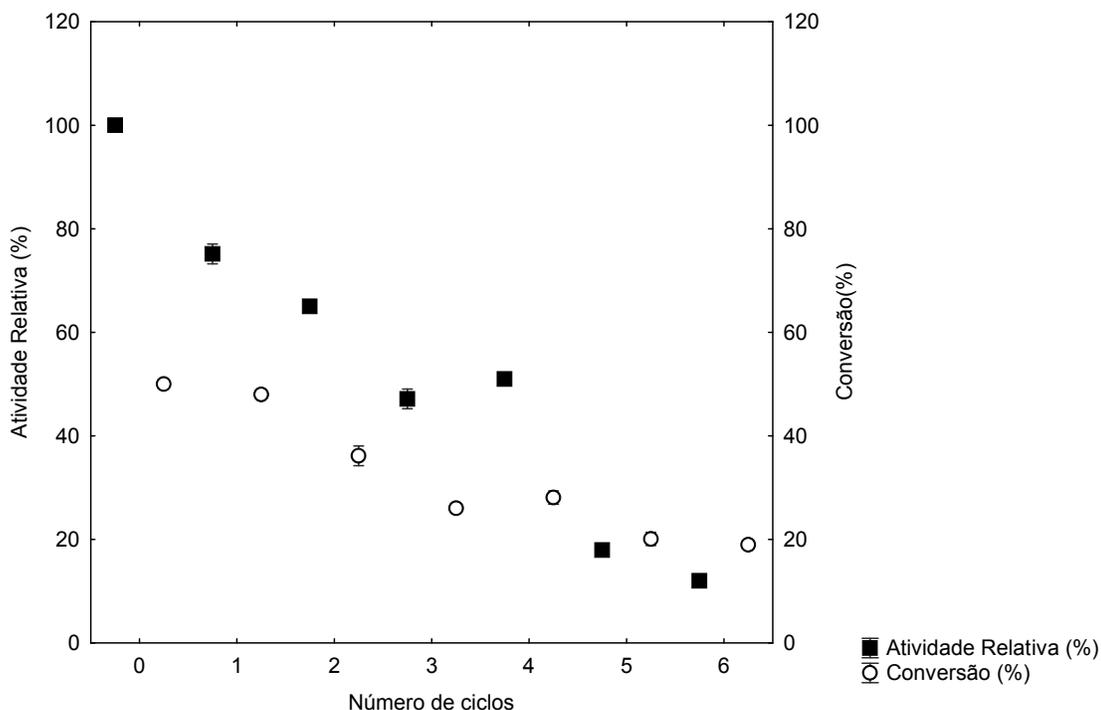


Figura 14. Atividade de síntese do extrato lipolítico de *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado e conversão em geranil propionato à temperatura de 40 °C, concentração de enzima de 50% (m/m substratos), agitação de 150 rpm e razão molar 5:1.

A partir da análise da figura é possível observar que a atividade relativa é decrescente ao longo do reuso, retendo em torno de 50% da mesma no terceiro e quarto ciclos. Após quatro ciclos a atividade residual (%) passa a ser menor que 20%.

A queda na atividade de esterificação do extrato imobilizado foi acompanhada pela queda nas conversões para o processo de síntese de geranil propionato. Na literatura, diversos trabalhos são encontrados investigando o reuso de lipases comerciais e não comerciais oriundas de diferentes fontes.

A síntese de laurato de citronelol em meio orgânico catalisado por lipases imobilizadas foi estudada por Yadav e Lathi (2004) que observaram um decréscimo entre 62 e 55% na atividade da Novozym SP 435 após 3 ciclos de reuso, sendo que, no tempo reacional de 30 minutos deste ciclo as conversões foram inferiores a 20%.

Rodrigues *et al.* (2008), investigando a síntese de butil butirato utilizando a lipase CalB solúvel imobilizada em carvão ativado, constataram que após 6 ciclos, 10 a 15% de sua atividade inicial foi retida.

Segundo Guncheva *et al.* (2011), a lipase de *Candida rugosa* imobilizada mantém 80% de sua atividade inicial após 15 ciclos, sendo aplicado na esterificação de ácido palmítico com álcool etílico.

Popiolski (2011), estudando a atividade de esterificação da lipase imobilizada Novozym 435 após sucessivos ciclos de uso para a produção de ésteres etílicos por transesterificação do óleo de soja em sistema de ultrassom, relatou perda da atividade enzimática próxima a 50%, logo após dois ciclos de reuso, sendo que, no terceiro e quarto ciclos a perda de atividade foi completa. As condições de operação deste sistema eram: concentração da lipase comercial Novozym 435 de 27%, razão molar óleo/álcool de 1:3, potência do ultrassom de 40% da capacidade máxima (132 W), temperatura de 63 °C e tempo de 60 minutos.

A estabilidade operacional da lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada em espumas de poliuretano para síntese de lauril laurato foi estudada por Cui *et al.* (2013), onde o biocatalisador manteve, após 15 ciclos de reação, um rendimento em produto de 92%. No estudo de Silva *et al.* (2013), inulinase imobilizada manteve 49,7 e 49,4% de sua atividade inicial após 24 ciclos de reutilização em sacarose e inulina, respectivamente.

Desvantagens, como o elevado preço de enzimas comerciais, restringem o seu uso em aplicações industriais, assim sendo, o estudo de enzimas imobilizadas é crescente, visto que, estas podem ser reutilizadas em sucessivos ciclos de reação e, conseqüentemente, compensar o alto valor de compra. No caso deste trabalho os custos são ainda menores, tendo em vista a produção da enzima a partir de resíduos agroindustriais, para posterior imobilização e aplicação.

4.5. Caracterização Parcial do Catalisador Empregado

A partir das isotermas de adsorção do nitrogênio foram determinadas as seguintes propriedades do catalisador: A_{BET} (área superficial determinada pela isoterma BET); V_{BJH} (volume dos poros, determinado pelo modelo BJH); diâmetro médio do poro (determinado pelo modelo BJH).

O resultado da caracterização, comparado com os de uma enzima comercial Novozym 435, são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultado da caracterização parcial do catalisador empregado no estudo da maximização da produção de geranyl propionato.

Catalisador	Diâmetro de poro (nm)	Volume de poro (mL/g)	Área superficial BET (m ² /g)
Novozym 435	15,0	0,50	130,0
<i>P. crustosum</i> Imobilizado (alginato com carvão ativado)	4,0	0,79	79,78

Conforme a Tabela 14 verifica-se que o diâmetro do poro do extrato enzimático de *P. crustosum* Imobilizado em alginato com carvão ativado utilizado neste trabalho é inferior à lipase comercial Novozym 435, porém com relação ao volume do poro, a mesma apresenta valores consideravelmente superiores aos da enzima comercial.

O alto volume de poro pode facilitar a transferência de massa devido a maior difusão, uma vez que poros maiores facilitam a entrada do solvente em suas cavidades, favorecendo a reação, todavia esta ainda é uma questão a ser estudada e aperfeiçoada.

4.6. Considerações Finais

Este trabalho teve como objetivo geral investigar, conforme descrito anteriormente, a aplicação dos extratos enzimáticos microbianos obtidos por *Sporidiobolus pararoseus* e *Penicillium crustosum* em diferentes formas de obtenção como catalisadores em reações de interesse, incluindo ainda, a lipase comercial de pâncreas suíno nas condições, livre e imobilizada.

O interesse pela obtenção de enzimas ideais para aplicação industrial aumentou nos últimos anos. Isso se deve especialmente pela busca de redução dos custos de produção bem como aos diferentes problemas ambientais ocasionados por catalisadores químicos. O elevado desempenho catalítico dessas proteínas em condições brandas de reação (temperaturas amenas, pH próximos a neutralidade e meio aquoso/orgânico), as torna atraentes industrialmente. Justifica-se, assim, o uso de resíduos e subprodutos agroindustriais no processo de produção, bem como a busca por diferentes micro-organismos produtores de enzimas.

O uso de enzimas como catalisadores apresenta um perfeito cenário de perspectivas, porém a aplicação industrial não é tão imediata porque, apesar das vantagens mencionadas, as enzimas apresentam outras características que, embora atraentes para a operação da máquina celular, limitam a sua utilização em escala industrial.

Uma das dificuldades é a solubilidade das enzimas no meio reacional, pois a enzima está presente em baixas concentrações no meio, o que pode gerar custos elevados para a sua separação dos produtos.

Outro problema está relacionado com a instabilidade operacional das enzimas. Para uso industrial a utilização de enzimas como matéria-prima não reciclável tem inviabilizado seu uso, devido ao alto custo envolvido. Sendo assim, poucas enzimas vêm sendo aplicadas como catalisadores em processos industriais.

A imobilização das enzimas, utilizando diferentes suportes, pode ser uma alternativa a tais problemas, permitindo superar as desvantagens da solubilidade no meio reacional e da instabilidade operacional no uso das enzimas, tornando-as catalisadores ideais para aplicação em diferentes setores industriais.

A parte experimental desta tese foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões

A produção, imobilização e aplicação de lipases foram estudadas com êxito neste trabalho. As melhores atividades de síntese foram encontradas para o extrato enzimático de *Penicillium crustosum* bruto imobilizado (EEBI) (240,59 U/g), seguido do extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI) (228,76 U/g), ambos imobilizados em alginato com carvão, inviabilizando o suporte inorgânico argila poço A.

As mais altas conversões obtidas para o extrato de *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato com carvão foram: transesterificação enzimática 4,68% (para EEBI), esterificação enzimática de ácido oleico e etanol, 64,48% (para EEBI) e esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico 38,89% (para EEI), seguido de 37,09% (para EEBI).

A maximização da produção do sistema reacional de geraniol propionato foi realizada usando extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI) em alginato de sódio com carvão ativado obtido a partir de fungo filamentoso *Penicillium crustosum*, a melhor conversão (53,28%) foi atingida com temperatura de 60°C, e concentração de enzima (m/m substrato) 50%.

O estudo do efeito da razão molar geraniol:ácido propiônico na cinética da produção demonstrou a máxima conversão (51%) com razão molar álcool:ácido 5:1, em temperatura de 40°C, logo no início da reação (50 minutos), o que é favorável, levando em conta a diminuição de custos no processo de síntese.

O estudo do reuso permitiu concluir que a atividade relativa é decrescente ao longo do reuso, restando em torno de 50% da mesma no terceiro e quarto ciclos. Após quatro ciclos a atividade residual (%) passa a ser menor que 20%, acompanhada pela queda nas conversões para o processo de síntese de geraniol propionato.

Considerando as diversas vantagens da imobilização de enzimas para utilização como catalisadores em reações de interesse comercial, os resultados obtidos nesta pesquisa mostram-se interessantes, pois os custos para produção, bem como o carvão ativado utilizado para a imobilização, apresentam baixo custo, despertando assim, um aumento no interesse quanto ao uso deste suporte na imobilização de enzimas como as lipases, para posterior aplicação em produtos de alto valor agregado como é o caso do geraniol propionato.

5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

Tendo com base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- avaliar outros suportes para imobilização dos extratos enzimáticos obtidos a partir de fungo filamentosos *Penicillium crustosum*;
- testar novos sistemas reacionais utilizando extratos enzimáticos imobilizados em alginato de sódio com carvão ativado e outros suportes;
- realizar estudo de viabilidade econômica a respeito da produção de bioaromas a partir de álcoois monoterpênicos naturais;
- realizar ensaios usando óleos essenciais brutos como substratos para produção de aromatizantes naturais em sistemas livres de solvente orgânico através de esterificação enzimática usando extratos enzimáticos obtidos a partir de fungo filamentosos *Penicillium crustosum*
- avaliar o comportamento da reação de esterificação em meios alternativos, como ultrassom e CO₂ supercrítico;
- avaliar a produção de ésteres a partir de geraniol em diferentes temperaturas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, S.; KOBAYASHI, T. Synthesis of ester by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvents. Review. *Journal of Biosciences and Bioengineering*. 2005; 99:87-94..

ALKAN, H., BAYSAL, Z., UYAR, F., DOGRU, M. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006; 136:183-192.

ALTUN, G.D.; CETINUS, S.A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry*. 2007; 100:964–971.

ALVAREZ-MACARIE, E.; BARATTI, J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000; 10:377-383.

AL-ZUHAIR, S., DOWAIDAR, A., KAMAL, H. Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 44:256–262.

ASSIS, S.A.; FERNANDES, P.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FARIA OLIVEIRA, O.M.M. Screening of supports for the immobilization of pectinmethylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004; 79: 277-280.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004; 57:19-34.

BERNARDES O.L., BEVILAQUA J.V., LEAL M.C.M.R., FREIRE, D.M.G., LAGNONE, M.A.P.; Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007; 32:136-140, 105-114.

BETANCOR L.; LOPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; M.; DELLAMORA-ORTIZ CEZAR MATEO, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 39:877-882.

BON E P S, FERRARA M A, CORVO M L. *Enzimas em biotecnologia*. 2008; Rio de Janeiro: Interciência.

BORZANI W., SHMIDELL W., LIMA U.A., AQUARONE E. *Biotecnologia industrial: fundamentos*. São Paulo: Edgar Blucher. 2001; p.254.

BRÍGIDA A.I.S., Estudo da imobilização de lipase tipo B de cândida Antarctica utilizando fibra da casca de coco verde como suporte. Fortaleza: 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará.

BRYJAK J., TROCHIMCZUK A.W.; Immobilization of penicillim acylase on hydrophobic acrylic carriers. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 39:573-578.

BROZZOLI, V., CROGNALE, S., SAMPEDRO, I., FEDERICI, F., D'ANNIBALE, A., PETRUCCIOLI, M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technology*. 2009; 100:3395–3402.

BUCALÁ, V.; FORESTI, M.L.; TRUBIANO, G.; FERREIRA, M.L.; BRIOZZO, M.; BOTTINI, S. Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38:914-920.

BURKERT J. F. DE M.; Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. Campinas: 2002. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BURKERT J. F. M., MAUGERI F., RODRIGUES M. I.; Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*. 2004; 91:77-84.

BURTON, S. G.; COWAN, D. A.; WOODLEY, J. M. The search for the ideal biocatalyst. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20(1):37-45.

CARVALHO, P. O., CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. A., OLIVEIRA, J. G., SHIMUZU, M. T., SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*. 2003; 26:75-80.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*. 2004; 27: 146-156.

CHEIRSILP, B., JEAMJOUNKHAW, P., H-KITTIKUN, A. Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 59:206–211.

CHIOU, S.-H.; WU, W.-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*. 2004; 25:197-204.

CHANG H., LIAO H., LEE C. AND SHIEH C. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *Chemical Technology and Biotechnology*. 2005; 80:307–312.

CHANG, S-W.; SHAW, J-F.; SHIEH, C-H.; SHIEH, C-J. (2006). Optimal formation of hexyl laurate by Lipozyme IM-77 in solvent-free system. *J. Agr. Food Chem.* 54: 7125 - 7129.

CHIAERADIA, V., DETOFOL, M., CANSIAN, R.L., DALLAGO, R.M.; OLIVEIRA, D., PAROUL, N. (2011) Produção de mentilacetato via esterificação enzimática em sistema livres de solvente. *Perspectiva*. 35 (131): 35-42.

CHIBATA, L. "Production of L-amino acids", In: *Immobilized Enzymes: Research and Development*, John Wiley & Sons, New York, London, Sidney, Toronto.1978; 168-178.

CHOWDARY, G.V.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Enzymatic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis. *Process Biochemistry*. 2001; 36:331-339.

COGHETTO, C., SCHERER, R. P., SILVA, M. F., GOLUNSKI, S., PERGHER, S. B.C., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA J. V., TREICHEL, H. Natural montmorillonite as support for the immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2012; 1:284-289.

COUTINHO FILHO, U. Contribuição ao Estudo de Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre. Dissertação de Mestrado. 1996. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

COUTO, S. R., SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *Journal of Food Engineering*. 2006; 76:291–302.

CUI, C.; TAO, Y.; LI, L.; CHEN, B.; TAN, T. Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013; 91: 59–66.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*. 2004; v. 27, p. 623-630.

DAMASO, M. C. T.,1; PASSIANOTO, M. A., FREITAS, S. C., FREIRE, D. M. G., LAGO, R. C. A. L., COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008; 39:676-681.

D'ANNIBALE, A., SERMANI, G. G., FEDERICI, F., PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*. 2006; 97:1828–1833.

DE, B.K.; CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D.K. Synthesis of Geranyl and citronellyl esters of coconut oil fatty acids through alcoholysis by *Rhizomucor miehei* lipase catalysis. *JAOCS*. 1999; 76(12): 1501-1504.

DESAI, P.D.; DAVE, A.M.; DEVI, S. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. *Food Chemistry*. 2006; 95:193-199.

DIZGEA, N., KESKINLERA, B., TANRISEVENB, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 44:220–225.

DÖRMO, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U. GUBICZA, L.. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fuel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. *Biochem. Eng. J.* 2004; 21: 229-234.

DUTRA, C. V. , TERZI, C., BEVILAQUA, J. V., DAMASO, M. C. T., COURI, S., LANGONE, M. A. P. & SENNA, L. F. Lipase Production in Solid-State Fermentation Monitoring Biomass Growth of *Aspergillus niger* Using Digital Image Processing. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2008; 147:63–75.

ERTUGRUL, S., DÖNMEZ, G., TAKAC, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials.* 2007; 149:720–724.

FACCIO C.; Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais. Dissertação de M. Sc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2004.

FERRAZ L.R., OLIVEIRA D.S, SILVA M.F., TREICHEL H., OLIVEIRA D.; Produção de lipase microbiana por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais. 3º Simpósio de Segurança Alimentar. *Anais 3º Simpósio de Segurança Alimentar*, Florianópolis, 2010.

FERRAZ, L.R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M.F.; RIGO, E., DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2012; 1- 243–252.

FICKERS, P., DESTAIN, J., THONART, P. Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase production by fed-batch fermentation. *Journal of Basic Microbiology.* 2009; 49:212 – 215.

FORESTI, M.L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M.L. Effect of several reaction parameters in the solvent free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene powder. *Biochemical Engineering Journal*. 2007; 25 (1):69-77.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida Antarctica B* adsorbed on polypropylene powder. *Catalysis Today*. 2005; 107-108:23-30.

Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Rio de Janeiro: 1996. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ.

FUKUDA H., KONDO A., NODA H.; Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2001;92:405–416.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *Journal of Controlled Release*. 2006; 114:1-14.

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography*. 2006; p. 3-16.

GONÇALVES F.A.G., Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. Belo Horizonte 2007. Dissertação de Mestrado. Depto. de Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais.

GRIEBLER N, POLLONI A, REMONATTO D, ARBTER F, VARDANEGA R, CECHET J, DI LUCCIO M, OLIVEIRA D, TREICHEL H, CANSIAN R, RIGO E,

NINOW J. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food and Bioprocess Technology*. 2009; in press DOI 10.1007/s11947-008-0176-5.

GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKOVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOVA, N. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis. *Process Biochemistry*. 2011; 46: 923-930.

GUPTA, S., KAPOOR, M., SHARMA, K.K., NAIR, L.M., KUHAD R.C. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach, *Bioresource. Technology*. 2008; 99:937-945.

GUPTA, K.C.; JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*. 2006; 66:43-54.

GUPTA M.N., ROY I.; Enzyme in organic media: Forms, functions and applications. *European Journal of Biochemistry*. 2004; 271:2575-2583.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, U. The production of isoamyl Acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry*. 2002; 38:379-386.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. *International Dairy Journal*. 2009; 19:172-177.

HAMA, S., NUMATA, TAMALAMPUDI, S., YOSHIDA, A., NODA, H., KONDO, A., FUKUDA, H. Use of mono- and diacylglycerol lipase as immobilized fungal

whole cells to convert residual partial glycerides enzymatically into fatty acid methyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 58:93–97.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 39:235-251.

HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N.N.; HAZARIKA, A.K. Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents. *Chemical Engineering Journal*. 2002; 85:61-68.

HENDRICKX, M.; LUDI KHUYZE, L.; VAN DEN BROECK, I.; WEEMAES, C. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 1998; 9:197-203.

HE X-L, CHEN B-Q AND TAN T-W. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl esters of fatty acids by immobilized lipase from *Candida* sp. 99-125. *J Mol Catal B Enz*, 2002; 18:333-339.

IKEDA, Y.; KUROKAWA, Y.. Synthesis of geranyl acetate by lipase Entrap – immobilized in cellulose acetate-TiO₂ gel fiber. *JAOCS*. 2001; 78(11): 1099-1103.

ILLANES, A. *Enzyme Biocatalysis – Principles and Applications*. 2008; New York: Springer.

ISO M., CHEN, B., EGUCHI M., KUDO T., SHRESTHA S.; Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2001; 16: 53 – 58.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002; 13:390-397.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E.S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase — a critical review. *Critical Review in Biotechnology*. 2008; 28: 253–264.

KAPOOR, M., GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*. 2012; 48:1-15.

KAWAKAMI, K., TAKAHASHI, R., SHAKERI, M., SAKAI, S. Application of a lipase-immobilized silica monolith bioreactor to the production of fatty acid methyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 57:194–197.

KAEWTHONG, W., SIRISANSANEEYAKUL, S., PRASERTSAN, P., H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochemistry*. 2005; 40:1525-1530.

KEMPKA, A. P., LIPKE, N. R., PINHEIRO, T. L. F., MENOCIN, S., TREICHEL, H., FREIRE, D. M. G., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2008; 31:119–125.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A.; MELO, E. H. M.. “Review: The immobilization of enzymes and cells”. *Chimicaoggi- Maggio*. 1988; 21-29.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004; 35:126-139.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. *Food Technology and Biotechnology*. 2004; 42:279–286.

KUMAR, R.; MADRAS, G.; MODAK, J.. Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2004; 43:1568-1573.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA, L.J.; CARRASCOSA, V.A. PESSELA, C.C.B.; GARCIA-OCHOA. Studies on the activity and the atability of β -Galactosidases from *Thermus* sp. Strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology.* 2002; 30:392-405.

LANGONE M.A.,DE ABREU M.E., REZENDE M.J., SANT'ANNA JR. G.L.; Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2002; 100:987-996.

LEE K., FOGLIA T. A., CHANG K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. *Journal of the American Oil Chemists Society.* 2002; 79:191-195.

LEVY, L.M., DEHLI, J. R. GOTOR, V. Lipase-catalyzed resolution of cyclic *cis*- and *trans*- β -hidroxy esters. *Tetrahedron: Assymetry.* 2003; 14:2053-2058.

LI, N.; BAI, R. A novel amine-shielded surface cross-linking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. *Industrial & Engineering Chemistry Research.* 2005; 44:6692-6700.

LIU, Z., CHI, Z., WANG, L., LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal.* 2008; 40:445–451.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(6):510-516.

MALDONADO R.R., BURKERT J.F.M., MAUGERI F., RODRIGUES M.I.; Estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 em frascos agitados utilizando meios industriais, in *VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa*. 2006; 121.

MALCATA, F. X., REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL JR, C. G.; AMUNDSON, C. H. "Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils". A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1990; 67:890- 910.

MARÍA. P.D.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H.; SINISTERRA, J.V. Lipase factor (LF) as a characterization parameter to explain the catalytic activity of crude lipases from *Candida rugosa*, free or immobilized in microemulsion-based organogels. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002; 35:277-283.

MARÓSTICA, J.M.R. Biotransformação de terpenos para produção de compostos de aroma funcionais: 2006. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

MARTÍNEZ-RUIZ, A., GARCÍA, H. S., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., FAVELATORRES, E. Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008; 151:393-401.

MARTINS, V.G. Co-produção de lipase e biosurfactante em FES para utilização em biorremediação de oleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quimica Nova*. 2008; 31:1942-1947.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN. J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40:1451–1463.

MENDES, A.A.; RODRIGUES, D.S.; ADRIANO, W.S.; MAMMARELLA, E.J.; DE CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Covalent Attachment of *Aspergillus oryzae* Lipase on Chemically Bound Hybrid Matrices. *10th International Conference on Chitin and Chitosan, Montpellier-FR, Livro de Abstracts*. 2006; 1:95-96.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDAN, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quim. Nova*. 2011; 34:831-840.

MENONCIN, S., DOMÍNGUES, N.M., FREIRE, D.M.G., TONIAZZO, G., CANSIAN, R.L., OLIVEIRA, J.V., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D., TREICHEL, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran. *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*. 2009. DOI 10.1007/s11947-008-0104-8

MEDEIROS, J.; KALIL, S.J.; COSTA, F.; NAKASHIMA, E.B.; CABRAL, A.S.; ZAVICKIS, F.P.; SILVA, J.A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Estudo da Influência da Concentração de Substrato, pH e Temperatura na Determinação da Atividade Enzimática da Inulinase, Florianópolis. 1999. *Anais ENPROMER*, p.350-351.

MIRANDA, M.. Aprimoramento do Procedimento de Imobilização da Lipase Microbiana em Óxido de Nióbio para Modificação de Óleos Vegetais Lorena-SP-Brasil: 2004. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química de Lorena.

MORENO, J.M., ARROYO M., HERNAIZ M.J., SINIESTERRA J.V.; Covalent immobilization of pure isoenzymes from lipase *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 1997; 21:552-558.

OLIVEIRA D. Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO₂ supercrítico. 1999. Tese de D. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro-COPPE, RJ, Brasil.

ORIVE G., PONCE R.M., HERNÁNDEZ A.R., GASCÓN M., PEDRAZ I.J.L.; Biocompatibility of microcapsules for cells immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, 2002; 23:3825-3831.

PAROUL, N., GRZEGOZESKI P. L., CHIARADIA, V., TREICHEL, H., CANSIAN, R. L., OLIVEIRA, J. V., OLIVEIRA, D. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. *J Chem Technol Biotechnol*. 2010; 85:1636-1641.

PAROUL, N. Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de Caxias do Sul - centro de ciências agrárias e biológicas instituto de biotecnologia e programa de pós-graduação em biotecnologia.

PASTORE, G. M., COSTA, V. S., KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial da lipase extracelular produzida por nova cepa de *Rhizopus sp.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2003; 23:135-140.

PATEL, R. N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002; 31:804-826.

PERSSON M., MLADENOSKA I., WEHTJE E., PATRICK ADLERCREUTZ P.; Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technol*. 2002; 31:833–841.

PIZARRO, A. V. L., PARK, E. Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*. 2003; 38:1077-1082.

POPIOLSKI, S.A. Otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. 2011. Dissertação (Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Strictu-Sensu* em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim. 2011.

PREDABON S. M. Produção e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium brevicompactum* em bioreator de leito fixo utilizando resíduos agroindustriais como substrato. 2011; Dissertação de Ms., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil.

QI W-T., MA J., YU W-T., XIE Y-B., WANG W., MA X.; Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsuls. *Enzyme and Microbial Technology, New York*. 2006; 38:697-704.

RAJENDRAN, A., THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *Food Science and Technology*. 2009; 42:985–992.

RAMPIM M.A. Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de mamona e soja utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LIPOZYME TL IM). Ribeirão Preto – SP: 2007. Dissertação de Mestrado Departamento de Química. Universidade de São Paulo – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

RIBEIRO, E. J. Estudo Cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada. Tese de Doutorado. 1989; Faculdade de Engenharia de Alimentos, Univerdade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP).

RIGO E., NINOW J. L., POLLONI A. E., REMONATTO D., ARBTER F., VARDANEGA R., OLIVEIRA D., TREICHEL H., DI LUCCIO M.; Improved lipase

biosynthesis by a newly isolated *Penicillium* sp. grown on agricultural wastes. *Industrial Biotechnology*. 2009; 5:1-5.

RISSO, F. V. A. Síntese de oligossacarídeos em meio orgânico e aquoso utilizando-se inulinase livre e imobilizada produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 E NRRL Y-7571. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

ROCHA, J.R.; CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*. 2006; 95: 77-82.

ROCHA W. S., GROSSO C.R.F.; Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose. *Sitientibus, Feira de Santana*. 2006; 35:125-148.

RODRIGUES, D. S., CAVALCANTE, G. P., SILVA, G. F., FERREIRA, A. L. O., GONÇALVES, L. R. B. Effect of additives on the esterification activity of immobilized *Candida antarctica* lipase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008; 24:833–839.

RODRIGUEZ, J.A., MATEOS, J.C., NUNGARAY, J., GONZÁLEZ, BHAGNAGAR, V. T., ROUSSOS, S., CORDOVA, J., BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 2006; 41:2264–2269.

ROSSETTO, E., BERARDIN, R., PENHA, F. G., PERGHER, S. B. C. Caracterização de argilas bentonitas e diatomitas e sua aplicação como adsorventes. *Química Nova*. 2009; 32:2064-2067.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa. 2004; 1-9.

SALIHU, A., ALAM, M. Z., ABDULKARIM, M. I., SALLEH, H. M. Lipase production: Na insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*. 2012; 58:36-44.

SCHERER, R. P. Estudo da imobilização de lipase comercial de pâncreas suíno em diferentes suportes inorgânicos. Dissertação de Mestrado. 2010; Departamento de Ciências Agrárias. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.

SCHERER, R.P. Estudo da imobilização de lipase comercial de pâncreas suíno em diferentes suportes inorgânicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Ciências Agrárias, 2010.

SEGEL, I. H. Bioquímica, Teoria e Problemas. 1979. Traduzido Grassiano D. M. Rio de Janeiro, *Livros Técnicos e Científicos Editora*.

SHAMEL, M. M. , RAMACHANDRAN, K. B., HASAN, M., AL-ZUHAIR, S. Hydrolysis of palm and olive oils by immobilised lipase using hollow fibre reactor . *Biochemical Engineering Journal*. 2007; 34:228–235.

SHARMA, R CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 2001;19:627-662.

SILVA C., WESCHENFELDER T. A., ROVANI S., CORAZZA F. C., CORAZZA M. L., DARIVA C., OLIVEIRA J. V. Continuous production of fatty ethyl esters from soybean oil in compressed ethanol. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 2007; 46:5304- 5309.

SILVA C. Produção contínua de biodiesel por transesterificação não catalítica de óleo de soja. Maringá –PR, 2008. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá.

SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. O.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, p. 54-59, 2013.

SILVA M.F., FREIRE D.M.G., CASTRO A.M., DI LUCCIO M., MAZUTTI M.A., OLIVEIRA J.V., TREICHEL H., OLIVEIRA, D. Concentration, partial characterization and immobilization of enzymatic extract from *P. brevicompactum* by solid state fermentation of babassu cake and castor bean cake. 2011; *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

SILVA M. F.; Produção e caracterização parcial de lipases de *penicillium verrucosum* e *penicillium brevicompactum* utilizando como substratos torta de babaçu e farelo de mamona. 2010. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

SMANIOTTO, A. Produção e caracterização parcial de uma ‘lipase sintética’ produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus*. 2010. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

SOCCOL C.R., VANDENBERGHE L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*. 2003; 13:205-218.

SUN, S. Y., XU, Y. Membrane-bound ‘synthetic lipase’ specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus*

chinensis: A comparative investigation. *Bioresource Technology*. 2009; 100:1336–1342.

TAN T, CHEN B-Q AND YE H. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor. *Biochem Eng J*. 2006; 29:41-45.

TAYLOR, R. F.. “Protein Immobilization, Fundamentals and Applications”, Cambridge, Massachusetts. 1991; pp. 143-145.

TAKAÇ, S., MARUL, B. Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2008; 35:1019–1025.

TENG, Y., XU, Y., WANG, D. Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2009; 32:397–405.

TENG, Y., XU, Y., WANG, D. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 57:292–298.

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

VAHLA, K., KAHLERTA, H., BÖTTCHER, D., WARDENGA, R., KOMORSKY-LOVRIC, S., BORNSCHEUER, U., SCHOLZ, S. A potential high-throughput method for the determination of lipase activity by potentiometric flow injection titrations. *Analytica Chimica Acta*. 2008; 610:44–49.

VAN DER PADT A. Enzymatic acylglycerol synthesis in membrane reactor. Ph.D. dissertation, Landbouwniversiteit te Wageningen, Holanda, 1993.

VARGAS, G. D. L. P., TREICHEL, H. OLIVEIRA, D. BENETI, S. C. FREIRE, D. M. G., DI LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2008; 83:47–54.

VICENTE, A.A. Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica. 2000. 224 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). 2000. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000; 9:113-148.

WU, W. H.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W. N.; PHILLIPS, J. G. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1999; 76: 517–521.

YADAV, G. D.; LATHI, P.S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: Kinetic studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004; 27: 113-119.

YEE, L.; AKOH, C.C.; PHILLIPS, R.S.. Lipase PS-catalyzed transesterification of citronellyl butirate and geranyl capronate: effect of reaction parameters. *JAOCS*. 1997; 74(3):255-260.

YESILOGLU, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry*. 2005;40:2155-2159.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. *Enzymes and Microbial Technology*. 1996; 19:107-117.

XIE, W., MA, N. Immobilized Lipase on Fe₃O₄ Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production. *Energy & Fuels*. 2009; 23:1347–1353.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; Enzimas imobilizadas in: Enzimas como agentes biotecnológicos, Said, S. & Pietro, R. C. L. R., Ed. Legis Summa.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. *Ribeirão Preto: Legis Summa*. 2004; 35-86.

ZENEVICZ, M. C. P.. Avaliação da atividade enzimática de lipases e aplicações em reações de interesse utilizando GLP pressurizado. 2011. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

ZHONG, H. ; FANG, Z.; ZOU, B.; LI, X.; OUYANG, P.; GUO, K.. Studies on the lipase-catalyzed esterification of alkyl oleates in solvent-free systems. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*. 2013; 90: 114-117.

ANEXO I

Cromatogramas gerados durante análise das conversões das reações de esterificação enzimática de Geraniol e Acido Propiônico, quando utilizado como biocatalizador, os extratos enzimáticos obtidos pelo fungo filamentoso PC, em suas diferentes formas de apresentação, bem como da enzima comercial de pâncreas suíno.

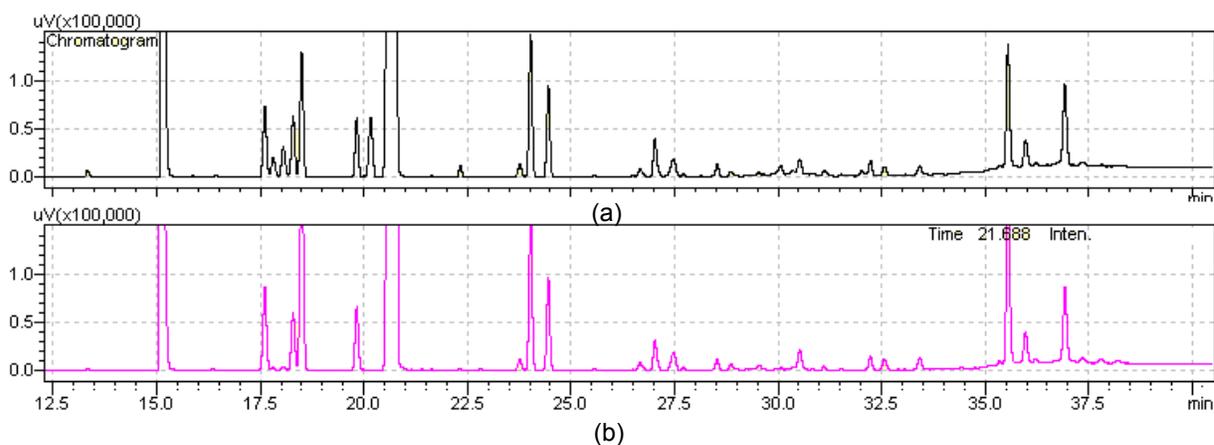


Figura 1 – Cromatogramas comparativos de geraniol e ácido propiônico catalisada por EEP (a) e o branco (sem a adição do biocatalizador) (b).

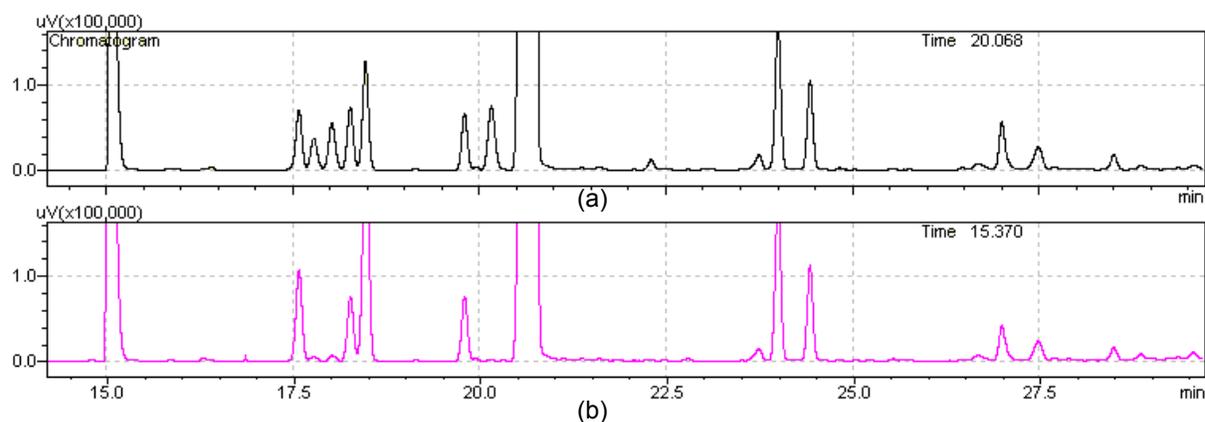


Figura 2 – Cromatogramas comparativos entre a reação de geraniol e ácido propiônico catalisada por EEB (a) e o branco (b).

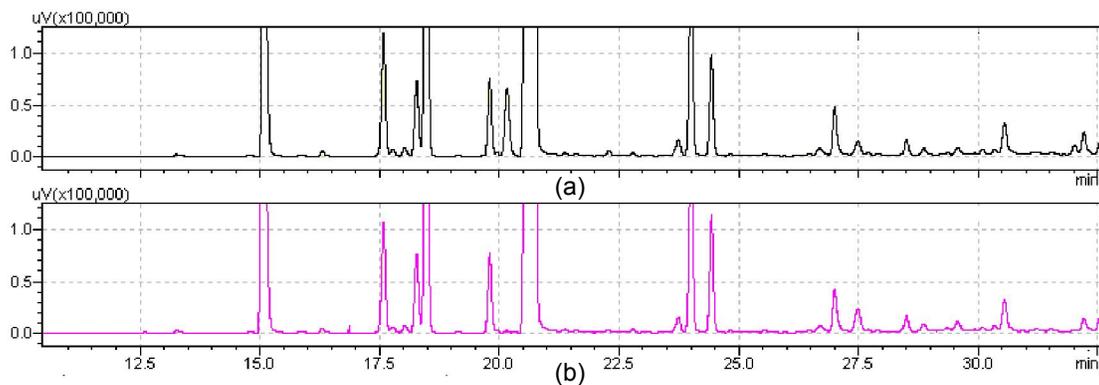


Figura 3 – Cromatogramas comparativos entre a reação de geraniol e ácido propiônico catalisada por EEBI (a) e o branco (b).

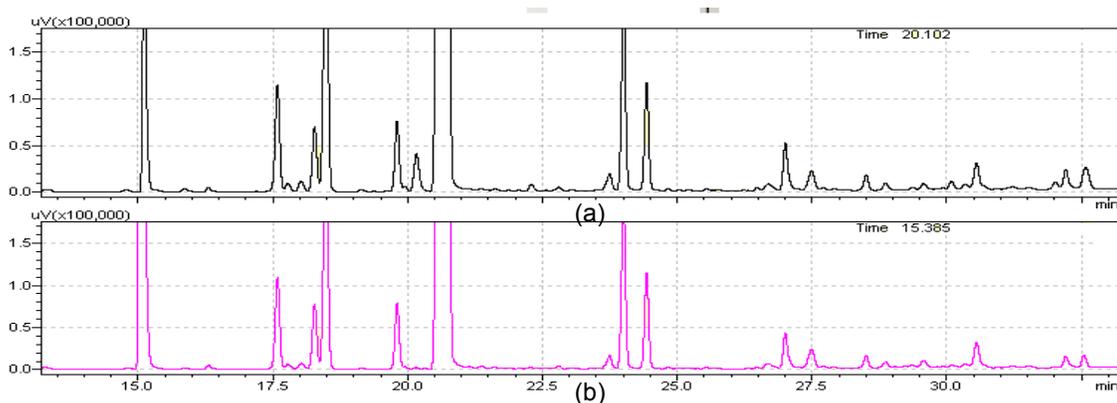


Figura 4 – Cromatogramas comparativos entre a reação de geraniol e ácido propiônico catalisada por EEPI (a) e o branco (b).

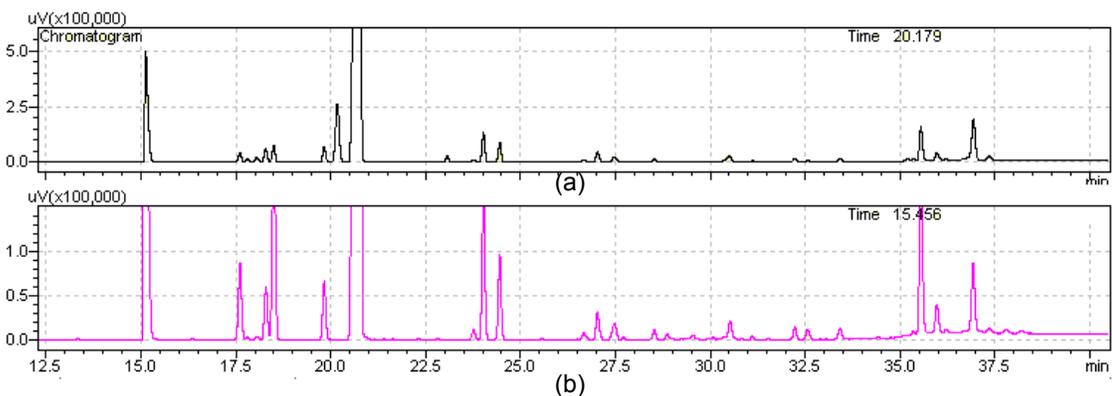


Figura 5 – Cromatogramas comparativos entre a reação de geraniol e ácido propiônico catalisada por ECL (a) e o branco (b).

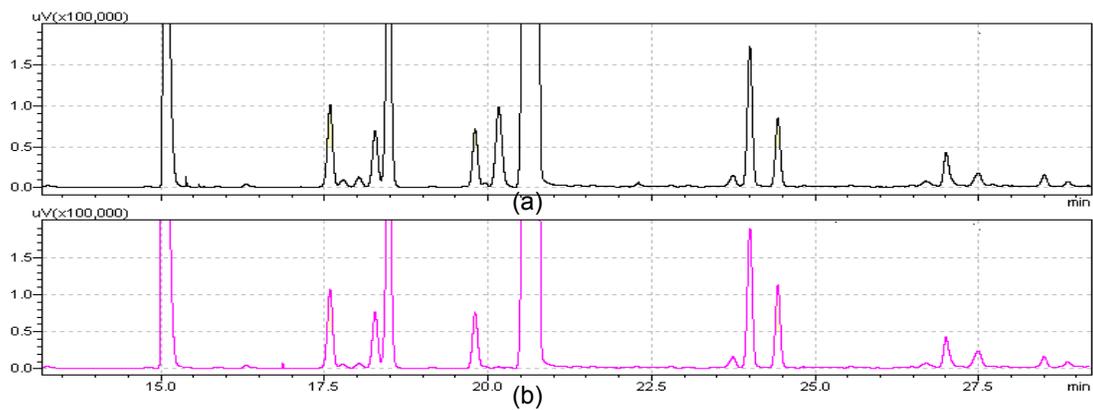


Figura 6 – Cromatogramas comparativos entre a reação de geraniol e ácido propiônico catalisada por ECl (a) e o branco (b).