

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GUILHERME DE SOUSA SILVA

Imobilização de lipase em matriz polimérica para produção de bioaroma

Pirassununga

2012

GUILHERME DE SOUSA SILVA

Imobilização de lipase em matriz polimérica para produção de bioaroma

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho

Pirassununga
2012

A Deus

*Aos meus pais Antonio e Vera Lúcia,
por todo esforço que fizeram para educar seus filhos.*

*À minha amada Patricia,
que tem sido meu apoio e fortaleza.*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho, por ter contribuído para minha formação acadêmica, pelas valorosas contribuições no trabalho e na confecção desta dissertação e, acima de tudo, pela confiança;

À Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura, pelas contribuições no trabalho e em minha formação acadêmica e por esses anos de convívio e amizade;

À Pós Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de ter sido aluno desta faculdade e aos professores da pós graduação pelos conhecimentos transmitidos;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Gelson de Andrade Conceição pela imprescindível ajuda intelectual e também pela colaboração na execução de parte analítica deste trabalho;

Às alunas de iniciação científica Isabelle Mattos e Paula Granço pela ajuda na condução do trabalho;

Aos meus queridos amigos do Departamento de Engenharia de Alimentos;

Aos grandes amigos que fiz nesta pós-graduação;

Ao amigo Edson Correia Reche, da livraria Edusp, pela colaboração na obtenção de literaturas importantes para o trabalho;

Aos amigos Claudio Cardoso, Cesar Costa, Fabio Jacintho, Johnata Albert e Wallace Bruno, pela boa companhia e pelos bons momentos de distração;

Aos meus pais pelos momentos de amor e carinho, pelo sempre incondicional apoio;

Aos meus irmãos Gustavo, Gabriel, Carol, pela energia positiva que sempre despejam sobre mim;

Às minhas queridas tias;

Aos meus sogros, Mauricio e Cristina, e meus cunhados, Daniel e Leandro, pelo carinho e paciência nos momentos em que estive ausente;

Aos sobrinhos Vittor e Miguel, e meu afilhado Marcelo Henrique, anjos em minha vida.

À minha amada esposa Patricia que sempre sorridente e amável, foi fundamental nesta caminhada.

RESUMO

SILVA, G.S. **Imobilização de lipase em matriz polimérica para produção de bioaroma.** 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Os ésteres são importantes compostos orgânicos, obtidos por síntese química ou extraídos de alguns produtos naturais utilizando-se solvente em meio adequado. Estudos mostram que enzimas, em particular lipases, podem ser aplicadas na síntese de diversos ésteres. O principal objetivo deste trabalho foi a obtenção de acetato de butila, um éster de aroma característico de abacaxi, utilizando lipase de *Geotrichum candidum* produzida em fermentação submersa e imobilizada em matriz polimérica de alginato de bário e gelatina reticulada com glutaraldeído. A caracterização bioquímica foi realizada tanto para a lipase na forma livre como para a lipase na forma imobilizada. O rendimento em conversão molar de substrato foi determinado por cromatografia gasosa. A enzima apresentou atividade enzimática máxima após 48 horas de fermentação de 37,7 U/mL. Os valores ótimos para pH e temperatura da enzima na forma livre e imobilizada foram pH 6,5 e 40 °C e pH 7,5 e 45 °C, respectivamente. A enzima na forma livre foi estável do pH 6,0 ao 8,0 e à temperatura de 35 a 45 °C, já na forma imobilizada, foi estável do pH 5,5 ao 8,5 e na faixa de temperatura de 30 a 55 °C. A lipase imobilizada teve seus parâmetros cinéticos determinados, e os valores obtidos para o K_m e V_{max} , foram 0,115 mmol e 0,718 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. As melhores condições de síntese do bioaroma para a enzima na forma livre foram: temperatura de 30 °C, 12,5% de enzima em relação à quantidade de butanol utilizada, proporção molar do substrato 60% de acetato de vinila em um período de 24 horas. O rendimento alcançado neste caso foi de 97,2% de conversão molar em acetato de butila. Para a enzima imobilizada as melhores condições foram: temperatura de 45 °C, 12,5% de enzima em relação à quantidade de butanol utilizada, proporção molar do substrato 60% de acetato de vinila em um período de 24 horas. O rendimento alcançado neste caso foi de 99,1%, que demonstra que lipase produzida por *Geotrichum candidum* na forma imobilizada apresenta excelente capacidade de sintetizar acetato de butila (bioaroma de abacaxi).

Palavras-chave: Acetato de butila; parâmetros cinéticos; enzima; biocatálise; *Geotrichum candidum*

ABSTRACT

SILVA, G.S. **Immobilization of lipase on polymer matrix for synthesis of flavor**. 2012. 88 f. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Esters are important organic compounds obtained by chemical synthesis or derived from some natural products using a solvent in appropriate medium. Studies have shown that enzymes, particularly lipases, can be applied in the synthesis of various esters. The main objective of this study was to obtain butyl acetate, a characteristic ester aroma of pineapple, using lipase from *Geotrichum candidum* produced in submerged fermentation and immobilized in a barium alginate and gelatin polymer matrix crosslinked with glutaraldehyde. The biochemical characterization was performed for both free and immobilized lipases. The yield in molar conversion of substrate was determined by gas chromatography. The enzyme showed maximum enzymatic activity after 48 hours of fermentation of 37.7 U/mL. The optimum values for pH and temperature of the enzyme in free and immobilized form were pH 6.5 and 40 °C and pH 7.5 and 45 °C, respectively. The enzyme was stable in free form from pH 6.0 to 8.0 and at temperatures from 35 to 45 °C, and in the immobilized form from pH 5.5 to 8.5 and at temperatures from 30 to 55 °C. Kinetic parameters of the immobilized lipase were determined, and the values obtained for K_m and V_{max} were 0.115 mmol and $0.718 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively. The best conditions for the synthesis of flavor by enzyme in free form were: 30 °C of temperature, 12.5% of enzyme for the amount of butanol used, and molar ratio of substrate 60% of vinyl acetate in a 24 hours period. The yield achieved in this case was 97.2% of molar conversion in butyl acetate. For the immobilized enzyme the best conditions were: 45 °C of temperature, 12.5% of enzyme for the amount of butanol used, and molar ratio of substrate 60% of vinyl acetate in a 24 hours period. The yield achieved in this case was 99.1%, demonstrating that lipase produced by *Geotrichum candidum* in immobilized form has an excellent ability to synthesize butyl acetate (pineapple flavor).

Keywords: Butyl acetate; kinetic parameters; enzyme; biocatalysis; *Geotrichum candidum*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Reações catalisadas por lipase.....	25
Figura 2 - Vantagens da imobilização de enzimas	26
Figura 3 - Perfil da fermentação submersa de <i>Geotrichum candidum</i> na atividade enzimática e pH do caldo bruto.....	48
Figura 4 - Efeito do pH na atividade e na estabilidade da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na forma livre (a) e imobilizada em alginato de cálcio e gelatina (b)	50
Figura 5 - Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na forma livre (a) e imobilizada em alginato de cálcio e gelatina (b).....	52
Figura 6 - Estudo do efeito do substrato óleo de oliva na atividade da lipase imobilizada de <i>Geotrichum candidum</i>	54
Figura 7 - Diferentes modelos de ajustes da equação de Michaelis-Menten para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> imobilizada em alginato de cálcio e gelatina..	55
Figura 8 - Atividade enzimática da lipase imobilizada de <i>Geotrichum candidum</i> em meio ciclohexano durante 24 horas...	57
Figura 9 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados das variáveis na síntese de acetato de butila por lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na forma livre.....	61
Figura 10 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados das variáveis na síntese de acetato de butila por lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na forma imobilizada..	66
Figura 11 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a porcentagem de rendimento de acetato de butila em função da temperatura e porcentagem de acetato de vinila (a) e (b) e de temperatura e porcentagem de acetato de vinila (c) e (d).....	69
Figura 12 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a porcentagem de rendimento de acetato de butila em função da temperatura e tempo (a) e (b), e da porcentagem de enzima e porcentagem de acetato de vinila (c) e (d)..	70

Figura 13 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a porcentagem de rendimento de acetato de butila em função da temperatura e tempo (a) e (b), porcentagem de enzima e acetato de vinila (c) e (d).. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos produtores de lipase.....	19
Tabela 2 - Atividade enzimática e saturação de lipases precipitadas com sulfato de amônio descritas na literatura	22
Tabela 3 - Aplicações de lipases conforme tipo de reação catalisada	24
Tabela 4 - Características bioquímicas de lipases produzidas por microrganismos do gênero <i>Penicillium</i>	31
Tabela 5 - Composição do meio de manutenção do <i>Geotrichum candidum</i>	39
Tabela 6 - Composição do meio de cultura do <i>Geotrichum candidum</i>	40
Tabela 7 - Planejamento experimental 2 ⁴ para a resposta rendimento na produção de aroma de abacaxi (acetato de butila) utilizando a lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na forma livre e imobilizada em matriz polimérica	46
Tabela 8 - Atividade enzimática da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> durante 96 horas de fermentação	47
Tabela 9 - Valores das velocidades iniciais da lipase imobilizada em alginato de bário e gelatina para diferentes concentrações de substrato	54
Tabela 10 - Valores de K_m e V_{max} da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> imobilizada em alginato de bário e gelatina reticulados com glutaraldeído	56
Tabela 11 - Planejamento experimental 2 ⁴ para a resposta rendimento na produção de aroma de abacaxi utilizando lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na forma livre	59
Tabela 12 - Efeitos estimados das variáveis para a obtenção de bioaroma de abacaxi por lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na forma livre	60
Tabela 13 - Coeficientes de regressão para a obtenção de bioaroma de abacaxi por lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na forma livre	62

- Tabela 14** - Análise da variância do planejamento fatorial 2^4 para o rendimento na produção de bioaroma de abacaxi por síntese com lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre 63
- Tabela 15** - Planejamento experimental 2^4 para a resposta rendimento na produção de aroma de abacaxi utilizando lipase de *Geotrichum candidum* na forma imobilizada..... 64
- Tabela 16** - Efeitos estimados das variáveis para a obtenção de bioaroma de abacaxi por lipase de *Geotrichum candidum* na forma imobilizada em matriz polimérica 65
- Tabela 17** - Coeficientes de regressão para a obtenção de bioaroma de abacaxi por lipase de *Geotrichum candidum* na forma imobilizada em matriz polimérica 67
- Tabela 18** - Análise da variância do planejamento fatorial 2^4 para o rendimento na produção de bioaroma de abacaxi por síntese com lipase de *Geotrichum candidum* na forma imobilizada em matriz polimérica 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AOT	Surfactante di-etilhexil sulfocinato de sódio
FES	Fermentação no estado sólido
FS	Fermentação submersa
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection
p-NPP	p-Nitrofenilpalmitato
RDF	Relação de fatores dependentes
RIF	Relação de fatores independentes
TAG	Triacilglicerois

LISTA DE SÍMBOLOS

NH_4NO_3	Nitrato de Amônio
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
CaCl_2	Cloreto de Cálcio
mM	Milimolar
U/mg	Atividade enzimática específica em miligramas de proteína
K_m	Constante de Michaelis-Menten
V_{\max}	Velocidade máxima
mM/min	Milimolar por minuto
SiO_2	Dióxido de silício (sílica)
mM/mg	Milimolar por miligrama
mM/mL/min	Milimolar por mililitro por minuto
M	Molar
UI	Unidade internacional de atividade enzimática
CaCO_3	Carbonato de Cálcio
rpm	Rotações por minuto
NaOH	Hidróxido de Sódio
V	Velocidade de reação
S	Concentração de substrato
μm	Micrometro
m	Metro
mm	Milímetro
t	Tempo
VVM	Volume de ar por volume de meio por minuto
U/mL	Unidades por mililitro

$\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ Micromol por mililitro por minuto

mM mg^{-1} Milimolar por miligrama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Lipases	17
2.1.1 Fontes de lipases	18
2.1.2 Vantagens do uso de lipases	20
2.1.3 Purificação de lipases	21
2.1.3.1 Precipitação de lipases	22
2.1.3.2 Liofilização de lipases	23
2.1.4 Aplicação de lipases	23
2.2 Imobilização de enzimas	26
2.2.1 Suportes para imobilização	27
2.2.2 Parâmetros que influenciam na imobilização de enzimas para uso em meio orgânico	29
2.3 Caracterização de lipases	29
2.4 Cinética enzimática	31
2.5 Produção de aromas por via biotecnológica	33
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 Produção da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	39
4.1.1 Fermentação	39
4.1.2 Precipitação da enzima com sulfato de amônio e liofilização	40
4.2 Imobilização da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	40

4.3	Determinação da atividade enzimática da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	41
4.4	Caracterização bioquímica da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	42
4.4.1	Efeito do pH	42
4.4.1.1	Determinação do pH ótimo	42
4.4.1.2	Determinação do pH de estabilidade	43
4.4.2	Efeito da temperatura	43
4.4.2.1	Determinação da temperatura ótima	43
4.4.2.2	Determinação da temperatura de estabilidade	44
4.5	Determinação dos parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) da lipase imobilizada de <i>Geotrichum candidum</i>	44
4.6	Método de esterificação para obtenção de bioaroma	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Produção da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	47
5.2	Caracterização bioquímica da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	49
5.2.1	Efeito do pH da lipase livre e imobilizada	49
5.2.2	Efeito da temperatura da lipase livre e imobilizada	51
5.2.3	Determinação dos parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) da lipase na forma imobilizada	53
5.3	Efeito do ciclohexano na atividade enzimática de lipase imobilizada de <i>Geotrichum candidum</i> em um período de 24 horas	57
5.4	Produção de acetato de butila (aroma de abacaxi)	58
5.4.1	Produção de acetato de butila utilizando lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na forma livre	58
5.4.2	Produção de acetato de butila utilizando lipase imobilizada de <i>Geotrichum candidum</i>	63
6	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a produção de alimentos está cada vez mais voltada para a qualidade do produto final e suas implicações no meio ambiente, o que vem acontecendo justamente no momento em que novas tecnologias de controle surgem, novas exigências de mercado aparecem e restrições de consumo e produção crescem diariamente. Em paralelo, há uma mudança de conceito da população, que vem exigindo um produto final de melhor qualidade ao encontro do conceito de sustentabilidade e respeito aos recursos naturais e que sejam benéficos à saúde. É neste contexto que este trabalho se insere, apresentando o estudo da obtenção de bioaromas, utilizando a enzima lipase, imobilizada em matriz polimérica, como catalisador de reação de esterificação.

Os ésteres são importantes compostos orgânicos, obtidos por síntese química ou extraídos de alguns produtos naturais, utilizando-se solvente em meio adequado (ROBERTS; CASERIO, 1997). Estudos mostram que enzimas, em particular lipases, podem ser aplicadas na síntese de diversos ésteres. Os processos que utilizam enzimas como catalisadores podem ser conduzidos em condições brandas de pressão, temperatura e pH, quando comparados a catalisadores inorgânicos (SKORONSKI et al., 2010).

No entanto, enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, que podem ocorrer quando estocadas ou durante o uso (ABBAS; COMEAU, 2003). Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo e também para que a enzima possa ser reutilizada, há necessidade de proteger as enzimas das interações com o solvente no qual é realizada a reação. Frente a este problema, a técnica de imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização e, portanto, redução de custos.

A lipase obtida do fungo imperfeito *Geotrichum candidum* é reconhecida por ser específica para ácidos graxos de cadeia longa com duplas ligações cis-9, como ácidos oleico e linoleico (CARVALHO et al., 2003). A indústria tem mostrado grande interesse em lipases e nas vantagens operacionais proporcionadas pelo uso de enzimas na síntese de ésteres, bem como suas características atrativas para a venda desses compostos, uma vez que, quando produzidos por via biológica, por fermentação ou com enzima como catalisador, podem ser considerados naturais, o que os tornam mais atrativos comercialmente.

Produzir compostos químicos de aroma por meio de biossíntese, obter perfis de aroma que são considerados naturais pelos consumidores, e a potencialidade para o aumento da escala de produção que atenda o mercado em um processo menos agressivo ao meio ambiente, são fatores que tornam este estudo bastante atrativo e importante para o atual contexto mundial de produção.

Assim, o impacto deste trabalho na ciência e tecnologia é o de viabilizar a produção da lipase e sua imobilização em matriz polimérica, possibilitando, posteriormente, a obtenção de aromas naturais por meio de reações enzimáticas e visando também a redução de custos e resíduos no meio ambiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste tópico será feita uma abordagem sobre lipases, desde sua produção, imobilização e síntese de bioaromas. A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações devido à alta especificidade catalítica em comparação com catalisadores convencionais, e ao fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais de pressão e temperatura ambiente.

2.1 *Lipases*

Lipases (triacilglicerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) são uma classe de hidrolases que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em glicerina e ácidos graxos livres ao longo de uma interface água e óleo. Além disso, as lipases catalisam a hidrólise e transesterificação, bem como a síntese de ésteres, e apresentam propriedades enantiosseletivas. A capacidade das lipases em realizar transformações químicas muito específicas (biotransformação) tem tornado-as cada vez mais populares na área de alimentos, detergentes, síntese, cosméticos e produtos farmacêuticos. (FRANKEN et al., 2010; GRBAVCIC et al., 2007; GUPTA; SAHAI; GUPTA, 2007; PARK et al., 2005).

Lipases são produzidas por animais, plantas e microrganismos (KAMIMURA et al., 1999; OZYILMAZ; GEZER, 2010; SIQUEIRA, 2012). Lipases microbianas ganharam atenção especial da indústria devido a sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade de substrato (DUTRA et al., 2008; GRIEBELER et al., 2011).

Lipases têm emergido como um dos principais biocatalisadores com comprovado potencial para contribuir com a multibilionária e subexplorada bioindústria, e em suas várias aplicações (JOSEPH; RAMTEKE; KUMAR, 2006). Sua importância tem sido observada também pelo grande número de artigos publicados recentemente, sendo que, ao longo dos últimos anos, cresceu o número de publicações que relatam o uso industrial de lipases catalisando reações realizadas em solventes orgânicos, meios iônicos e não convencionais (TREICHEL et al., 2010).

2.1.1 Fontes de lipases

Lipases de origem microbiana representam a classe mais usada de enzimas em aplicações biotecnológicas e de química orgânica (TREICHEL et al., 2010). Lipases produzidas por fungos filamentosos são as mais importantes comercialmente, sendo os gêneros mais comuns: *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. (TREICHEL et al., 2010). Lipases produzidas por fungos filamentosos, assim como as produzidas por bactérias e leveduras, variam de acordo com a composição do meio de crescimento, condições de cultivo, pH, temperatura e os tipos de fontes de nitrogênio (CIHANGIR; SARIKAYA, 2004).

Na produção de enzimas e outros metabólitos, a fermentação pode ser submersa (FS) ou em estado sólido (FES). Bianchi, Moraes e Capalbo (2001, p.247) definiram a FES como “[...] processos que referem-se a cultura de microrganismos sobre ou dentro partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está com uma quantidade atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida”. Neste caso, o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2006; RAHARDJO; TRAMPER; RINZEMA, 2006). Já na FS, os substratos são dissolvidos em meio líquido.

Tradicionalmente, obtêm-se as enzimas e metabólitos microbianos por fermentação submersa. Em fermentação submersa há um melhor controle do processo, além de que a recuperação de enzimas extracelulares e determinação de biomassa são facilitadas (FERNANDES, 2007). A Tabela 1 apresenta microrganismos com capacidade de produzir lipase por fermentação.

Tabela 1 - Microrganismos produtores de lipase.

Microrganismo	Referências	
	Fermentação submersa	Fermentação em estado sólido
Fungos		
<i>Aspergillus carneus</i>	Kaushik et al. (2006)	
<i>Aspergillus niger</i>		Dutra et al. (2008), Mala et al. (2007), Falony et al. (2006)
<i>Aspergillus sp.</i>	Cihangir e Sarikaya (2004)	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006)	
<i>Penicillium citrinum</i>	D'Annibale et al. (2006)	
<i>Penicillium restrictum</i>	Azeredo et al. (2007)	Palma et al. (2000), Azeredo et al. (2007)
<i>Penicillium simplicissimum</i>		Vargas et al. (2008), Cavalcanti et al. (2005)
<i>Penicillium verrucosum</i>	Pinheiro et al. (2008)	Kempka et al. (2008)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Tan e Yin (2005), Yang et al. (2005)	
<i>Rhizopus chinensis</i>	Teng, Xu e Wang (2009), Wang, Xu e Shan (2008), Teng e Xu (2008)	Sun e Xu (2008)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Diaz et al. (2006)	Diaz et al. (2006)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Cos et al. (2005), Surribas et al. (2007)	
<i>Rhizopus sp.</i>	Bapiraju et al. (2005)	Martínez-Ruiz et al. (2008)
Fungos imperfeitos		
<i>Geotrichum candidum</i>	Burkert et al. (2005)	
<i>Geotrichum sp.</i>	Yan e Yan (2008), Kamimura et al. (1999), Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004)	
Leveduras		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Liu et al. (2008)	
<i>Candida cylindracea</i>	Kim e Hou (2006), D'Annibale et al. (2006)	
<i>Candida rugosa</i>	Rajendran, Palanisamy e Thangavelu (2008), Boareto et al. (2007), Puthli, Rathod e Pandit (2006), Zhao et al. (2008)	Benjamin e Pandey (2001)
<i>Candida sp.</i>	He e Tan (2006)	
<i>Candida utilis</i>	Grbavcic et al. (2007)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Potumarthi et al. (2008)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ciafardini, Zullo e Iride (2006)	
<i>Trichosporon asahii</i>	Kumar e Gupta (2008)	
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Conceição et al. (2011)	
<i>Williopsis californica</i>	Ciafardini, Zullo e Iride (2006)	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lopes et al. (2009), Alonso et al. (2005), Kar et al. (2008), Fickers et al. (2006), Amaral et al. (2007)	Domínguez et al. (2003)
Bactérias		
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Li et al. (2005)	
<i>Bacillus coagulans</i>		Alkan et al. (2007)
<i>Bacillus sp.</i>	Ertugrul, Donmez e Takaç (2007), Shariff et al. (2007), Nawani e Kaur (2007)	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Abada (2008)	
<i>Bacillus subtilis</i>	Takaç e Marul (2008)	
'Biopetro-4'	Carvalho et al. (2008)	
<i>Burkholderia cepacia</i>		Fernandes et al. (2007)
<i>Burkholderia multivorans</i>	Gupta, Sahai e Gupta (2007)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ruchi, Anshu e Khare (2008)	Mahanta, Gupta e Khare (2008)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Kiran et al. (2008)	
<i>Serratia rubidaea</i>	Immanuel et al. (2008)	
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	Volpato et al. (2008)	

Adaptado de Treichel et al. (2010), atualizada neste trabalho.

Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004) estudaram a otimização da produção de lipase extracelular de *Geotrichum* sp utilizando planejamento experimental. A metodologia da superfície de resposta foi aplicada no estudo dos efeitos da fonte de carbono (óleo de soja,

óleo de oliva e glicose) e da concentração de nitrogênio (água de maceração de milho e NH_4NO_3), para produção da lipase. Um planejamento fatorial 2^3 foi utilizado e as condições ótimas obtidas foram nitrato de amônio (2,1 a 2,5%), água de maceração de milho (13 a 15%), óleo de soja (0,6%) e nitrato de amônio (0,8 a 1%), obtendo uma atividade da lipase em torno de 17 U/mL.

Yan e Yan (2008) testaram a combinação de diferentes *designs* experimentais para otimizar diferentes condições de produção de lipase por *Geotrichum* sp. A melhor fonte de carbono obtida foi a mistura de óleo de oliva e ácido cítrico, e a melhor fonte de nitrogênio foi a água de maceração de milho e NH_4NO_3 .

2.1.2 Vantagens do uso de lipases

Biocatalisadores têm sido comumente utilizados em muitas aplicações industriais (SANT'ANNA JÚNIOR, 2001). A razão principal é que os catalisadores químicos mostram várias desvantagens, bem como produzem uma grande variedade de subprodutos e efluentes tóxicos (CONTESINI et al., 2010). A utilização de células ou de enzimas tem gradualmente substituído catalisadores químicos devido à sua grande seletividade para o substrato, além disso, eles são biodegradáveis e podem atuar em condições ambiente (JANSSENS et al., 1992).

O uso de enzimas nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados pela natureza (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Devido a sua excelente capacidade regioseletiva numa variedade de solventes orgânicos e substratos, lipases têm emergido como um importante biocatalisador em aplicações biomédicas (PANDEY et al., 1999). A utilização de lipases em processos industriais apresenta vantagens como estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizadas, podem ser submetidas às condições industriais típicas, com reatores com temperaturas superiores a 70 °C por longos períodos de tempo (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A versatilidade das lipases faz com que estas possuam um vasto potencial de aplicação em alimentos, fármacos, cosméticos, na indústria de detergentes, couro, têxtil e papelaria (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

Embora lipases vêm sendo produzidas em larga escala e aplicadas comercialmente, o uso pleno desta enzima passa necessariamente pela redução de custos de produção e pesquisas, desde a seleção de novos microrganismos produtores, de melhoramento genético, de modificações no meio de cultura e de otimização das condições de cultivo e dos sistemas de produção (GUTARRA, 2003).

2.1.3 Purificação de lipases

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou células animais constitui etapa complexa do processo, dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). A purificação da proteína é feita normalmente em uma série de passos sequenciais que envolvem uma combinação de técnicas diferentes, e o efeito desta sequência e o número de vezes que cada passo é utilizado é analisado (LUCARINI; KILIKIAN; PESSOA JÚNIOR, 2005). Para se maximizar o rendimento de recuperação e purificação com base na natureza da lipase produzida pelo microrganismo, devem-se utilizar métodos envolvendo a precipitação e etapas de cromatografia, no entanto, deve-se também levar em consideração a pureza da enzima necessária para o seu uso, o que é importante do ponto de vista econômico (SAXENA et al., 2003b)

2.1.3.1 Precipitação de lipases

A precipitação é uma das operações mais adotadas, tanto em escala de laboratório quanto industrial, para purificação de proteínas de origem microbiana, animal ou vegetal. Em soluções aquosas a precipitação pode ocorrer com o aumento (*salting-out*) ou diminuição (*salting-in*) da concentração de sais (PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003). A precipitação por sais ocorre por neutralização das cargas superficiais da proteína e redução da camada de hidratação, favorecendo a concentração de resíduos hidrofóbicos (LUCARINI; KILIKIAN; PESSOA JÚNIOR, 2005).

Um dos métodos mais empregados para precipitação de lipases é o fracionamento por sulfato de amônio (MENONCIN, 2007). A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de precipitação de lipases por sulfato de amônio.

Tabela 2 – Atividade enzimática e saturação de lipases precipitadas com sulfato de amônio descritas na literatura.

Fonte	Atividade enzimática	Saturação	Autor
<i>Antrodia cinnamomea</i>	188,7 U	70%	Shu, Xu e Lin (2006)
<i>Bacillus</i> – RSJ 1	2425 U	30 a 70%	Sharma et al. (2002)
<i>Candida rugosa</i>	18,14 U/mL	20 a 100%	Benjamin e Pandey (2001)
<i>Kurtzmanomices</i> sp. l-11	4,860 U	80%	Kakugawa et al. (2002)
<i>Mucor</i> sp	118099 U	75%	Abbas et al. (2002)
Pâncreas de avestruz	116000 U	60%	Bacha et al. (2005)
<i>Penicillium restrictum</i>	31,038 U	80%	Jesus et al. (1999)
<i>Pseudomonas</i>	14,750 U	60%	Kanwar, Gogoi e Goswami (2002)
<i>Rizhopus</i> sp	135600 U	70%	Pastore, Costa e Koblitz (2003)

(Adaptado de Menoncin, 2007)

2.1.3.2 Liofilização de lipases

A liofilização pode ser definida como o processo de secagem de um produto previamente congelado em que a maior parte da água é removida por sublimação, sendo que, em biotecnologia, o interesse fundamental se prende à água (PITOMBO, 2005). A liofilização é reconhecida como melhor método para obtenção de produtos desidratados de alta qualidade, extremamente útil na secagem de produtos biológicos (WANG; MEI, 2007). Como qualquer outro processo de secagem, a liofilização é um processo simultâneo de transferência de calor e massa.

Wang e Mei (2007) estudaram o efeito da ciclodextrina na liofilização de lipases. Os efeitos do tipo e da quantidade de ciclodextrina usada na preparação de lipase foram avaliados, e as propriedades de lipase liofilizada como termoestabilidade e sensibilidade ao pH foram estudados e comparados com os da lipase sem liofilizar. Os resultados mostraram que a lipase liofilizada com ciclodextrinas pode alcançar uma taxa de conversão mais elevada do que a não liofilizada. O comportamento catalítico da lipase liofilizada foi fortemente dependente do tipo de ciclodextrina e meios de reação. A atividade da lipase liofilizada aumentou à medida que aumentou a quantidade de ciclodextrina adicionada. A atividade da lipase liofilizada com ciclodextrinas foi ótima a pH 7,0 e a 40 °C, o que foi semelhante ao da lipase não liofilizada.

2.1.4 Aplicações de lipases

As lipases são biocatalisadores responsáveis por catalisar reações de hidrólise de óleos em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (VILLENEUVE et al., 2000). Diversas aplicações podem ser feitas para lipase, sendo que, além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólises e acidólises) (CARVALHO et al., 2003; GANDHI, 1997), como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Aplicações de lipases conforme tipo de reação catalisada

Tipos de Reações	Áreas de Aplicação	Aplicações	Produtos
Hidrólise	Alimentos (laticínios)	Hidrólise de gorduras do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados
	Química (detergentes)	Remoção de manchas de óleo	Detergentes de uso em lavanderias e domésticos
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	<i>Kits</i> para diagnóstico
Esterificação	Indústria fina geral	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes
	Indústria alimentícia	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras, flavorizantes e na produção de aromatizantes
	Indústria Farmacêutica	Intermediários em medicamentos	Anti-inflamatórios (naproxeno, ibuprofeno, cetoprofeno, suprofeno)
Transesterificação	Indústria fina geral	Transesterificação em óleos vegetais	Produção de biodiesel

(Adaptado de Durli, 2007)

Lipases são catalisadores extremamente versáteis e muito eficientes, e têm uma posição de destaque em meios reacionais, devido a gama de reações catalisadas por estas enzimas em sistemas orgânicos e com baixo teor de água (BOUAID et al., 2007), como pode ser observado na Figura 1. Lipases possuem capacidade de catalisar reações com uma grande variedade de substratos sintéticos, permitindo o seu uso para a obtenção de diversos compostos (SIQUEIRA, 2012).

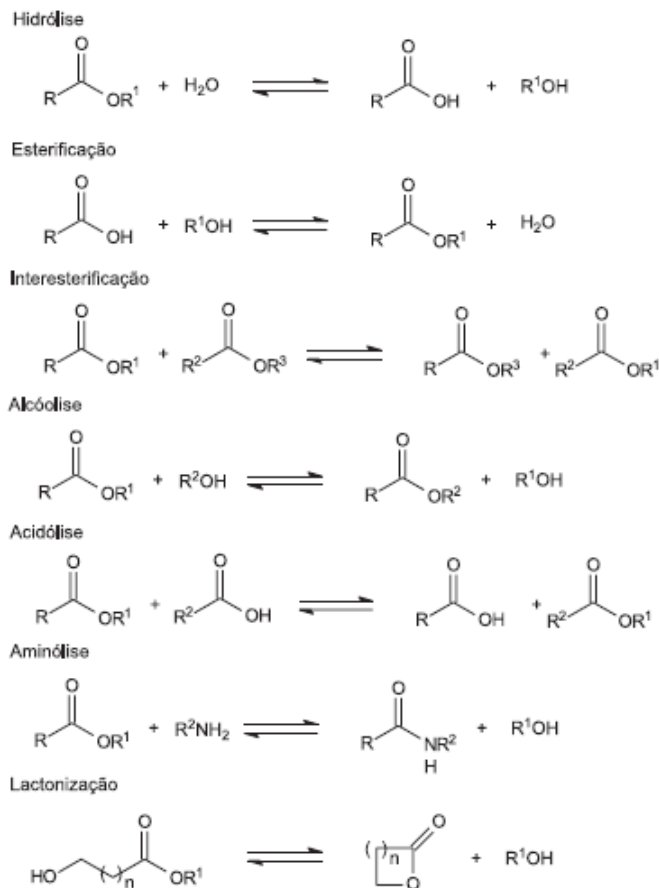


Figura 1 – Reações catalisadas por lipase (PAQUES; MACEDO, 2006)

Lipases podem ser divididas quanto a sua especificidade de acordo com o substrato em substrato específicas, regioseletivas, ácido graxo específicas e enantiosseletivas (PAQUES; MACEDO, 2006; VILLENEUVE et al., 2000).

Nas lipases substrato específicas, a especificidade é definida como a habilidade de hidrolisar um tipo de éster de glicerol. Tais enzimas são hábeis em catálise de hidrólise de triacilgliceróis, mas também de di e monoacilgliceróis, e fosfolipídios no caso de fosfolipases (PAQUES; MACEDO, 2006).

Lipases regioseletivas possuem especificidade em relação à posição, ou seja, a enzima tem habilidade de distinguir entre as duas posições externas do triacilglicerol (éster primário) e a posição interna (éster secundário). Lipases não específicas hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2; Lipases

1,3-específicas – hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos dos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3 (PAQUES; MACEDO, 2006).

Lipases ácido graxo específicas ou tipo seletiva são específicas em relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturações do grupo acila (CARVALHO et al. 2003; PAQUES; MACEDO, 2006).

Lipases enantiosseletivas têm capacidade de discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica. Tal especificidade da lipase pode mudar com o substrato e esta mudança pode ser relacionada à natureza química do éster (KUMAR; GUPTA, 2008).

2.2 Imobilização de enzimas

A imobilização consiste no confinamento da enzima em suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, o que é de grande vantagem econômica (GUISAN, 2006). A principal desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel como catalisador industrial é sua baixa estabilidade (GUISAN, 2006; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005). A imobilização de enzimas, neste contexto, aparece como alternativa interessante. A Figura 2 apresenta algumas vantagens da utilização de enzimas na forma imobilizada.

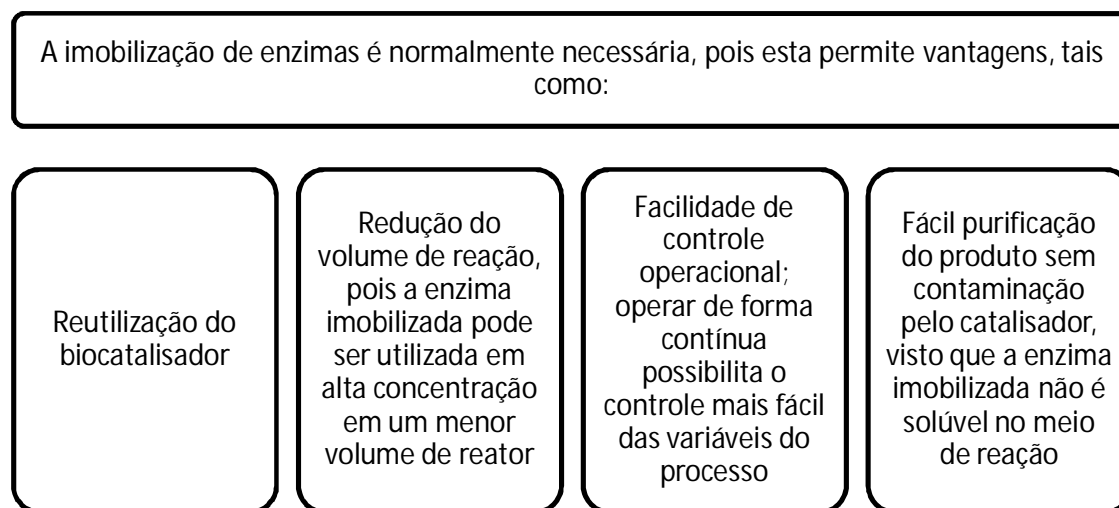


Figura 2-Vantagens da imobilização de enzimas (GUISAN, 2006; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005)

No entanto, a enzima tem sua mobilidade restringida pelo fato de estar ligada a um suporte, o que dificulta a acessibilidade do substrato à mesma, e o que leva a aparente redução da atividade, neste caso provocado por limitações do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Quando um biocatalisador ou uma preparação enzimática é selecionado para determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos também devem ser avaliados e otimizados. As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte, pois a água contribui para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, além de limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

2.2.1 Suportes para imobilização

Inúmeras são as maneiras de imobilizar uma enzima, podendo ser imersas em gel ou microcápsulas, adsorvidas em materiais insolúveis, como resina de troca iônica, copolimerizadas em algum monômero, ligadas a uma matriz polimérica insolúvel ou ainda por ligações covalentes (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; VILLENEUVE et al., 2000).

A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte depende, essencialmente, de dois fatores: a) características peculiares da enzima; b) condições de uso da enzima imobilizada (VITOLLO, 2001). Na seleção de suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como as relativas à possibilidade de regeneração do material, características de inativação e regeneração, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais da enzima imobilizada (MALCATA et al., 1990).

As principais características a serem observadas na seleção do suporte para uma determinada aplicação são área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao

ataque microbiano, resistência mecânica, custos e outras (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

O processo de imobilização e o uso repetido e contínuo do derivado, algumas vezes, requerem o uso de operações como filtração, centrifugação e agitação e, portanto, o suporte deve ter boa resistência mecânica (KENNEDY; CABRAL, 1987).

Uma classe muito importante de suportes no campo da imobilização de biocatalisadores são os polímeros naturais e sintéticos (MATEO et al., 2007). Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar o suporte ideal. No entanto, polímeros naturais levam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradáveis não causando danos ao meio ambiente (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Lipase de *Pseudomonas* sp. foi imobilizada em gel de alginato por Cheirsilp, H-Kittikun e Limkatanyu (2008), e a condição ótima para o aprisionamento de lipase foi uma concentração de alginato de sódio a 2% (m/v) e 100 mM de concentração de CaCl₂. Sob estas condições, a atividade enzimática da lipase imobilizada foi 8,11 U/mL, obtendo-se assim 22,2% de atividade retida.

Marques et al. (2011) estudaram, com o auxílio de planejamento experimental, as seguintes variáveis no processo de imobilização: pH e concentração da solução de alginato de sódio, concentração da solução de cloreto de cálcio, tamanho das esferas produzidas e relação volume alginato/volume solução enzimática. As melhores condições encontradas para o processo foram concentração de alginato de 2%, pH da solução 3,68 e concentração de cloreto de cálcio 200 mM, com uma relação de 40% de volume alginato e 60% de solução enzimática, produzindo esferas de 2 mm de diâmetro. Com essas condições obtiveram uma taxa de imobilização de 68,07%, que representa uma concentração da proteína alvo em 1,68 vezes, e recuperação superior a 99% em um procedimento de etapa única.

2.2.2 Parâmetros que influenciam na imobilização de enzimas para uso em meio orgânico

A influência da natureza do solvente tem sido interpretada em termos de vários fenômenos, tais como a mudança na rigidez da enzima, causada por solventes com alta constante dielétrica, e interações iônicas na proteína (AFFLECK et al., 1992). O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sítio ativo, bem como a variação da energia livre total, que estão associadas com diferentes energias de solvatação do solvente (GRAY, NARANG E BARKER, 1990).

O material usado como suporte para a imobilização afeta a quantidade de água total nas proximidades da enzima e a partição dos reagentes e/ou produtos na mistura reacional (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). Gray, Narang e Barker (1990) verificaram que a atividade da lipase de *Candida cylindracea*, ligada ou não em um suporte, diminuiu quando a quantidade de água era reduzida no sistema.

A imobilização em suportes hidrofílicos pode reduzir a atividade enzimática, devido a mudanças conformacionais (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Os materiais hidrofílicos podem reduzir a solubilidade de substratos hidrofóbicos em regiões hidrofílicas, e o acesso dos substratos ao sítio ativo. Em alguns casos a matriz pode impor uma barreira estérea, resultando em rigidez na estrutura da enzima. Para ser efetivo na imobilização, o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

2.3 Caracterização de lipase

Nas reações químicas, como as catálises enzimáticas, o desenvolvimento da reação irá depender das condições do meio em que a reação ocorre (BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004). Estas características de reações têm particular importância na indústria

de alimentos e na aplicação de processos que envolvem catálise enzimática, apresentando um amplo espectro de condições para o meio. Conhecendo a especificidade da reação enzimática em um determinado ambiente, podemos impor novas condições ao meio e, a partir disso otimizar ou controlar a reação enzimática mediante um processo (SANT'ANNA JÚNIOR, 2001). A atividade enzimática é caracterizada por condições ótimas e condições de estabilidade, dependendo das condições do meio em que a reação ocorre (SHU et al., 2009).

As enzimas, em geral, são ativas em uma faixa limitada de pH e temperatura, definindo-se um pH e temperatura ótimos de atividade. O pH e a temperatura podem também interferir na estabilidade da enzima (MACEDO; PASTORE, 1997).

Saxena et al. (2003a) estudaram a purificação e caracterização da lipase de fungo *Aspergillus carneus* em meio alcalino. A atividade enzimática foi determinada por titulação, usando óleo de oliva como substrato à temperatura de 37 °C. A faixa de pH de estabilidade foi de 8,0 a 10,0, com pH ótimo de 9,0. A atividade máxima apresentada foi a 37 °C.

Hwang et al. (2004) estudaram a estabilidade da lipase produzida por *Bacillus stearothermophilus* L1. Foi utilizado o método de superfície modificada em sílica gel para imobilização e estabilização da lipase. Dois fatores afetaram a estabilidade da enzima, o primeiro está relacionado com as reações de fatores independentes (RIFs), o segundo está relacionado com as reações de fatores dependentes (RDFs). As RIFs incluem as condições do meio, como pH e temperatura. As RDFs incluem as limitações do substrato e a produção de inibidores. As condições do meio de hidrólise de óleo pela lipase livre e imobilizada foram mantidas em pH 10 à temperatura de 50 °C.

Shu et al. (2009) fizeram a caracterização bioquímica de lipase produzida por *Rhizopus chinensis*, e o pH ótimo da lipase foi entre pH 8,0 e 8,5 (587,5 U/mg), utilizando pNPP (p-Nitrofenilpalmitato) como substrato. Esta enzima foi mais estável na faixa de pH de 6,0 a 6,5, e de 100% e 90% da atividade inicial foi alcançada após 1 hora de incubação a pH 6,0 e 6,5, respectivamente. A enzima foi também bastante estável em pH 7,0 e 5,5, sendo que 78% e 80% da atividade inicial foram obtidas, respectivamente. Porém, a atividade hidrolítica diminuiu acentuadamente quando incubada a pH ácido (inferior a 5,0) ou pH alcalino (acima de 8,5), uma vez que mais de 80% da atividade original foi perdida. A temperatura ótima para a atividade de lipase foi de 40 °C (587,5 U/mg), mantendo-se estável até 40 °C durante 60 minutos. A 50 e 60 °C, a estabilidade diminuiu para 40% e 20%, respectivamente, mas quando a enzima foi incubada a 70 °C, foi quase completamente inativada.

Panzanaro et al. (2010) fizeram a caracterização bioquímica de lipases de azeitonas, a lipase que é a primeira enzima da via de degradação de triacilgliceróis armazenados (TAG). A

atividade da lipase foi determinada na camada de gordura obtida após centrifugação do homogenato mesocarpo de oliva. O efeito do pH sobre a taxa relativa de hidrólise de trioleína foi determinado por incubação de amostras em um intervalo de pH de 3,0 a 9,0. A lipase foi, aparentemente, inativa abaixo de pH 3,0 e, acima de pH 8,0 uma atividade ótima foi registrada a pH 6,5, sugerindo que a enzima seja menos estável a pH elevado. A atividade catalítica da lipase foi testada a diferentes temperaturas (25 a 45 °C), e um máximo de atividade foi registrado a 35 °C.

Ülker e Karaoglu (2012) purificaram e caracterizaram a lipase produzida por *Mucor hiemalis*, e o pH ótimo e a temperatura ótima da lipase obtida foram 7,0 e 40 °C, respectivamente. A atividade da enzima foi estável no intervalo de pH de 7,0 a 9,0. Os ensaios demonstraram que a lipase foi estável até 50 °C durante 60 minutos.

A Tabela 4 apresenta microrganismos de gênero *Penicillium* com capacidade de produzir lipase e suas características bioquímicas.

Tabela 4 - Características bioquímicas de lipases produzidas por microrganismos do gênero *Penicillium*.

Microrganismo	pH ótimo/ temperatura ótima (°C)	Estabilidade	Referência
<i>Penicillium abeanum</i>	7-8/25-30	Mantém atividade inicial após 16 horas a pH 7,0-8,5, 25 °C	Shimada, Sugihara e Tominaga (2005)
<i>Penicillium. candidum</i>	9,0/35	100% e 70% da atividade residual após 10 minutos à temperatura de 25 e 35 °C, respectivamente.	Ruiz et al. (2001)
<i>Penicillium citrinum</i>	8,0/34-37	Estável na faixa de pH 6,0-7,0, por 2 horas em temperaturas menores que 45 °C	Pimentel et al. (2006)

2.4 Cinética enzimática

Múltiplas abordagens são comumente empregadas para estudar o mecanismo de ação de uma enzima purificada. A cinética enzimática é uma ciência que estuda o mecanismo de uma reação catalisada por uma enzima, determinando assim a velocidade da reação e a

alteração, em função de mudanças nos parâmetros experimentais (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Oliveira et al. (2001), estudaram a esterificação enzimática do etanol e do ácido oleico com formação do oleato de etila, utilizando lipase de *Rhizomucor miehei* na forma livre e imobilizada em suporte de poliamida Accurel EP700. Baseado em um planejamento fatorial 2^3 , previamente desenvolvido, foi possível estudar a cinética das reações. A partir do modelo de Michaelis-Menten, as constantes cinéticas para a reação de esterificação foram determinadas. Os resultados cinéticos da lipase livre foram praticamente os mesmos para os dois substratos ($K_m(\text{etanol}) = 1,79 \text{ M}$; $K_m(\text{oleico}) = 1,80 \text{ M}$), enquanto que para a lipase imobilizada em suporte de poliamida a afinidade foi maior em ácido oleico ($K_m(\text{etanol}) = 1,20 \text{ M}$; $K_m(\text{oleico}) = 1,16 \times 10^{-8} \text{ M}$).

Ye et al. (2005) estudaram a imobilização de lipase de *Candida rugosa* sobre a membrana de dupla camada utilizando o glutaraldeído na superfície de membrana de ácido co-maléico poliacrilonitrila e de clorato de carbonilamida/N-hidroxilamida como agente de acoplamento. Foram determinados os parâmetros cinéticos K_m e V_{\max} da lipase livre, sendo 0,45 mM e 46,4 U/mg, respectivamente, e da lipase imobilizada sobre a membrana de dupla camada, sendo 1,36 mM e 16,1 U/mg, respectivamente.

Estudos realizados por Liu et al. (2008), que após a produção, purificação e caracterização da lipase extracelular de *Aureobasidium pullulans*, determinaram o valor de K_m e V_{\max} da lipase, sendo 0,608 mM e 0,039 mM/min, respectivamente, indicando uma alta afinidade pelo substrato ρ -nitrofenil-laurato.

Simões et al. (2011) estudaram o desempenho da matriz híbrida de SiO_2 -Quitossana na imobilização de lipase microbiana de *Candida rugosa* realizando um estudo comparativo entre o sistema livre e imobilizado em termos de pH, temperatura e parâmetros cinéticos. No sistema livre, o pH de máxima atividade foi 7,0 e a temperatura 45 °C, já para o sistema imobilizado, o pH foi 7,5 e a temperatura foi de 45 a 50 °C. Parâmetros cinéticos foram encontrados, e os valores da equação e K_m indicaram que o processo de imobilização reduziu a afinidade da enzima-substrato, no entanto houve um aumento de estabilidade térmica da lipase.

Shangguan et al. (2011) determinaram os parâmetros cinéticos da lipase obtida a partir do microrganismo *Aspergillus fumigatus*, e os valores para a constante de Michaelis-Menten e V_{\max} foram 14,0 mM e 1,37 mM/mg, respectivamente.

Mohamed et al. (2011) caracterizaram bioquimicamente e fizeram um estudo cinético da lipase de *Mucor racemosus*. V_{\max} e K_m foram estimados em 55,5 mM/mL/min e 2% de

óleo de oliva, respectivamente, e o pH e a temperatura ótimos foram estimado em 5,0 e 40 °C, respectivamente.

Kumar et al. (2012) estimaram os parâmetros cinéticos da enzima lipolítica obtida a partir de *Bacillus* sp. A enzima purificada teve sua maior atividade em pH 6,0 e temperatura de 60 °C, e a constante de Michaelis-Menten obtida foi 1,83 mM e o V_{max} 10,0 mM/mL/min.

Ülker e Karaoglu (2012) observaram que na presença de p-NPP (p-Nitrofenilpalmitato) como substrato, os valores de K_m e V_{max} da lipase foram calculados utilizando a equação proposta por Hanes-Woolf, sendo 1,327 mM e 91,11 nmol/min, respectivamente.

2.5 Produção de aromas por via biotecnológica

Na conversão de matérias-primas em produtos finais alimentícios, três fatores devem ser considerados: viabilidade econômica, segurança e aceitabilidade. Depois de se atender aos dois primeiros elementos, deve-se dar atenção à aceitabilidade. O aroma, bem como a cor e a textura, tem um papel importante na aceitabilidade. Portanto, a conversão de precursores em compostos de aroma não tem somente importância científica, mas também é de interesse para a indústria de alimentos em geral. Os seus produtos representam um elemento crítico no sucesso de outras indústrias alimentícias que os utilizam como insumos (ARAGÃO et al., 2009).

Aromas são extremamente importantes para indústrias químicas, de cosméticos, de alimentos e farmacêutica. Compostos de aroma são tradicionalmente obtidos por síntese química ou extração. Os inconvenientes de tais processos químicos são a formação de misturas racêmicas indesejáveis e a resistência crescente do consumidor para produtos químicos adicionados aos alimentos, cosméticos e outros produtos domésticos. Isto tem direcionado empresas de aroma para produção de compostos aromáticos de origem biológica, assim chamados naturais ou bioaromas (ARAGÃO et al., 2009). Até agora, as plantas foram também uma importante fonte de óleos essenciais e aromas, no entanto, os componentes ativos são muitas vezes presentes em quantidades menores ou na forma ligada, ou só são encontrados em plantas exóticas, tornando difícil o isolamento dos produtos e tornando o

processo bastante oneroso. Uma rota alternativa viável é a síntese de aromas a partir de processos de fermentação microbiana e bioconversão de compostos (JANSSENS et al., 1992).

Os processos biotecnológicos oferecem diversas vantagens e se mostram como uma alternativa competitiva aos métodos químicos, devido à alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas e à seletividade dos catalisadores naturais (JANSSENS et al., 1992).

A síntese enzimática de compostos de aroma é mais específica e viável em relação à extração química a partir de vegetais, pois independe da estação, clima e variação geográfica e não requer grandes quantidades de matéria-prima (KEMPLER, 1983).

Vários estudos têm demonstrado a obtenção de ésteres sintetizados com altos rendimentos utilizando diversas lipases de origem microbiana. Os ésteres produzidos por síntese enzimática são predominantemente obtidos em meios orgânicos com baixo conteúdo de água, mantendo assim a conformação ativa da lipase e sua termoestabilidade.

Macedo e Pastore (1997) testaram cinco lipases microbianas de *Geotrichum* sp, *Alcaligenes* sp, *Aspergillus* sp 1068, *Aspergillus* sp 1099 e *Rhizopus* sp, quanto à capacidade de catalisar a síntese de ésteres formadores de aroma por esterificação em meio isento de solvente orgânico. A natureza da enzima, assim como o tamanho da cadeia dos ácidos afetaram as taxas de conversão obtidas. Os melhores resultados obtidos foram 88% de conversão na síntese de laurato de isoamila e 72% para propionato de isoamila pela lipase de *Rhizopus* sp após 24 horas de incubação, seguido de 82% de conversão na síntese de acetato de isopropila por *Alcaligenes* sp após 24 horas de incubação.

Abbas e Comeau (2003) estudaram a capacidade de lipase de *Mucor* sp., imobilizada em Amberlite IRC 50, de catalisar a síntese dos ésteres de sabor em meios orgânicos (ciclohexano) a 35 °C. Foram utilizados como substratos em relação equimolar ácidos propiônico, butírico e capróico, bem como os álcoois metanol, etanol, butanol, isoamilol, geraniol, citronelol e farnesol. A maior parte dos ésteres foi sintetizada com um rendimento maior que 90%. Rendimentos de conversão diferentes foram observados de acordo com a afinidade da lipase para os ácidos (cadeia curta ou longa), ou os álcoois (de cadeia linear ou ramificada e de cadeia curta ou longa). Conversões rápidas e mais elevadas, de 92% e de 98% foram observadas para caproato de metila e caproato de etila, respectivamente, após 4 horas de reação. Rendimentos de 95, 100 e 93% foram obtidos para o butirato de butila, caproato de butila e caproato de alila, respectivamente, após 24 horas de reação nas condições utilizadas.

Rodriguez-Nogales, Roura e Contreras (2005) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para determinar as condições ótimas para a esterificação do álcool e do ácido butírico utilizando lipase imobilizada produzida por *Candida antártica* como catalisador.

Vários parâmetros da reação foram investigados, incluindo a razão ácido e a concentração de álcool, concentração de enzima, temperatura e tempo de reação que afetam a síntese de butirato de etila. Os principais parâmetros que influenciaram o rendimento de esterificação foram temperatura de incubação e concentração de substrato. As condições ótimas para a reação enzimática foram obtidas a 0,04 M de concentração de substrato utilizando a concentração de enzima de 7% a 34 °C durante 96 horas. Nestas condições, a porcentagem de esterificação foi de 72,9%.

Ghamgui et al. (2006) produziram acetato de isoamila a partir de lipase de *Staphylococcus simulans* imobilizada em um sistema isento de solvente. Uma lipase não comercial foi preparada a partir de *Staphylococcus simulans* e usada para catalisar a reação de esterificação entre o ácido acético e álcool isoamílico para sintetizar acetato de isoamila (sabor banana) em condições de substrato puro, sem adição de qualquer solvente orgânico. Os efeitos de vários parâmetros da reação, tais como a quantidade de lipase, a razão molar de ácido acético em comparação com álcool isoamílico e a quantidade de água adicionada inicialmente, foram investigados. As condições ótimas para realizar a conversão de 64%, durante 8 horas de incubação foram 60 UI de lipase imobilizada em CaCO₃, uma proporção molar de ácido: álcool (1:2) e uma adição inicial de água de 10% (Peso/Peso).

Bezbradica et al. (2007) estudaram o efeito do substrato sobre a síntese de ésteres de aroma catalisada por lipases (lipase de pâncreas suíno e lipase de *Rhizomucor miehei*) em sistemas sem solventes. A diminuição dos teores de ésteres de ácido butanóico, na ausência de solvente orgânico foi observada, enquanto os rendimentos igualmente elevados foram observados na síntese de ésteres de ácido octanóico, em ambos os sistemas (livre de solvente e com solvente orgânico). Cada uma das lipases examinadas apresentaram propriedades semelhantes, embora lipase de *Rhizomucor miehei* foi ligeiramente mais resistente a influência prejudicial de ácido butanóico.

Salah et al. (2007) utilizaram lipase de *Rhizopus oryzae* para catalisar a reação de esterificação entre ácido acético e butanol para produzir acetato de butila (aroma de abacaxi). Quando a lipase livre foi utilizada na síntese contendo apenas os substratos, foi obtido apenas 3% de acetato de butila, enquanto que na utilização da lipase imobilizada, a taxa de conversão atingiu 25%. A síntese de acetato de butila em meios não convencionais, catalisada por lipase imobilizada em celite 545, foi otimizada. Taxa de conversão superior a 60% num sistema isento de solvente foi obtida sob as seguintes condições: quantidade de lipase imobilizada em celite 545 de 500 UI, quantidade de água adicionada inicialmente 45%, razão molar

ácido/butanol acético 1:1, sendo a temperatura de incubação de 37 °C. Lipase imobilizada foi utilizada por três ciclos, sem uma diminuição na atividade de síntese.

A produção de ésteres de acetato de butila por lipase imobilizada de *R. oryzae* também foi estudada na presença de solventes orgânicos por Salah et al. (2007). Em comparação com um sistema isento de solvente, a atividade de síntese foi melhorada na presença de heptano e hexano, com rendimentos de conversão de 80% e 76%, respectivamente.

Sun, Xu e Wang (2009) investigaram o potencial da lipase produzida por *Rhizopus chinensis*. A lipase foi purificada até à homogeneidade por meio de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de filtração em gel. A atividade específica de síntese foi 96,8 U/mg obtida a um pH de 8,0 a 8,5 e temperatura de 40 °C, utilizando p-Nitrofenilpalmitato (p-PNP) como substrato. A maioria dos ésteres etílicos foram sintetizados pela enzima com rendimentos acima de 90%. A enzima apresentou uma afinidade particular para o etanol, n-propanol e n-hexanol, com a conversão de 92, 93 e 92%, respectivamente, após 20 horas de incubação.

Ozyilmaz e Gezer (2010) estudaram a produção de ésteres de aroma por *Candida rugosa* e lipase de pâncreas de suínos. A lipase de *Candida rugosa* e a lipase de pâncreas de suíno foram imobilizadas em alginato de cálcio por meio de aprisionamento e foram usadas para produzir três ésteres de aroma industrialmente importantes: acetato de isoamila (aroma de banana), valerato de etila (aroma de maçã verde) e acetato de butila (aroma de abacaxi). Condições de imobilização foram otimizadas em termos de alginato de sódio (1,0 a 3,0%) e CaCl₂ (1,0 a 2,5 M). Os melhores resultados foram obtidos com 2,5% de alginato de sódio e 2,5 M de CaCl₂ para lipase de *Candida rugosa* enquanto a 2,5% de alginato de sódio e 2,0 M de CaCl₂ para lipase de pâncreas suíno. Na síntese de aroma em meio livre de solvente, e também em meio de hexano, maiores rendimentos de éster foram obtidos em meio hexano para todos os ésteres e os dois tipos de lipases. Eficiência de esterificação do éster aumentou em paralelo com ambas as concentrações da enzima no meio de imobilização e a quantidade de lipase imobilizada em meio de esterificação. A produção máxima de éster foi observada entre 40 e 50 °C para as duas lipases.

A viabilidade da biossíntese de aromas naturais ativos 2-feniletílicos ésteres de creme de coco foi objetivo de estudo realizado por Tan et al. (2011). Cinco lipases fúngicas comerciais (Palatase 20000L, Lipase AYS "Amano", Lipase A "Amano" 12, Piccantase A e Piccantase AN) foram testadas em relação a sua capacidade de produção de 2-fenil-etil-hexanoato de 2-feniletilo e octanoato de creme de coco suplementado com natural 2-feniletanol. Palatase 20000L e Lipase AYS "Amano" mostraram o maior potencial para a

síntese de ésteres de 2-feniletilo. A reação de biossíntese de lipase pelas Palatase 20000L foi ainda estudada em diferentes concentrações de temperatura, pH da enzima e do substrato, com a síntese do éster obtido no máximo 9% (v/v) de 2-fenil-etanol e 2,15 a 8,60 mg de enzima proteína/100 mL de mistura de reação. Um intervalo de temperatura de 30 a 53 °C e um intervalo de pH de 5,2 a 8,5 teve pouco efeito sobre a atividade da lipase Palatase.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

O objetivo geral deste trabalho foi a obtenção de bioaroma de abacaxi (acetato de butila) de interesse industrial utilizando lipase de *Geotrichum candidum* imobilizada em matriz polimérica de alginato de bário e gelatina, reticulada com glutaraldeído.

3.2 *Objetivos específicos*

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- a) Produzir lipase de *Geotrichum candidum* por fermentação submersa;
- b) Imobilizar lipase em matriz polimérica (alginato de bário e gelatina reticulados com glutaraldeído);
- c) Caracterizar bioquimicamente a lipase imobilizada produzida por *Geotrichum candidum*;
- d) Sintetizar acetato de butila (bioaroma de abacaxi) usando lipase livre e imobilizada em matriz polimérica.

4 METODOLOGIA

4.1 Produção da lipase de *Geotrichum candidum*

4.1.1 Fermentação

O caldo enzimático foi obtido por via fermentativa em mesa incubadora (*shaker*) através do *Geotrichum candidum* (NRRL Y-552) gentilmente cedido pela NRRL (*Agricultural Research Service Culture Collection*). A composição do meio de manutenção do microrganismo em tubos inclinados a 5 °C está apresentada na Tabela 5 (meio indicado pela NRRL).

Tabela 5 - Composição do meio de manutenção do *Geotrichum candidum*.

Composição	Concentração (g/L)
Ágar	20
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Peptona	5
Glicose	10

A composição do meio de fermentação para obtenção da lipase foi feita conforme otimização da produção feita por Barbosa, Kamimura e Ming Ho (2003), apresentado na Tabela 6.

A fermentação foi feita em frascos tipo Erlenmeyers, em mesa incubadora (*shaker*), com os valores de agitação de 180 rpm a 30 °C durante 48 horas conforme otimização da produção feita por Barbosa, Kamimura e Ming Ho (2003).

Tabela 6 - Composição do meio de cultura do *Geotrichum candidum*.

Composição	Concentração (%)
Óleo de milho	1,5
Água de maceração de milho	7,5
Nitrato de amônio	0,25

4.1.2 Precipitação da enzima com sulfato de amônio e liofilização

A precipitação da enzima foi realizada após 48 horas (atividade lipolítica máxima), de acordo com Secades e Guijarro (1999). O caldo de fermentação foi centrifugado a 8500 g por 30 minutos. Sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante (em banho de gelo) até 80% de saturação, com agitação branda. O extrato foi mantido a 4 °C por 12 horas, com agitação branda, sendo depois centrifugado a 8500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspenso em um volume mínimo de solução tampão fosfato 0,05 M a pH 7,0. Esta suspensão foi dialisada contra este mesmo tampão a 4 °C, com duas trocas.

A suspensão dialisada foi congelada a -25 °C em frascos com capacidade para 10 mL e em seguida levadas a aparelho liofilizador (Terroni, LD1500) até completa liofilização (PITOMBO, 2005). A atividade foi determinada conforme método descrito no item 4.3.

4.2 Imobilização da lipase de *Geotrichum candidum*

A lipase produzida pelo microrganismo *Geotrichum candidum* foi imobilizada conforme descrito por Serna et al. (2007). Para preparo da solução contendo 2,0 e 4,2% de alginato de sódio e gelatina, respectivamente, adicionou-se a gelatina em uma determinada quantidade de água destilada, mantendo-se em repouso por 20 minutos. Completou-se, posteriormente, o volume de água destilada requerida, levando-se esta mistura a um banho-

maria para a dissolução da gelatina e adicionando-se lentamente o alginato de sódio. Manteve-se o frasco em repouso por 1 hora para hidratação da solução, que foi posteriormente autoclavada a 120 °C por 15 minutos. A solução foi resfriada até temperatura ambiente em constante agitação. Após o resfriamento, a lipase liofilizada, ressuspensa em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), foi adicionada à solução de alginato+gelatina, na proporção de 1 (enzima) : 2 (solução de alginato+gelatina), e mantida em agitação por 15 minutos. Adicionou-se glutaraldeído à solução, e esta foi mantida sob agitação constante por 15 minutos, conforme Fadnavis et al. (2003).

A mistura contendo alginato, gelatina, glutaraldeído e lipase foi gotejada utilizando bomba peristáltica em solução contendo cloreto de bário (0,1 M) gelado (4 °C) para a formação dos *pellets* contendo a enzima. Os *pellets* foram armazenados sob refrigeração durante 24 horas em uma solução de cloreto de bário (0,05 M), e depois mantidos em tampão fosfato (pH 5,5) durante mais 24 horas, para então, serem realizadas as determinações de atividade enzimática com base na metodologia analítica descrita no item 4.3.

4.3 Determinação da atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum*

A atividade enzimática foi determinada de acordo com método descrito por Macedo e Pastore (1997) e modificado por Kamimura et al. (1999). Preparou-se um sistema de reação composto de 5 mL de emulsão de goma arábica (7%) e óleo de oliva, na proporção de 75 : 25% (v/v), respectivamente, 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7,0) e 1 mL de solução enzimática. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos em banho termostatizado com agitação tipo Dubnoff. A reação foi paralisada pela adição de 10 mL de solução de acetona : etanol (1 : 1) e os ácidos graxos liberados foram titulados utilizando-se solução de NaOH (0,05 M) e fenolftaleína como indicador.

Foi construída curva padrão de ácidos graxos utilizando-se amostras contendo de 0,0533 g a 0,5624 g de ácido oleico em solução tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 7,0) em um volume total de 1 mL de solução. Em seguida, adicionou-se mais 2 mL de tampão fosfato e 5 mL de emulsão de goma arábica (7%) e óleo de oliva, na proporção de 75 : 25% (v/v), respectivamente. As amostras foram colocadas em *shaker* a 37 °C sob agitação por 30

minutos. A mistura foi retirada do *shaker* e adicionou-se 10 mL de solução álcool : acetona (1:1) e titulou-se com solução de NaOH (0,05 M) utilizando-se fenolftaleína como indicador.

O valor da atividade enzimática foi expresso em U/mL, onde uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por minuto de reação (MACEDO; PASTORE, 1997).

4.4 Caracterização bioquímica da lipase de *Geotrichum candidum*

A caracterização bioquímica da lipase livre e imobilizada de *Geotrichum candidum*, em relação ao efeito do pH e da temperatura, foram realizados conforme descrito por Santos (2002) com adaptações.

4.4.1 Efeito do pH

4.4.1.1 Determinação do pH ótimo

Foram preparadas soluções tampão nos seguintes valores: tampão acetato (0,1 M) a pHs 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; tampão fosfato (0,1 M) a pHs 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; e tampão borato (0,1 M) a pHs 8,0; 8,5; 9,0.

Preparou-se sistemas de reação compostos de 5 mL de emulsão de goma arábica (7%) e óleo de oliva na proporção de 75 : 25% (v/v), respectivamente, 2 mL de cada solução tampão descrita acima e 1 mL da solução enzimática. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos em banho termostaticado com agitação tipo Dubnoff. A reação foi paralisada pela

adição de 10 mL de solução de acetona : etanol (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados utilizando-se solução de NaOH (0,05 M).

4.4.1.2 Determinação do pH de estabilidade

A lipase foi mantida por 24 horas à temperatura ambiente (25 °C) após ter sido misturada com 2 mL de cada solução tampão preparadas nos seguintes valores de pH: tampão acetato (0,1 M) pHs 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; tampão fosfato (0,1 M) pHs 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; e tampão borato (0,1 M) pHs 8,0; 8,5; 9,0. Após tratamento, a solução enzimática teve a sua atividade lipolítica determinada conforme item 4.3.

4.4.2 Efeito da temperatura

4.4.2.1 Determinação da temperatura ótima

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado de acordo com a atividade enzimática das lipases, utilizando-se as temperaturas de incubação de 25 °C, 27 °C, 30 °C, 33 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C, sendo feitas em banho termostaticado.

4.4.2.2 Determinação da temperatura de estabilidade

O caldo de fermentação contendo a lipase foi tratado numa faixa de temperatura de 25 °C, 27 °C, 30 °C, 33 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C em banho termostático por 1 hora. Após o tratamento térmico, determinou-se a atividade enzimática para cada temperatura.

4.5 Determinação dos parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) da lipase imobilizada de *Geotrichum candidum*

A determinação dos parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) da lipase imobilizada de *Geotrichum candidum* foi realizada conforme descrito por Santos (2002), com adaptações.

A influência da concentração do substrato na atividade da lipase imobilizada de *Geotrichum candidum* foi determinada para o substrato óleo de oliva. Para a determinação do efeito do substrato, adicionou-se diferentes volumes de óleo de oliva, completando o volume com água destilada para 100 mL de solução, sob agitação. Em seguida, 5 mL da solução de lipase imobilizada foi colocada na solução inicial. Retirou-se alíquotas de 1 mL dessa mistura e determinou-se a atividade enzimática, conforme descrito no item 4.5.

Foram determinados os valores da constante cinética de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) para o substrato óleo de milho, testando para os modelos de linearização indicados em eq.(1), eq.(2), eq.(3) e eq.(4).

- Método de Lineweaver-Burk:
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} S} \quad (1)$$

- Hanes:
$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{S}{V_{max}} \quad (2)$$

- Hofstee:
$$V = V_{\max} - \frac{K_m V}{S} \quad (3)$$

- Regressão não linear.
$$V = V_{\max} * \frac{S}{(S + K_m)} \quad (4)$$

Onde: V = velocidade de reação;
 V_{\max} = velocidade máxima de reação;
 K_m = constante cinética de Michaelis-Menten;
 S = concentração de substrato.

4.6 Método de esterificação para obtenção de bioaroma

A extração e análise dos compostos voláteis foram feitas seguindo metodologia proposta por Shieh e Barker (1996). A análise foi conduzida injetando uma alíquota de 1 μ L em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo GC-2010), no modo split, equipado com detector de chama ionizante. Uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μ m de espessura de filme; J & W Scientific) foi utilizada para separar e identificar os produtos.

Para produção de acetato de butila, utilizando lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre e imobilizada como biocatalisador, em meio cicloexano foi realizado o planejamento fatorial para 4 variáveis (2^4 com 4 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios) (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 7.

As respostas obtidas para o rendimento de conversão em acetato de butila foram analisadas pela Análise de Variância (ANOVA) através do Software Statistica 11.0 (Statsoft South America), com nível de significância de 95%. Foram determinados os efeitos principais, coeficientes de regressão, superfícies de resposta e curvas.

Tabela 7 - Planejamento experimental 2^4 para a resposta rendimento na produção de aroma de abacaxi (acetato de butila) utilizando a lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre e imobilizada em matriz polimérica.

Ensaio	x1	x2	x3	x4
	Temperatura (°C)	Enzima (% peso total de butanol)	Proporção molar de substrato (butanol:acetato de vinila)	Tempo (horas de reação)
1	-1(30)	-1(5,00)	-1(1:1)	-1(8)
2	1(45)	-1(5,00)	-1(1:1)	-1(8)
3	-1(30)	1(12,50)	-1(1:1)	-1(8)
4	1(45)	1(12,50)	-1(1:1)	-1(8)
5	-1(30)	-1(5,00)	1(1:1,5)	-1(8)
6	1(45)	-1(5,00)	1(1:1,5)	-1(8)
7	-1(30)	1(12,50)	1(1:1,5)	-1(8)
8	1(45)	1(12,50)	1(1:1,5)	-1(8)
9	-1(30)	-1(5,00)	-1(1:1)	1(24)
10	1(45)	-1(5,00)	-1(1:1)	1(24)
11	-1(30)	1(12,50)	-1(1:1)	1(24)
12	1(45)	1(12,50)	-1(1:1)	1(24)
13	-1(30)	-1(5,00)	1(1:1,5)	1(24)
14	1(45)	-1(5,00)	1(1:1,5)	1(24)
15	-1(30)	1(12,50)	1(1:1,5)	1(24)
16	1(45)	1(12,50)	1(1:1,5)	1(24)
17 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)
18 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)
19 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)
20 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)

pc = ponto central

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção da lipase de *Geotrichum candidum*

A fermentação submersa foi conduzida por 96 horas em triplicata, sendo a atividade enzimática determinada a cada 24 horas, cujos resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* durante 96 horas de fermentação.

Tempo (horas)	Atividade enzimática	Atividade enzimática
	Caldo bruto (U/mL)	Caldo liofilizado (U/mL)
24	17,83 ± 0,63	29,6 ± 0,51
48	37,70 ± 0,46	73,1 ± 1,05
72	35,57 ± 0,65	66,9 ± 1,12
96	32,33 ± 0,75	59,8 ± 1,56

Valores médios ± desvio padrão

A Figura 3 apresenta o perfil da fermentação submersa por 96 horas de *Geotrichum candidum*, com relação à atividade enzimática e pH, avaliados a cada 24 horas.

A lipase apresentou atividade enzimática máxima após 48 horas de fermentação (37,7 U/mL), o caldo bruto apresentando decréscimo após 72 horas. Na forma liofilizada a enzima obteve o valor de 73,1 U/mL, quase o dobro do valor obtido após a fermentação em sua máxima atividade. Kamimura et al. (1999) produziram lipase de *Geotrichum* sp em um fermentador de cinco litros nas seguintes condições de fermentação: temperatura de 30 °C, aeração de 1 VVM e agitação de 400 rpm. A máxima atividade de lipase, cerca de 28 U/mL, foi obtida após 10 horas de fermentação.

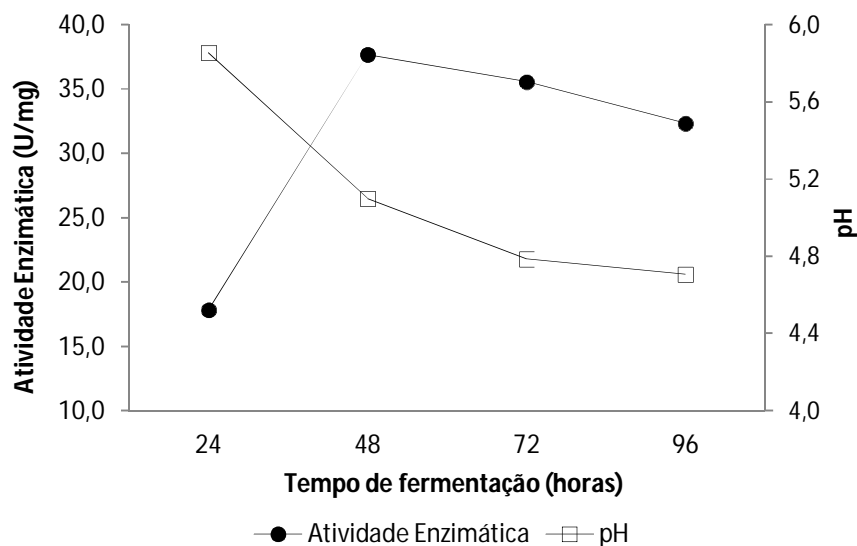


Figura 3 - Perfil da fermentação submersa de *Geotrichum candidum* na atividade enzimática e pH do caldo bruto.

Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004) estudaram a otimização da produção de lipase extracelular de *Geotrichum* sp. utilizando o planejamento experimental fatorial 2^3 , e as condições ótimas obtidas foram nitrato de amônio 2,1 a 2,5%, água de maceração de milho 13 a 15%, óleo de soja 0,6%, nitrato de amônio 0,8 a 1%, água de maceração de milho 13 a 15% e óleo de oliva 0,6%, obtendo uma atividade da lipase em torno de 17 U/mL.

Maldonado (2006) estudou a produção de lipase *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 utilizando fontes alternativas de nitrogênio. Dois substratos foram escolhidos: hidrolisado de levedura (Prodex-lac®) e água de maceração de milho. Estes substratos foram escolhidos porque eles não têm importantes aplicações na indústria, são baratos e contêm altos níveis de nitrogênio. Em ambos os casos, o óleo de soja foi usado como fonte de carbono e indutor de produção de lipase. Os resultados mostraram que as condições ótimas para produção de lipase foram de 8% de água de maceração de milho, 0,6% de óleo de e 3,5% de hidrolisado de levedura com 0,7% de óleo de soja. As atividades máximas obtidas das lipases foram, respectivamente, 17,0 e 24,0 U/mL, após 48 horas de fermentação.

5.2 Caracterização bioquímica da lipase de *Geotrichum candidum*

5.2.1 Efeito do pH da lipase livre e imobilizada

O efeito do pH sobre a atividade de lipase na forma livre e imobilizada de *Geotrichum candidum* foi determinado em uma emulsão de azeite de oliva como substrato, na faixa de pH de 4,5 a 10,0 (Figura 4). Lipase na forma livre apresentou máxima atividade a pH 6,5. Sendo que do pH 6,0 ao pH 8,0 a enzima teve pouca alteração em sua capacidade catalítica. Sendo que manteve boa atividade enzimática da faixa de pH 5,5 a pH 8,5. A lipase de *Geotrichum candidum* imobilizada apresentou máxima atividade a pH 7,5. Sendo que do pH 5,5 ao pH 8,5 a enzima teve pouca alteração em sua capacidade catalítica. Assim como na forma livre apresenta bons valores de atividade enzimática na faixa de pH 5,5 a 8,5. Os dados obtidos neste estudo, tanto para lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre ou imobilizada são semelhantes aos obtidos por outros autores.

Saxena et al., (2003a) estudaram a purificação e caracterização da lipase de fungo *Aspergillus carneus* em meio alcalino. A atividade enzimática foi determinada por titulação, usando óleo de oliva como substrato à temperatura de 37 °C. A faixa de pH de estabilidade foi de 8,0 a 10,0 com pH ótimo de 9,0.

Lima et al. (2004) estudaram a atividade e a estabilidade da lipase de *Penicillium aurantiogriseum* relatando o interessante fato de que lipases de fungos, em geral, são mais estáveis numa faixa de pH entre 4,0 e 7,0 e instáveis em valores de pH alcalino, o que é compatível com resultados obtidos neste trabalho onde a atividade ótima se encontra na mesma faixa e valores de atividade enzimática são menores em faixas mais alcalinas de pH.

Maldonado (2006) avaliou o comportamento da lipase de *Geotrichum candidum* obtida com dois meios complexos contendo diferentes fontes de nitrogênio (um contendo Prodex-lac® e outro água de maceração de milho). O estudo foi feito com a enzima bruta e também com a enzima purificada. O pH ótimo de atuação das 4 enzimas analisadas foi em torno de 7,0.

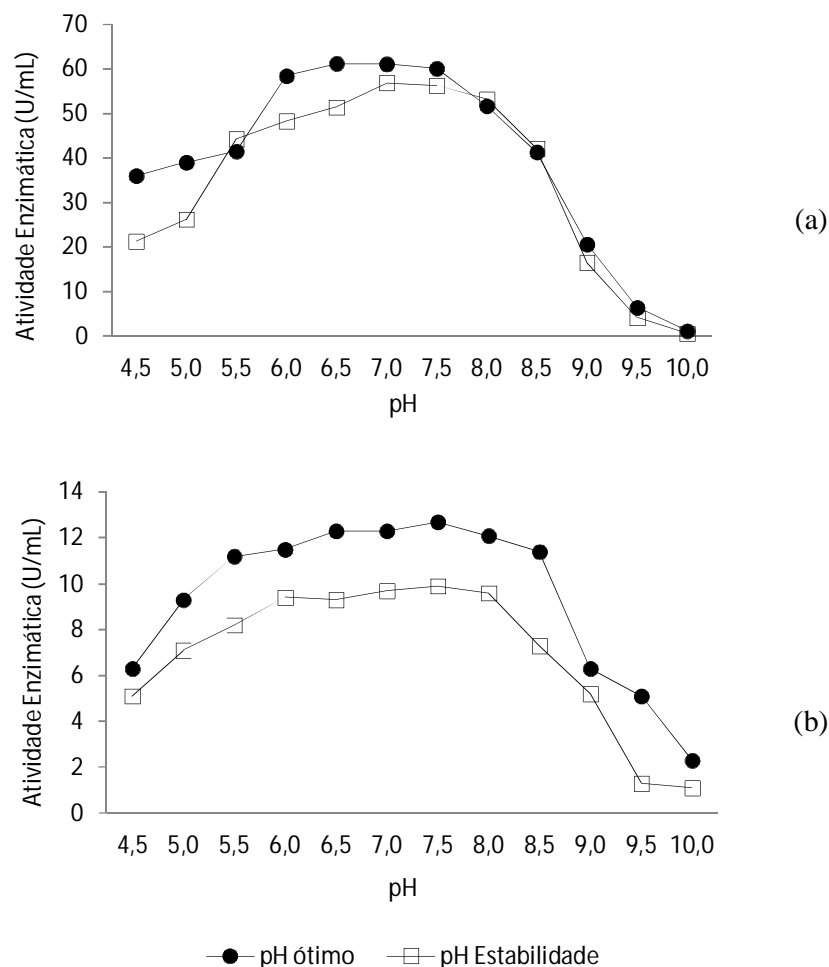


Figura 4 - Efeito do pH na atividade e na estabilidade da lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre (a) e imobilizada em alginato de bário e gelatina (b).

Shu et al. (2009) fizeram a caracterização bioquímica de lipase produzida por *Rhizopus chinensis*, sendo o pH ótimo da lipase obtido entre 8,0 e 8,5 (587,5 U/mg) utilizando pNPP (p-nitrofenil palmitato) como substrato. Esta enzima foi mais estável na faixa de pH de 6,0 a 6,5, e de 100% e 90% da atividade inicial foi alcançada após 1 hora de incubação a pH 6,0 e 6,5, respectivamente. A enzima foi também bastante estável em pH 7,0 e 5,5, por 78% e 80% da atividade inicial estavam ainda presentes. Porém a atividade hidrolítica diminuiu acentuadamente quando incubada a pH ácido (inferior a 5,0) ou pH alcalino (acima de 8,5), uma vez que mais de 80% da atividade original foi perdida.

Simões et al. (2011) estudaram o desempenho da matriz híbrida de SiO₂-Quitossana na imobilização de lipase microbiana de *Candida rugosa* e realizou estudo comparativo entre

o sistema livre e imobilizado em termos de pH. No sistema livre o pH de máxima atividade foi 7,0, já no sistema imobilizado o pH foi 7,5.

Siqueira (2012) estudou a lipase extraída da polpa de macaúba, que apresentou uma atividade ótima em pH 5,5 e maior estabilidade na faixa de pH 5,5 e 7,7. A lipase estudada por este autor apresentou valores ótimos de pH em uma faixa mais ácida, comportamento esperado para lipases extraídas de vegetais.

5.2.2 Efeito da temperatura da lipase livre e imobilizada

O efeito da temperatura sobre a atividade de lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre pode ser observado na Figura 5a. Em temperaturas inferiores a 35 °C a enzima teve baixa atividade, sendo que sua máxima atividade foi à 40 °C. Na faixa de temperatura de 35 a 45 °C a enzima não teve muita alteração em sua capacidade catalítica sendo que a partir daí houve um decréscimo em sua atividade enzimática, tendendo a desnaturação conforme a temperatura foi aumentada. O mesmo comportamento foi observado para a determinação de estabilidade térmica.

Para a lipase imobilizada de *Geotrichum candidum*, conforme Figura 5b, em temperaturas inferiores a 30 °C a enzima teve baixa atividade, sendo que sua máxima atividade foi a 45 °C. Na faixa de temperatura de 35 a 50 °C a enzima não teve muita alteração em sua capacidade catalítica sendo que a partir daí houve um decréscimo em sua atividade enzimática, tendendo a desnaturação conforme a temperatura foi aumentada. A atividade enzimática da lipase foi estável na faixa de temperatura entre 40 e 55 °C.

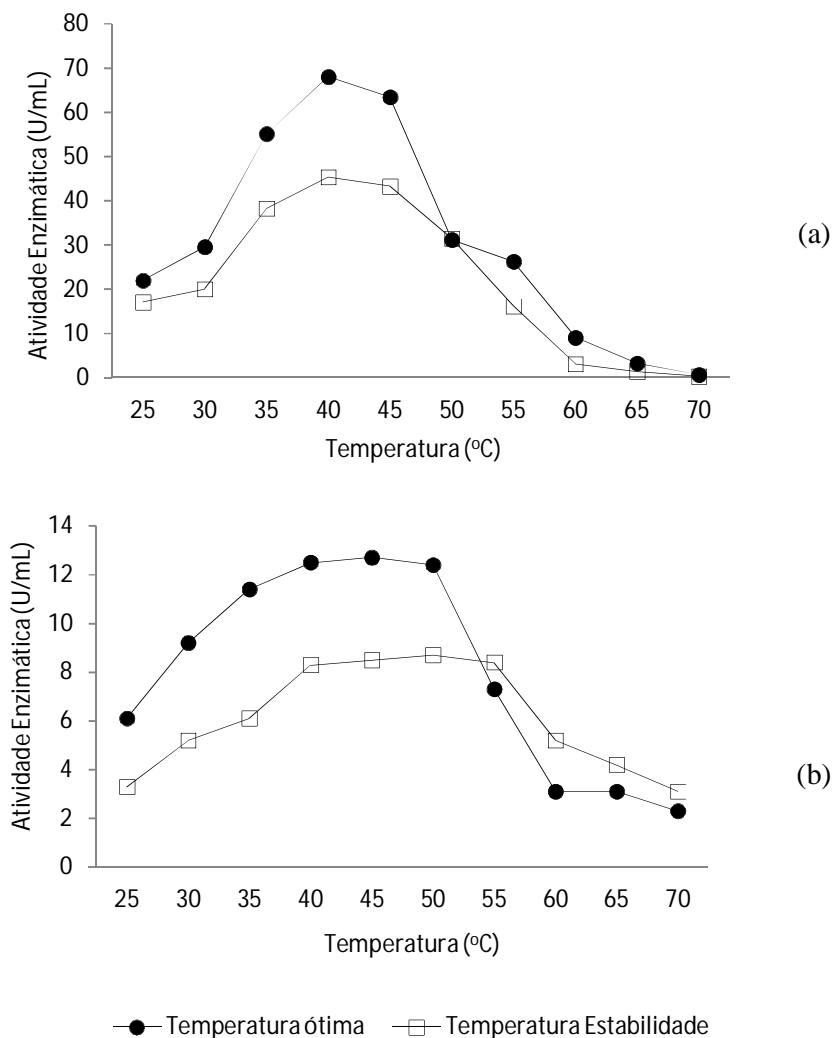


Figura 5 - Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre (a) e imobilizada em alginato de bário e gelatina (b).

Saxena et al., (2003a) estudaram a purificação e caracterização da lipase de fungo *Aspergillus carneus* em meio alcalino. A atividade enzimática foi determinada por titulação, usando óleo de oliva como substrato à temperatura de 37 °C. A faixa de pH de estabilidade foi de 8,0 a 10,0 com pH ótimo de 9,0. A atividade máxima apresentada foi a 37 °C, com uma faixa de atividade entre 5 e 90 °C.

Maldonado (2006) avaliou o comportamento da lipase de *Geotrichum candidum* obtida com dois meios complexos contendo diferentes fontes de nitrogênio (um contendo Prodex-lac® e outro água de maceração de milho). O estudo foi feito com a enzima bruta e também com a enzima purificada. A temperatura ótima das enzimas utilizadas variou na faixa de 37 a 47° C.

Wang et al., (2006), que estudaram a imobilização da lipase de *Candida rugosa* por adsorção em membrana, encontraram um valor ótimo de atividade a 35 °C para a enzima livre e a 45 °C para a imobilizada. O estudo realizado no presente estudo, em lipase de *Geotrichum candidum*, obteve o mesmo comportamento para a enzima imobilizada, sendo que a imobilização da enzima permitiu obter bons valores de atividade enzimática mesmo com aumento da temperatura.

Shu et al. (2009) fizeram a caracterização bioquímica de lipase produzida por *Rhizopus chinensis*, e a temperatura ótima para a atividade de lipase foi de 40 °C (Atividade enzimática específica: 587,5 U/mg). A lipase manteve-se estável até 40 °C durante 60 min. A 50 e 60 °C, a estabilidade diminuiu para 40 e 20%, respectivamente, mas quando a enzima foi incubada a 70 °C, foi quase completamente inativada.

Simões et al. (2011) estudaram o desempenho da matriz híbrida de SiO₂-Quitossana na imobilização de lipase microbiana de *Candida rugosa* e realizaram estudo comparativo entre o sistema livre e imobilizado em termos de temperatura. No sistema livre a temperatura ótima obtida foi de 45 °C, e para o sistema imobilizado a enzima obteve seu maior desempenho na faixa de temperatura de 45 a 50 °C.

Siqueira (2012) fez a caracterização enzimática da lipase extraída da polpa de macaúba, e a maior atividade enzimática foi obtida a 40 °C e permaneceu estável na faixa de temperatura entre 25 e 40°C, sendo que em temperaturas superiores a 40 °C houve um decréscimo em 50% da atividade enzimática obtida. A lipase produzida por *Geotrichum candidum* no presente estudo apresentou temperatura ótima de 40 °C, no entanto, se mostrou estável a uma faixa maior de temperatura, mesmo quando estudada na forma livre.

5.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) da lipase na forma imobilizada

Os parâmetros cinéticos, V_{max} e K_m foram determinados de acordo com a metodologia descrita no item 4.5. O efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação da lipase imobilizada de *Geotrichum candidum* pode ser observado na Figura 6, que apresenta o perfil do gráfico de Michaelis-Menten da atividade da lipase.

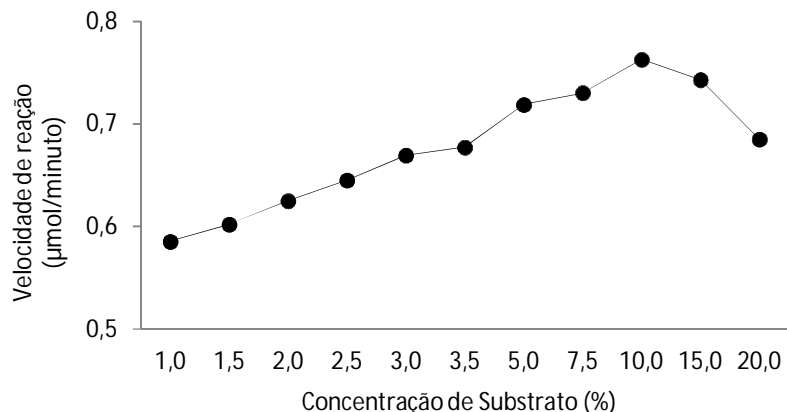


Figura 6 – Estudo do efeito do substrato óleo de oliva na atividade da lipase imobilizada de *Geotrichum candidum*.

Como pode-se notar na Figura 6, a velocidade de reação da lipase imobilizada deixa de ser influenciada pela concentração de substrato a partir de 10,0% de concentração de óleo de oliva. Os pontos da curva foram obtidos em triplicatas a partir das tangentes da região da reação de primeira ordem (conceito de velocidades iniciais) das curvas de formação de produto pelo tempo.

A Tabela 9 apresenta os valores das velocidades iniciais da lipase imobilizada em alginato de bário e gelatina para diferentes concentrações de substrato obtidas a partir dos coeficientes de regressão linear das equações de formação de produto em função do tempo.

Tabela 9 - Valores das velocidades iniciais da lipase imobilizada em alginato de bário e gelatina para diferentes concentrações de substrato.

Concentração de substrato (%)	Velocidade (µmol.mL ⁻¹ .min ⁻¹)
1,0	0,0618
1,5	0,0651
2,0	0,0694
2,5	0,8080
3,0	0,9070
3,5	0,1095
5,0	0,1702
7,5	0,1840
10,0	0,1191
15,0	0,1237
20,0	0,1347

Fazendo a regressão linear de modelos de linearização da curva de Michaelis-Menten, correlações de Lineweaver-Burk, Hofstee e Hanes, apresentados na Figura 7, obtém-se os parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} da reação enzimática da lipase imobilizada de *Geotrichum candidum*, apresentados na Tabela 10.

O modelo de linearização proposto por Hanes foi o que apresentou melhor ajuste, e os valores obtidos para o K_m e V_{max} , foram, respectivamente, 0,1145 mmol e 0,7181 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

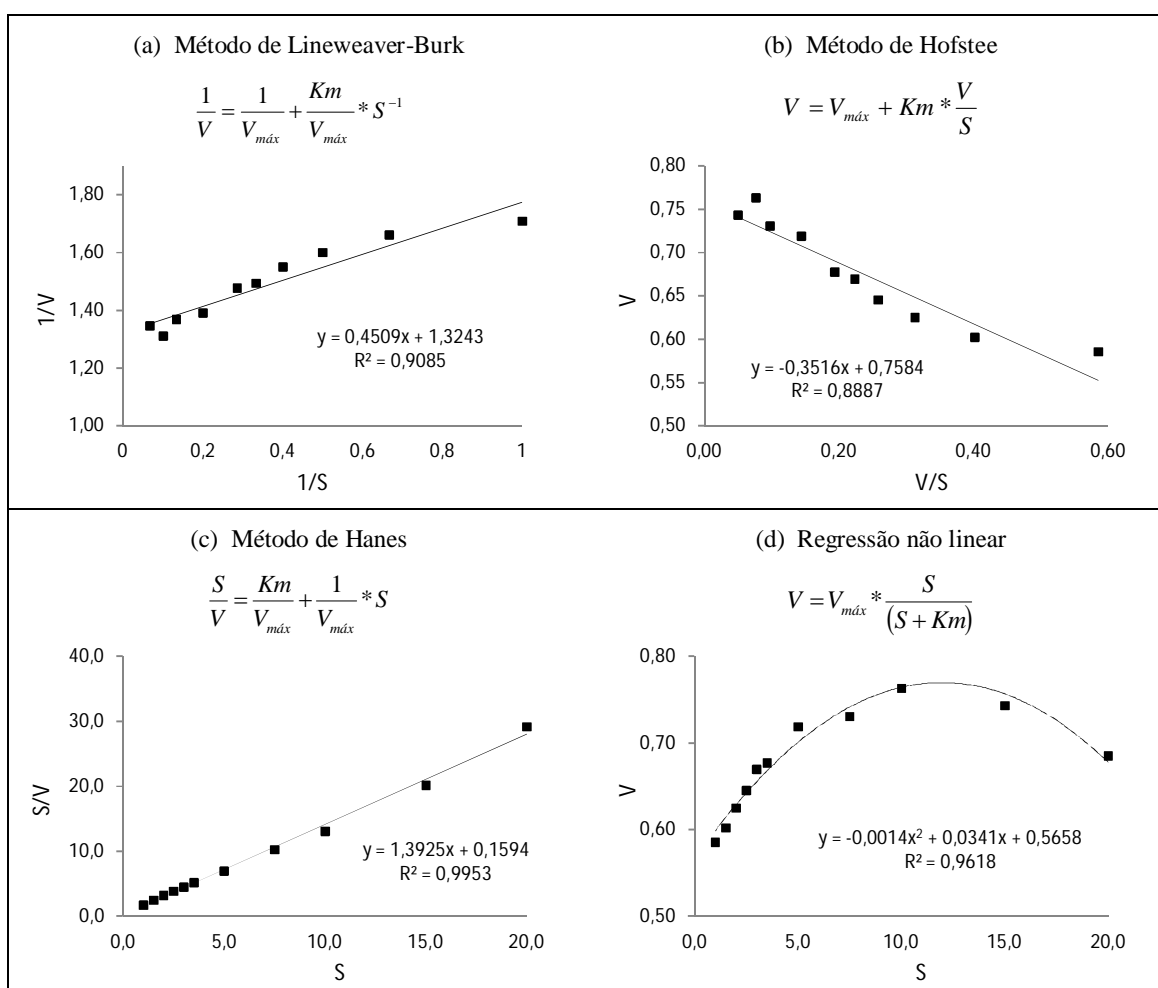


Figura 7 - Diferentes modelos de ajustes da equação de Michaelis-Menten para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da lipase de *Geotrichum candidum* imobilizada em alginato de bário e gelatina.

Tabela 10 - Valores de K_m e V_{max} da lipase de *Geotrichum candidum* imobilizada em alginato de bário e gelatina reticulados com glutaraldeído.

Modelo	V_{max} ($\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	K_m (mmol)	R^2
Método de Lineweaver - Burk	0,7551	0,3405	0,9085
Método de Hanes	0,7181	0,1145	0,9953
Método de Hofstee	0,7585	0,3515	0,8887
Regressão não linear	0,7390	0,2820	0,9618

Maldonado (2006) determinou as constantes cinéticas para lipase produzida por *Geotrichum candidum* variando-se a concentração do substrato óleo de oliva na reação enzimática. Foram determinados as constantes cinéticas para 3 diferentes fontes de nitrogênio: peptona, hidrolisado de levedura e água de maceração de milho clarificada. Foram obtidos os seguintes valores de K_m e V_{max} , respectivamente: peptona 28,73 mg/mL e 22,57 U/mL; hidrolisado de levedura 37,34 mg/mL e 37,31 U/mL; água de maceração de milho clarificada 94,93 mg/mL e 37,59 U/mL.

Oliveira et. al. (2006) determinaram os parâmetros cinéticos para a lipase na forma livre produzida por *Geotrichum candidum*. Foram obtidos os valores 7,11 mmol e 5,57 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para K_m e V_{max} , respectivamente.

Serna et al. (2007) determinaram os parâmetros cinéticos para lipase de *Geotrichum candidum* imobilizada em matriz polimérica de alginato de cálcio e gelatina, reticuladas com glutaraldeído, sendo os valores de K_m e V_{max} obtidos de 2,88 mmol e 0,18 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente.

No presente estudo, onde a lipase produzida por *Geotrichum candidum* foi imobilizada em alginato de bário e gelatina, reticulados com glutaraldeído, o valor de K_m obtido foi de 0,1145 mmol, o que demonstra grande afinidade da enzima pelo substrato (BORZANI, 2001).

Estudos realizados por Liu et al. (2008) que após a produção, purificação e caracterização da lipase extracelular de *Aureobasidium pullulans* determinaram os valores de K_m e V_{max} da lipase de 0,608 mM e 0,039 mM/min, respectivamente, indicando uma alta afinidade pelo substrato p-Nitrofenil-laurato.

Shangguan et al. (2011) determinaram os parâmetros cinéticos da lipase obtida a partir do microrganismo *Aspergillus fumigatus* para o substrato p-Nitrofenilacetato. Os valores para a constante de Michaelis-Menten e V_{max} foram 14,0 mM e 1,37 mM mg^{-1} , respectivamente.

Mohamed et al. (2011) caracterizaram bioquimicamente e fizeram um estudo cinético da lipase de *Mucor racemosus*. V_{\max} e K_m foram estimados em 55,5 mM/mL/min e 2% de óleo de oliva, respectivamente, e o pH ótimo foi estimado em 5,0 e a temperatura em 40 °C.

Kumar et al. (2012) estimaram os parâmetros cinéticos da enzima lipolítica obtida a partir de *Bacillus* sp. A constante de Michaelis-Menten obtida foi 1,83 mM e o V_{\max} 10,0 mM/mL/min em substrato p-Nitrofenilpalmitato.

Ülker e Karaoglu (2012) observaram que na presença de p-NPP (p-Nitrofenilpalmitato) como substrato, os valores de K_m e V_{\max} da lipase foram calculados por Hanes-Woolf, 1,327 mM e 91,11 nmol/min, respectivamente.

5.3 Efeito do ciclohexano na atividade enzimática de lipase imobilizada de *Geotrichum candidum* em um período de 24 horas

A influência da natureza do solvente tem sido interpretada em termos de vários fenômenos, tais como a mudança na rigidez da enzima causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína (AFFLECK et al., 1992). A lipase produzida por *Geotrichum candidum* imobilizada em matriz alginato de bário e gelatina teve sua atividade enzimática determinada em meio tendo como substrato o ciclohexano. Após 24 horas, de acordo com a Figura 8, a enzima apresentou 61,1% da atividade enzimática inicial, um bom resultado visto que este foi o tempo máximo na utilização desta enzima para biossíntese de aroma.

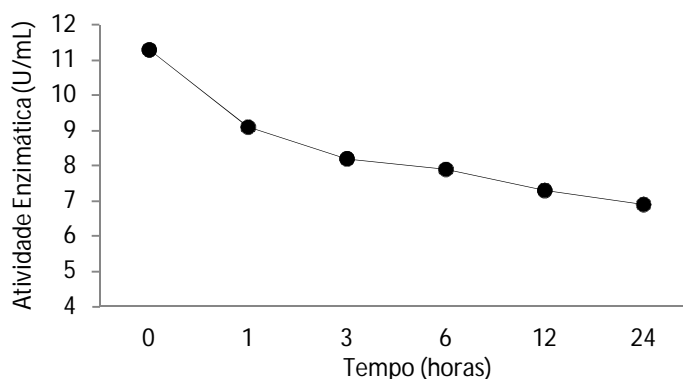


Figura 8 - Atividade enzimática da lipase imobilizada de *Geotrichum candidum* em meio ciclohexano durante 24 horas.

A imobilização em suportes hidrofílicos pode reduzir a atividade enzimática, devido a mudanças conformacionais. Os materiais hidrofílicos podem reduzir a solubilidade de substratos hidrofóbicos em regiões hidrofílicas, e o acesso dos substratos ao sítio ativo. Em alguns casos a matriz pode impor uma barreira estérea, resultando em rigidez na estrutura da enzima. Para ser efetivo na imobilização o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

5.4 Produção de acetato de butila (aroma de abacaxi)

5.4.1 Produção de acetato de butila utilizando lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre

Para produção de acetato de butila utilizando lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre como biocatalisador foi realizado um planejamento fatorial para 4 variáveis (2^4 com 4 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios). Os valores utilizados nos ensaios do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 11, bem como as condições dos ensaios com as respostas em rendimento (% molar de conversão) de aroma de abacaxi.

Tabela 11 - Planejamento experimental 2^4 para a resposta rendimento na produção de aroma de abacaxi utilizando lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre.

	x1	x2	x3	x4	Y
Ensaio	Temperatura (°C)	Enzima (% peso total de butanol)	Proporção molar de substrato (butanol:acetato de vinila)	Tempo (horas de reação)	Rendimento (% molar de conversão)
1	-1(30)	-1(5,00)	-1(1:1)	-1(8)	27,90
2	1(45)	-1(5,00)	-1(1:1)	-1(8)	56,50
3	-1(30)	1(12,50)	-1(1:1)	-1(8)	42,10
4	1(45)	1(12,50)	-1(1:1)	-1(8)	6,20
5	-1(30)	-1(5,00)	1(1:1,5)	-1(8)	82,50
6	1(45)	-1(5,00)	1(1:1,5)	-1(8)	40,60
7	-1(30)	1(12,50)	1(1:1,5)	-1(8)	82,40
8	1(45)	1(12,50)	1(1:1,5)	-1(8)	69,40
9	-1(30)	-1(5,00)	-1(1:1)	1(24)	75,00
10	1(45)	-1(5,00)	-1(1:1)	1(24)	51,20
11	-1(30)	1(12,50)	-1(1:1)	1(24)	53,90
12	1(45)	1(12,50)	-1(1:1)	1(24)	47,50
13	-1(30)	-1(5,00)	1(1:1,5)	1(24)	95,20
14	1(45)	-1(5,00)	1(1:1,5)	1(24)	35,30
15	-1(30)	1(12,50)	1(1:1,5)	1(24)	97,20
16	1(45)	1(12,50)	1(1:1,5)	1(24)	48,60
17 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)	93,20
18 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)	93,00
19 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)	93,90
20 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)	93,80

pc = ponto central

Os valores de conversão para a lipase produzida por *Geotrichum candidum* livre variaram de 6,2 a 97,2%. Quando as condições estudadas foram: temperatura de 30 °C, proporção molar de substrato 1:1,5 (butanol : acetato de vinila), e a reação foi conduzida por 24 horas as taxas de rendimento em porcentagem de acetato de butila foram superiores a 95%, sendo que quando porcentagem de enzima em relação ao peso de butanol foi de 5,0% a porcentagem de conversão foi de 95,20% e para a porcentagem de enzima em 12,5% em relação ao peso de butanol a taxa de conversão foi máxima (97,20%). Observa-se pelos dados obtidos que as maiores taxas de conversão foram obtidas quando a porcentagem de acetato de vinila foi maior em relação ao butanol. Quando essa relação foi de 1:1,5 na temperatura de 30

°C, com 8 horas de reação, se obteve níveis de conversão acima de 80%. O rendimento médio obtido para os pontos centrais foi de 93,5%, valores de conversão acima de 90%.

A Tabela 12 apresenta os valores do efeito estimado das variáveis estudadas na obtenção de bioaroma de abacaxi. Dentro da faixa, com exceção da interação entre a porcentagem de enzima e o tempo de reação, todos os outros efeitos estudados foram significativos. Melhores resultados foram obtidos na faixa de temperatura de 30 °C, os resultados obtidos na faixa central estudada para a variável temperatura foram bons e com decréscimo na porcentagem de conversão para temperaturas de 45 °C. Maiores taxas de conversão foram obtidas quando a quantidade de enzima foi de 12,5%, maior nível dentro da faixa estudada, embora taxas de conversão satisfatórias tenham sido obtidas quando a enzima foi utilizada em menor quantidade. Quando a razão molar do substrato estava em 1:1, menor nível, dentro da faixa estudada, foram obtidas as menores taxas de conversão. Observou-se que em quantidades maiores de acetato de vinila em relação ao butanol, maiores porcentagens de rendimento foram obtidas.

Tabela 12 – Efeitos estimados das variáveis para a obtenção de bioaroma de abacaxi por lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre.

Fatores	Efeitos estimados	Erro padrão	t(3)	p- valor	Estimativas por intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média *	64,27	0,10	649,50	0,00	63,96	64,58
Temperatura °C (x1) *	-25,11	0,22	-113,49	0,00	-25,82	-24,41
Enzima (x2) *	-2,11	0,22	-9,55	0,00	-2,82	-1,41
Proporção molar de substrato (x3) *	23,86	0,22	107,85	0,00	23,16	24,57
Tempo em horas (x4) *	12,04	0,22	54,40	0,00	11,33	12,74
x1 e x2 *	-0,86	0,22	-3,90	0,03	-1,57	-0,16
x1 e x3 *	-15,74	0,22	-71,13	0,00	-16,44	-15,03
x1 e x4 *	-9,56	0,22	-43,22	0,00	-10,27	-8,86
x2 e x3 *	13,11	0,22	59,26	0,00	12,41	13,82
x2 e x4	-0,26	0,22	-1,19	0,32	-0,97	0,44
x3 e x4 *	-11,69	0,22	-52,82	0,00	-12,39	-10,98

$R^2 = 0,58$

* valores estatisticamente significativos a 95% de confiança.

A Figura 9 apresenta os valores dos efeitos estimados para as variáveis estudadas.

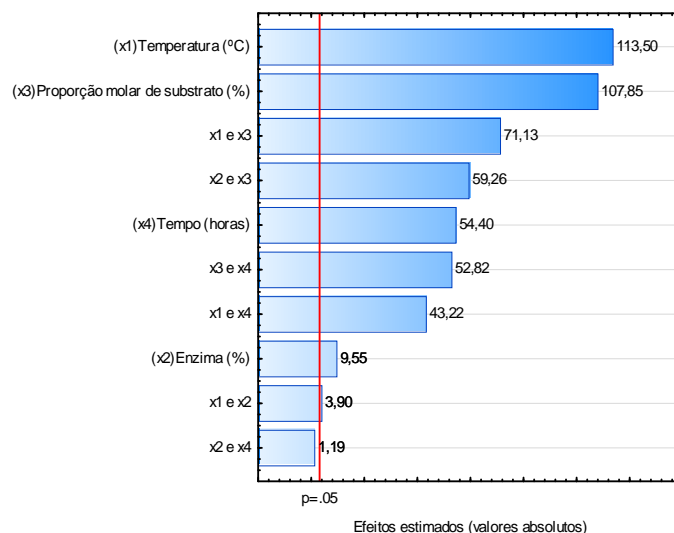


Figura 9 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados das variáveis na síntese de acetato de butila por lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre.

Sun, Xu e Wang (2009) investigaram o potencial da lipase produzida por *Rhizopus chinensis*. *Rhizopus chinensis* produz duas lipases que catalisam a síntese de éster quando cultivadas sob fermentação semi-sólida. A maioria dos ésteres etílicos foi sintetizado pela enzima com rendimentos acima de 90%. A enzima apresentou uma afinidade particular para o etanol, n-propanol e n-hexanol, com a conversão de 92, 93 e 92%, respectivamente, após 20 horas de incubação. As taxas de conversões obtidas pelo autor são semelhantes às obtidas no presente estudo com 16 horas de ensaio, sendo que quando a reação foi conduzida por 24 horas se conseguiu maior taxa de conversão de 97,20%.

Tan et al. (2011) estudaram a viabilidade de biossíntese de ésteres com lipases fúngicas comerciais. A reação de biossíntese de lipase foi ainda estudada em diferentes concentrações de temperatura, pH da enzima e do substrato, com a síntese do éster obtido no máximo 9% v/v de 2-fenil-etanol e 2,15 a 8,60 mg de enzima proteína/100 ml de mistura de reação. Um intervalo de temperatura de 30 a 53 °C e um intervalo de pH de 5,2 a 8,5 teve pouco efeito sobre a atividade da lipase Palatase. A temperatura foi significativa neste estudo onde se pode observar que as maiores taxas de conversão estão em temperaturas menores que 40 °C.

Com os resultados do planejamento foi possível determinar os coeficientes de regressão (Tabela 13) para a resposta rendimento (% molar de conversão) na obtenção de bioaroma de abacaxi e realizar a análise da variância (ANOVA) (Tabela 14).

Tabela 13 - Coeficientes de regressão para a obtenção de bioaroma de abacaxi por lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre.

Fatores	Coef. de regressão	Erro padrão	t(3)	p- valor	Estimativas por intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média *	64,27	0,10	649,50	0,000000	63,95	64,58
Temperatura °C (x1) *	-12,56	0,11	-113,50	0,000002	-12,91	-12,20
Enzima (x2) *	-1,06	0,11	-9,54	0,002437	-1,41	-0,70
Proporção molar de substrato (x3) *	11,93	0,11	107,85	0,000002	11,58	12,28
Tempo em horas (x4) *	6,02	0,11	54,40	0,000014	5,67	6,37
x1 e x2 *	-0,43	0,11	-3,90	0,029960	-0,78	-0,07
x1 e x3 *	-7,87	0,11	-71,12	0,000006	-8,22	-7,51
x1 e x4 *	-4,78	0,11	-43,21	0,000027	-5,13	-4,43
x2 e x3 *	6,56	0,11	59,26	0,000011	6,20	6,91
x2 e x4	-0,13	0,11	-1,19	0,320874	-0,48	0,22
x3 e x4 *	-5,84	0,11	-52,82	0,000015	-6,19	-5,49

* coeficientes estatisticamente significativos em um limite de 95% de confiança.

A equação de rendimento (% molar de conversão), em função dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos está apresentada na eq.(5).

$$\text{Rendimento (\%)} = 64,27 - 12,56 x_1 - 1,06 x_2 + 11,93 x_3 + 6,02 x_4 - 0,43 x_1x_2 - 7,87 x_1x_3 - 4,78 x_1x_4 + 6,56 x_2x_3 - 5,84 x_3x_4 \quad (5)$$

Tabela 14 - Análise da variância do planejamento fatorial 2^4 para o rendimento na produção de bioaroma de abacaxi por síntese com lipase de *Geotrichum candidum* na forma livre.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	SQ	QM	F _{calc}	F _{tab}	p- valor
Regressão	p-1 (9)	7921,24	990,16	1,91	3,02	0,16
Resíduo	n-p (10)	5716,06	519,64			
Falta de ajuste		5715,47				
Erro puro		0,59				
Total		13707,30				

$$R^2 = \text{SQ}_R / \text{SQ}_T = 0,58$$

$$F_{\text{tab}} = F_{9, 10, 95\%}$$

Pela ANOVA apresentada na Tabela 14, observa-se que o modelo que descreve a resposta porcentagem de rendimento de acetato de butila em função das variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, não pode ser considerado adequado. Uma vez que o F calculado é menor que o F tabelado (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

5.4.2 Produção de acetato de butila utilizando lipase imobilizada de *Geotrichum candidum*

Para produção de acetato de butila utilizando lipase na forma imobilizada de *Geotrichum candidum* como biocatalisador foi realizado um planejamento experimental para 4 variáveis (2^4 com 4 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios). Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 15, bem como as condições dos ensaios com as respostas em rendimento (% molar de conversão).

Tabela 15 - Planejamento experimental 2⁴ para a resposta rendimento na produção de aroma de abacaxi utilizando lipase de *Geotrichum candidum* na forma imobilizada.

	x1	x2	x3	x4	Y
Ensaio	Temperatura (°C)	Enzima (% peso total de butanol)	Proporção molar de substrato (butanol:acetato de vinila)	Tempo (horas de reação)	Rendimento (% molar de conversão)
1	-1(30)	-1(5,00)	-1(1:1)	-1(8)	22,20
2	1(45)	-1(5,00)	-1(1:1)	-1(8)	46,60
3	-1(30)	1(12,50)	-1(1:1)	-1(8)	4,80
4	1(45)	1(12,50)	-1(1:1)	-1(8)	25,40
5	-1(30)	-1(5,00)	1(1:1,5)	-1(8)	24,10
6	1(45)	-1(5,00)	1(1:1,5)	-1(8)	73,40
7	-1(30)	1(12,50)	1(1:1,5)	-1(8)	21,70
8	1(45)	1(12,50)	1(1:1,5)	-1(8)	86,10
9	-1(30)	-1(5,00)	-1(1:1)	1(24)	34,10
10	1(45)	-1(5,00)	-1(1:1)	1(24)	67,30
11	-1(30)	1(12,50)	-1(1:1)	1(24)	33,90
12	1(45)	1(12,50)	-1(1:1)	1(24)	40,00
13	-1(30)	-1(5,00)	1(1:1,5)	1(24)	25,90
14	1(45)	-1(5,00)	1(1:1,5)	1(24)	92,10
15	-1(30)	1(12,50)	1(1:1,5)	1(24)	34,60
16	1(45)	1(12,50)	1(1:1,5)	1(24)	99,10
17 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)	18,60
18 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)	45,50
19 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)	30,00
20 pc	0(37,5)	0(8,75)	0(1:1,25)	0(16)	34,40

pc = ponto central

Os valores de conversão para a lipase produzida por *Geotrichum candidum* imobilizada variaram de 4,8 a 99,1%, pode se observar que quando a temperatura foi de 45 °C e a proporção molar foi de 60% de acetato de vinila em relação ao butanol o rendimento em porcentagem molar de conversão foi acima de 70%, atingindo 99,1% quando a reação foi conduzida por 24 horas e a quantidade de enzima utilizada foi maior.

Na Tabela 16 são apresentados os valores dos efeitos estimado das variáveis estudadas para obtenção de acetato de butila (bioaroma de abacaxi). Diferente do resultado encontrado para biossíntese de acetato de butila com a enzima livre o efeito da temperatura foi positivo representando um ganho no valor da conversão molar, mostrando maiores valores de

conversão com a temperatura de 45 °C. Provavelmente pode-se atribuir este efeito ao fato da enzima estar confinada em uma matriz polimérica. Em relação à razão molar do substrato, apresentou comportamento semelhante ao da enzima livre, quando a concentração de acetato de vinila foi maior em relação ao butanol ocorreram maiores taxas de conversão.

Tabela 16 – Efeitos estimados das variáveis para a obtenção de bioaroma de abacaxi por lipase de *Geotrichum candidum* na forma imobilizada em matriz polimérica

Fatores	Efeitos estimados	Erro padrão	t(3)	p- valor	Estimativas por intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média *	42,99	2,49	17,28	0,00	35,07	50,91
Temperatura °C (x1) *	41,09	5,56	7,38	0,01	23,38	58,79
Enzima (x2) *	-5,01	5,56	-0,90	0,43	-22,72	12,69
Proporção molar de substrato (x3) *	22,84	5,56	4,10	0,03	5,13	40,54
Tempo em horas (x4) *	15,34	5,56	2,76	0,07	-2,37	33,04
x1 e x2 *	-2,19	5,56	-0,39	0,72	-19,89	15,52
x1 e x3 *	20,01	5,56	3,60	0,04	2,31	37,72
x1 e x4 *	1,41	5,56	0,25	0,82	-16,29	19,12
x2 e x3 *	11,51	5,56	2,07	0,13	-6,19	29,22
x2 e x4	2,06	5,56	0,37	0,74	-15,64	19,77
x3 e x4 *	-3,74	5,56	-0,67	0,55	-21,44	13,97

$R^2 = 0,90$

* valores estatisticamente significativos.

O diagrama de Pareto (Figura 10) apresenta o efeito principal de cada variável estudada e o efeito da interação entre estas.

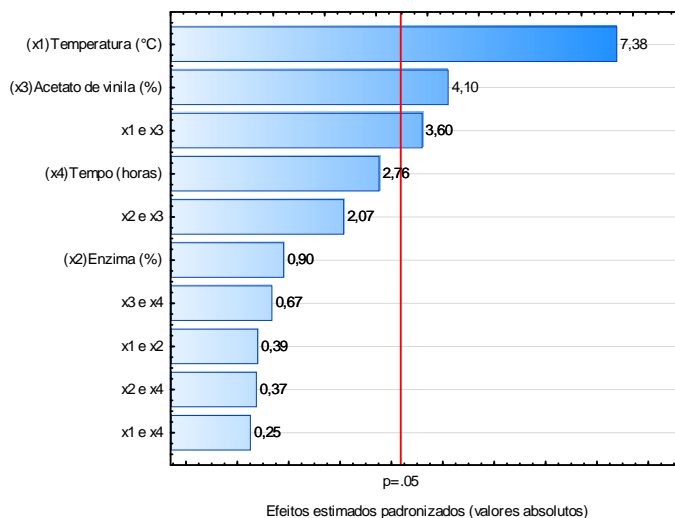


Figura 10 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados das variáveis na síntese de acetato de butila por lipase de *Geotrichum candidum* na forma imobilizada.

Rodriguez-Nogales, Roura e Contreras (2005) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para determinar as condições ótimas para a esterificação do álcool e do ácido butírico utilizando lipase imobilizada em resina acrílica macroporosa produzida por *Candida antártica* como catalisador. Os parâmetros da reação foram investigados, incluindo a razão ácido e a concentração de álcool, concentração de enzima, a temperatura e tempo de reação que afetam a síntese de butirato de etila. Os principais parâmetros que influenciaram o rendimento de esterificação foram a temperatura de incubação e concentração de substrato, comportamento que também pode ser observado neste estudo.

Ghamgui et al. (2006) estudaram os efeitos de diversos parâmetros da reação de síntese de acetato de isoamila (aroma de banana) a partir de lipase de *Staphylococcus simulans* imobilizada em CaCO_3 em um sistema isento de solvente. Os efeitos de vários parâmetros da reação, tais como a quantidade de lipase, a razão molar de ácido acético em comparação com álcool isoamílico e a quantidade de água adicionada inicialmente, foram investigados. As condições ótimas para realizar a conversão de 64%, durante 8 horas de incubação foram 60 UI de lipase imobilizada em CaCO_3 , uma proporção molar de 1 ácido:2 álcool e uma adição inicial de água de 10% (Peso/Peso). Estes resultados alcançados pelo autor mostram um comportamento muito semelhante ao encontrado no presente estudo, onde observa-se que maiores taxas de conversão foram obtidas quanto a razão molar entre ácido:álcool foi maior para um dos lados.

Dos resultados obtidos do planejamento foi possível determinar os coeficientes de regressão (Tabela 17) para a resposta rendimento (% molar de conversão) na produção de aroma de abacaxi e a análise da variância (ANOVA) (Tabela 18).

Tabela 17 – Coeficientes de regressão para a obtenção de bioaroma de abacaxi por lipase de *Geotrichum candidum* na forma imobilizada em matriz polimérica

Fatores	Coef. de regressão	Erro padrão	t(3)	p-valor	Estimativas por intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média *	42,99	2,49	17,28	0,00	35,07	50,91
Temperatura °C (x1) *	20,54	2,78	7,38	0,01	11,69	29,40
Enzima (x2)	-2,51	2,78	-0,90	0,43	-11,36	6,35
Proporção molar de substrato (x3) *	11,42	2,78	4,10	0,03	2,57	20,27
Tempo em horas (x4)	7,67	2,78	2,76	0,07	-1,18	16,52
x1 e x2	-1,09	2,78	-0,39	0,72	-9,95	7,76
x1 e x3 *	10,01	2,78	3,60	0,04	1,15	18,86
x1 e x4	0,71	2,78	0,25	0,82	-8,15	9,56
x2 e x3	5,76	2,78	2,07	0,13	-3,10	14,61
x2 e x4	1,03	2,78	0,37	0,74	-7,82	9,88
x3 e x4	-1,87	2,78	-0,67	0,55	-10,72	6,98

* coeficientes estatisticamente significativos em um limite de 95% de confiança.

A equação de rendimento (% molar de conversão), em função dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos está apresentada na eq.(6).

$$\text{Rendimento (\%)} = 42,99 + 20,54x_1 + 11,42x_3 + 10,01x_1x_3 \quad (6)$$

Tabela 18 - Análise da variância do planejamento fatorial 2^4 para o rendimento na produção de bioaroma de abacaxi por síntese com lipase de *Geotrichum candidum* na forma imobilizada em matriz polimérica.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	SQ	QM	F _{calc}	F _{tab}	p- valor
Regressão	p-1 (3)	10440,94	3480,31	19,24	3,24	$1,48 \times 10^{-5}$
Resíduo	n-p (16)	2893,4	180,84			
Falta de ajuste		2521,89				
Erro puro		371,51				
Total		13334,34				

$$R^2 = \text{SQ}_R / \text{SQ}_T = 0,91$$

$$F_{\text{tab}} = F_{3, 16, 95\%}$$

Pela ANOVA apresentada na Tabela 17, observa-se que o modelo que descreve a resposta porcentagem de rendimento de acetato de butila em função das variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, podem ser considerado adequado. O F calculado é maior que o valor tabelado, satisfazendo os requisitos para construção das superfícies de respostas e curvas de níveis (RODRIGUES; IEMMA, 2009), que estão apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13.

Na Figura 11a e b pode-se observar o rendimento na conversão em acetato de butila em função da quantidade de enzima e temperatura. Quando a temperatura foi de 45 °C e a quantidade de enzima foi de 12,5% em relação a porcentagem de butanol utilizada na reação de síntese, observa-se maiores taxas de conversão em acetato de butila. Conforme apresentado na Figura 11c e d, foram obtidas maiores taxas de conversão quando temperatura e a proporção molar de substrato tinha 60% de acetato de vinila em relação a quantidade de butanol utilizada.

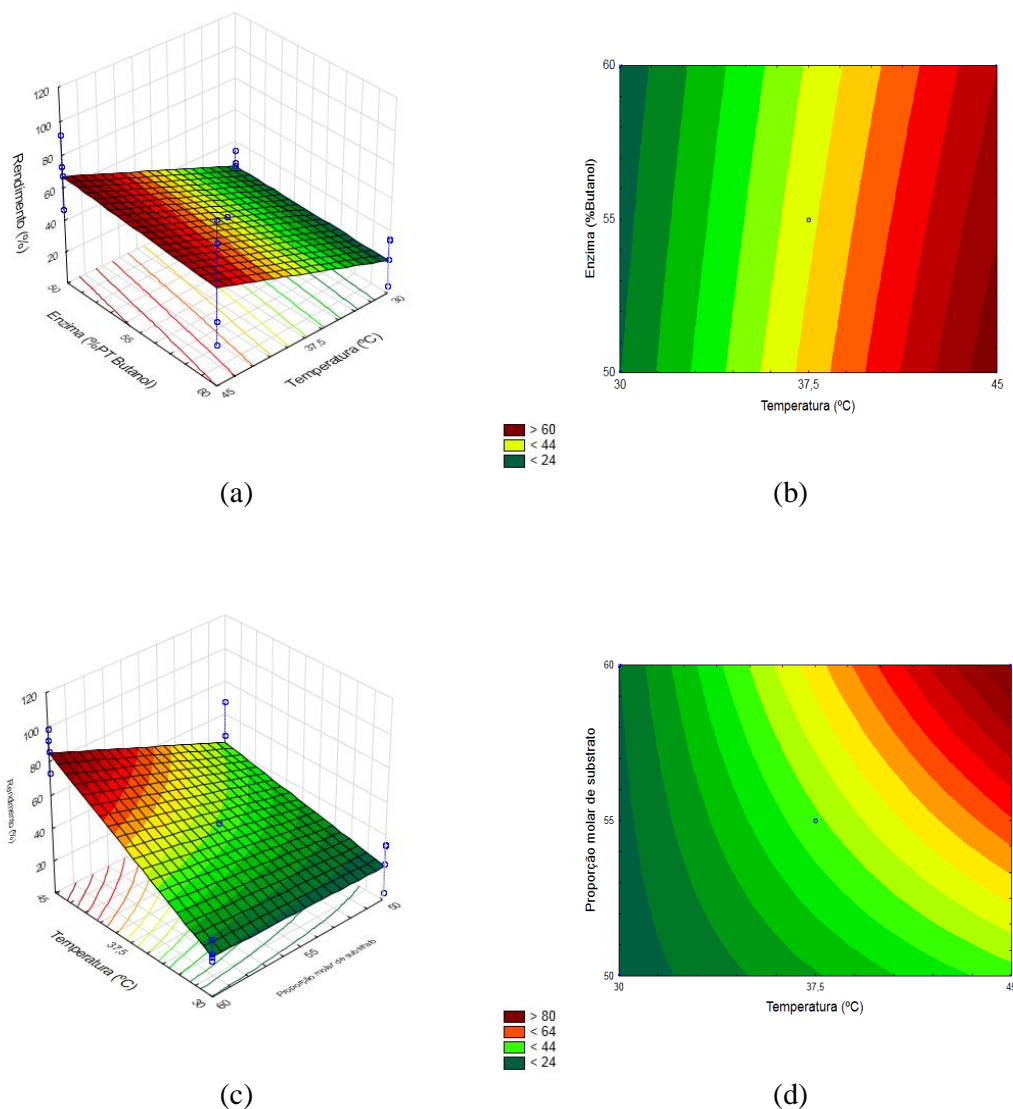
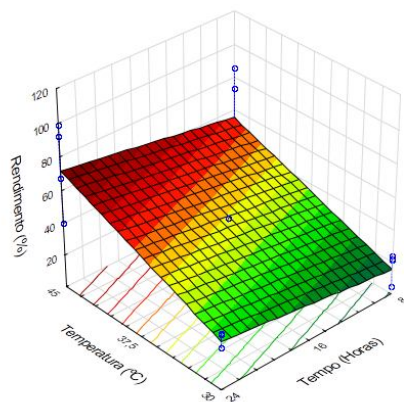


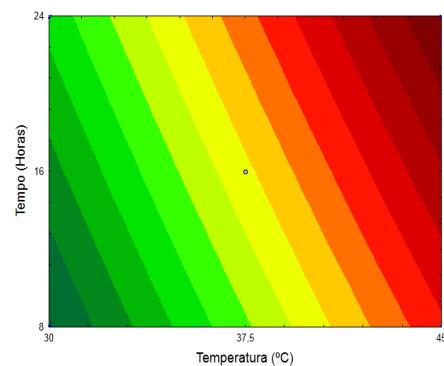
Figura 11 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a porcentagem de rendimento de acetato de butila em função da temperatura e porcentagem de acetato de vinila (a) e (b) e de temperatura e porcentagem de acetato de vinila (c) e (d).

Na Figura 12a e b pode-se observar o efeito do tempo de síntese e da temperatura estudada no rendimento de acetato de butila (bioaroma de abacaxi). Maiores valores de conversão foram obtidos em casos onde a temperatura foi de 45 °C e o tempo de síntese foi de 24 horas. Ainda na Figura 12c o efeito da quantidade de enzima utilizada e a proporção molar de substratos tem seu efeito apresentado sobre o rendimento de acetato de vinila. Observa-se um aumento no rendimento quando a quantidade máxima de enzima foi utilizada em amostras com a proporção molar de substrato em 60% em relação ao butanol.

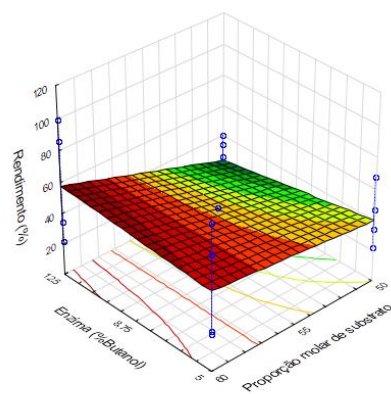
A Figura 12c e d mostra o efeito da quantidade de enzima utilizada e a porcentagem de acetato de vinila no rendimento em porcentagem de conversão molar, e observa-se maiores valores para o rendimento quando foi utilizada maior quantidade de enzima em sistemas com 60% de acetato de vinila em relação ao butanol.



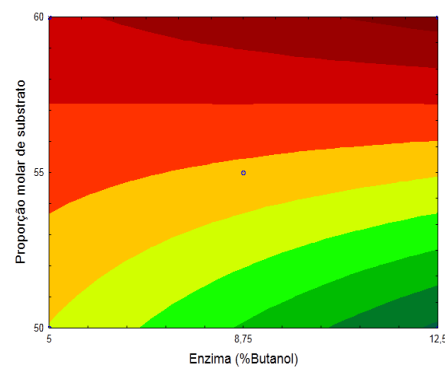
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 12 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a porcentagem de rendimento de acetato de butila em função da temperatura e tempo (a) e (b), porcentagem de enzima e porcentagem de acetato de vinila (c) e (d).

Na Figura 13a e b pode-se observar o efeito da quantidade de enzima utilizada, e o tempo de síntese é visto no rendimento de conversão de acetato de butila (bioaroma de abacaxi). Quando o tempo estudado foi de 24 horas, maiores valores de conversão foram obtidos para quantidade de enzima utilizada de 5% em relação ao peso do butanol utilizado. Na Figura 13c e d a influência das variáveis tempo e proporção molar do substrato no rendimento de conversão em acetato de butila é apresentada. Quando a quantidade de acetato de vinila foi de 60% em relação à quantidade de butanol utilizada e a reação foi conduzida por 24 horas, foram obtidos maiores taxas de conversão.

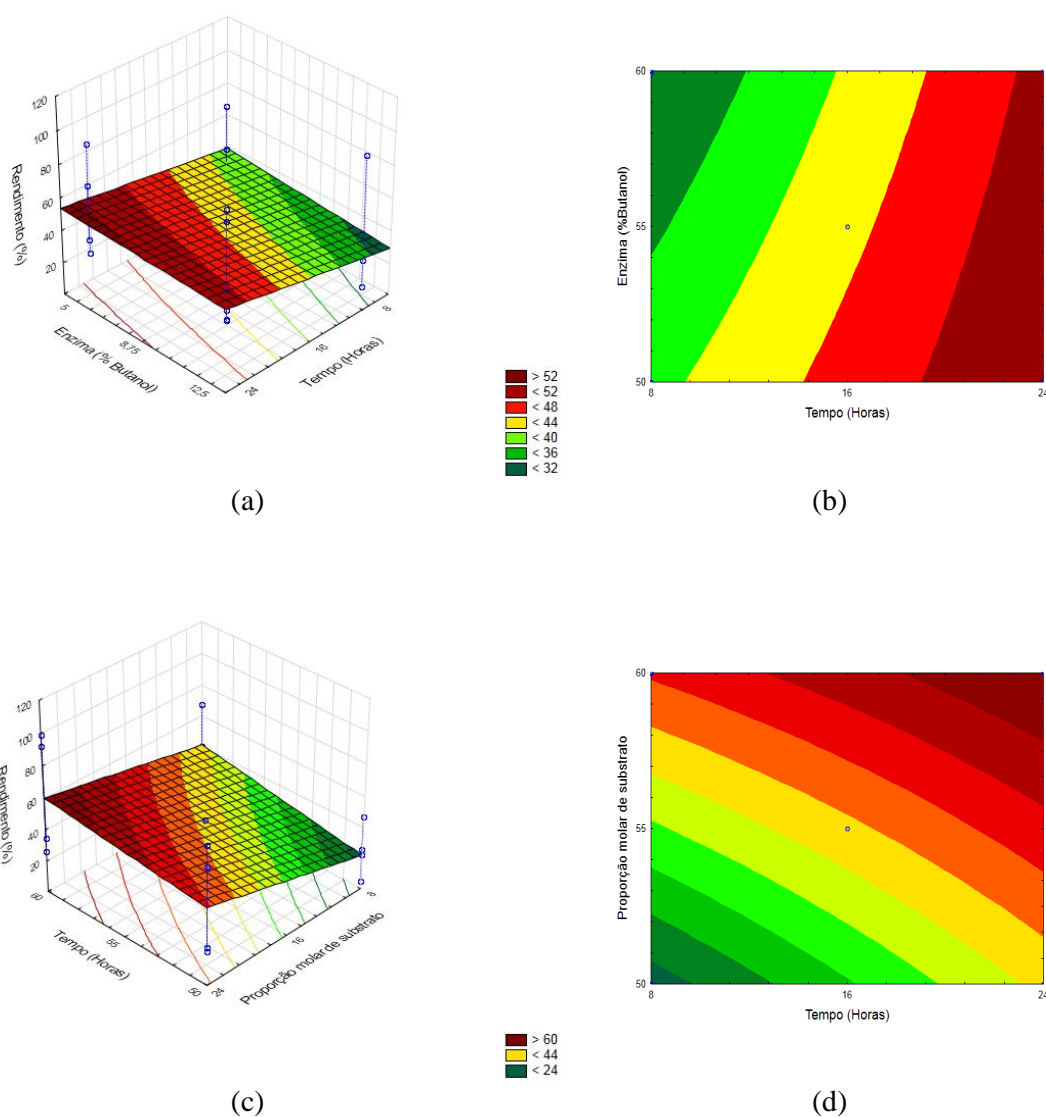


Figura 13 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a porcentagem de rendimento de acetato de butila em função da temperatura e tempo (a) e (b), porcentagem de enzima e acetato de vinila (c) e (d).

Os efeitos da razão molar de substrato e da temperatura são fatores que influenciam na conversão de acetato de vinila e álcool em acetato de butila (aroma de abacaxi), tanto para enzima na forma livre, como imobilizada. Pode-se através deste estudo observar que a imobilização em alginato de bário e gelatina permitiu à lipase taxa de conversão quase total em temperatura maior que 40 °C.

Salah et al. (2007) produziram acetato de butila por lipase de *Rhizopus oryzae*. A lipase de *Rhizopus oryzae* foi usada para catalisar a reação de esterificação entre o ácido acético e butanol para produzir acetato de butila (aroma de abacaxi). Apenas 3% de acetato de butila foi obtido quando a lipase livre foi utilizada na síntese contendo apenas os substratos. Em contraste, a taxa de conversão atingiu 25%, quando a lipase imobilizada em celite 545 foi utilizada sob as mesmas condições, resultado que mostra a importância da imobilização da enzima para sua utilização em meio orgânico. O mesmo autor otimizou a síntese catalisada de acetato de butila por lipase imobilizada. A taxa de conversão superior a 60% num sistema isento de solvente obteve-se sob as seguintes condições: quantidade de lipase imobilizada em celite 545 de 500 UI, quantidade de água adicionada inicialmente 45%, razão molar ácido/butanol acético 1:1, e em temperatura de incubação de 37 °C. A produção de ésteres de acetato de butila por lipase imobilizada de *R. oryzae* também foi estudada na presença de solventes orgânicos. Em comparação com um sistema isento de solvente, a atividade de síntese foi melhorada na presença de heptano e hexano, com rendimentos de conversão de 80 e 76%, respectivamente. No presente estudo, em meio ciclohexano, foram obtidos rendimentos de conversão de 99,1%.

Ozyilmaz e Gezer (2010) estudaram a produção de ésteres de aroma por *Candida rugosa* e lipase do pâncreas de suínos. Lipase de *Candida rugosa* e lipase de pâncreas de suíno foram imobilizadas em alginato de cálcio e utilizadas para produzir três ésteres de aroma industrialmente importantes, acetato de isoamila (aroma de banana), valerato de etila (aroma de maçã verde) e acetato de butila (aroma de abacaxi). Na síntese de aroma em meio livre de solvente, e também em meio de hexano, maiores rendimentos de éster foram obtidos em meio hexano para todos os ésteres e os dois tipos de lipases. A eficiência de esterificação do éster aumentou em paralelo com ambas as concentrações da enzima no meio de imobilização e a quantidade de lipase imobilizada em meio de esterificação. A produção máxima de éster foi observada entre 40 e 50 °C para as duas lipases. A produção de acetato de butila a partir de lipase de *Candida rugosa* imobilizada e lipase de pâncreas suíno imobilizadas em suporte celite 545 foi investigada em função da concentração de ácido compreendido entre 10 e 100 mM a 100 mM de concentração de álcool e constante a

temperaturas ótimas para cada éster. Acetato de butila foi obtido quando 25 mM de ácido foi utilizado para as duas lipases. A produção acetato de butila diminuiu acentuadamente em paralelo com uma concentração de ácido superior a 25 mM. Depois de investigar o efeito da concentração do ácido, a concentração de álcool foi alterada de 10 para 100 mM, na concentração de ácido mais eficiente para cada éster e enzima. A maior quantidade de acetato de butila foi obtida em 50 mM de concentração para a lipase de *Candida rugosa* e lipase de pâncreas suíno imobilizadas. Resultados, tanto para temperatura, quanto para a razão molar do substrato que ajudam a explicar o comportamento obtido ao longo do presente estudo.

Dandavate e Madamwar (2007) verificaram a capacidade de lipase produzida por *Burkholderia multivorans* que apresentou taxas de esterificação de 50% para vários ésteres, com atividade máxima na síntese de etil butirato, após 40 horas de reação. Neste estudo a lipase quando imobilizada em surfactante di-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (Aerosol-OT, AOT) aumentou seu potencial de esterificação para 100%, mostrando a viabilidade de sua aplicação em reações de síntese. O mesmo comportamento foi observado para a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, os estudos realizados no presente estudo mostraram excelente capacidade de catálise em sistemas orgânicos não aquosos, mesmo quando utilizada na forma livre.

Siqueira (2012) estudou a aplicação de lipase extraída de polpa de macaúba em reações de hidrólise e esterificação. A lipase estudada não apresentou ação relevante em reações de hidrólise, mas seu potencial se destacou na síntese de ésteres de ácidos graxos, a lipase esterificou 60% de ácido esteárico após 48 horas de reação.

6 CONCLUSÕES

A enzima imobilizada se mostrou mais estável do que a enzima livre frente a uma faixa maior de pH e temperatura e apresentou K_m e V_{max} compatíveis com os observados na literatura. A imobilização da enzima em alginato de bário e gelatina reticulada com glutaraldeído deu importante proteção térmica para a enzima, embora a enzima na forma livre tenha demonstrado boa capacidade de síntese do bioaroma.

As melhores condições de síntese do bioaroma para a enzima na forma livre foram: temperatura de 30 °C, 12,5% de enzima em relação a quantidade de butanol utilizada, proporção molar do substrato butanol/acetato de vinila 1:1,5 em um período de 24 horas. O rendimento alcançado neste caso foi de 97,20% de conversão molar em acetato de butila. Para a enzima imobilizada as melhores condições foram: temperatura de 45 °C, 12,5% de enzima em relação a quantidade de butanol utilizada, proporção molar do substrato butanol/acetato de vinila 1:1,5 em um período de 24 horas. O rendimento alcançado neste caso foi de 99,10%.

A lipase produzida por *Geotrichum candidum* tanto na forma livre quanto na forma imobilizada mostrou excelente capacidade de sintetizar acetato de butila (bioaroma de abacaxi) com taxas de conversão de 99,1%.

A capacidade biocatalítica demonstrada pela lipase produzida por *Geotrichum candidum* sugere o uso de diferentes substratos para produção de outros bioaromas de interesse para a indústria.

REFERÊNCIAS

ABADA, E.A.E. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, n.8, p.1100-1106, 2008.

ABBAS, H. et al. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n.7, p.968-975, 2002.

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, n.5, p.589-595, 2003.

AFFLECK, R. et al. Enzymatic catalysis and dynamics in low water environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, p.1100-1104, 1992.

ALKAN, H. et al. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136, n.2, p.183-192, 2007.

ALONSO, F.O.M. et al. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.22, n.1, p.9-18, 2005.

AMARAL, P.F.F. et al. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, n.3, p.339-344, 2007.

ARAGÃO, V.C. et al. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v.32, n.9, p.2268-2272, 2009.

AZEREDO, L.A.I. et al. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, v.54, n.5, p.361-365, 2007.

BACHA, A.B. et al. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, n.3, p.309-317, 2005.

BAPIRAJU, K.V. et al. Sequential parametric optimization of lipase production by a mutant strain *Rhizopus* sp. BTNT-2. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, n.4, p.257-273, 2005.

BARBOSA, C.C.; KAMIMURA, E.S.; MING HO, T.J. Otimização da produção de lipase de *Geotrichum candidum* utilizando Planejamento Experimental. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 11., 2003, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: USP, 2003. CD-ROM.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, n.2, p.213-221, 2001.

BEZBRADICA, D. et al. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.45, n.3-4, p.97-101, 2007.

BIANCHI, V.L.D.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.) **Biociencia Industrial**, 2. Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap.13, p.247-276.

BOARETO, A.J.M. et al. A hybrid neural model (HNM) for the on-line monitoring of lipase production by *Candida rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, n.3, p.319-327, 2007.

BORZANI, W. et al (Coord.) **Biociencia Industrial**, 1. Fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

BOUAID, A. et al. Synthesis of a green biosolvent: Isopropyl esters - A statistical approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, n.4, p.533-538, 2007.

BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, n.1, p.77-84, 2004.

BURKERT, J.F.M. et al. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.80, n.1, p.61-67, 2005.

CARVALHO, N.B. et al. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.150, n.1, p.25-32, 2008.

CARVALHO, P.O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80, 2003.

CAVALCANTI, E.A.C. et al. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.79-84, 2005.

CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A.; LIMKATANYU, S. Impacto f transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v.42, n.3, p.261-269, 2008.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B.A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**, v.23, n.1, p.60-67, 2006.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.2, p.193-197, 2004.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.8, p.881-885, 2006.

CONCEICAO, G.J.A. et al. Recuperação e re-uso da lipase extracelular bruta imobilizada de *Trichosporon cutaneum* em Síntese de Bioaromas. In: XVIII Simpósio Brasileiro de Bioprocessos (SINAFERM 2011), 2011, Caxias do Sul - RS. **Anais do XVIII Simpósio Brasileiro de Bioprocessos (SINAFERM 2011)**, 2011.

CONTESINI, F.J. et al. *Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.67, n.3-4, p.163-171, 2010.

COS, O. et al. Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v.26, n.2-3, p.86-94, 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630, 2004.

DANNAVATE, V.; MADAMWAR, D. Novel approach for the synthesis of ethyl isovalerate using surfactant coated *Candida rugosa* lipase immobilized in microemulsion based organogels. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p.265-270, 2007.

D'ANNIBALE, A. et al. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v.97, n.15, p.1828-1833, 2006.

DIAZ, J.C.M. et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.5, p.1042-1050, 2006.

DOMÍNGUEZ, A. et al. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v.25, n.15, p.1225-1229, 2003.

DURLI, E. **Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11**. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

DUTRA, J.C.V. et al. Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.147, n.1-3, p.63-75, 2008.

ERTUGRUL, S.; DONMEZ, G.; TAKAÇ, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, v.149, n.3, p.720-724, 2007.

FADNAVIS, N.W. et al. Gelatin blends with alginate: gels for lipase immobilization and purification. **Biotechnology Progress**, v.19, n.2, p.557-564, 2003.

FALONY, G. et al. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, n.2, p.235-240, 2006.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERNANDES, M.L.M. et al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.44, n.1, p.8-13, 2007.

FICKERS, P. et al. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from yeast *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, n.6, p.756-759, 2006.

FRANKEN, L.P.G. et al. Effect of treatment with compressed propane on lipase hydrolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, n.4, p.511-520, 2010.

GANDHI, N.N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, n.6, p.621-634, 1997.

GHAMGUI, H. et al. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, n.6, p.788-794, 2006.

GRAY, C.J.; NARANG, J.S.; BARKER, S.A. Immobilization of lipase from *Candida cylindraceae* and its use in the synthesis of menthol esters by transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, n.10, p.800-807, 1990.

GRBAVCIC, S.Z. et al. Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.72, n.8-9, p.757-765, 2007.

GRIEBELER, N. et al. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, v.4, p.578-586, 2011.

GUISAN, J.M. (Ed.) **Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells**. 2.ed. Madri: Humana Press, 2006. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/18236303/Immobilization-of-Enzymes-and-Cells>>. Acesso em: 18 nov.2012.

GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v.42, n.4, p.518-526, 2007.

GUTARRA, M.L.E. **Produção de lipase por fermentação no estado sólido: seleção de fungos produtores e estudo das condições de cultivo**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2, p.235-251, 2006.

HE, Y-Q.; TAN, T-W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.43, n.1-4, p.9-14, 2006.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.118, n.1-3, p.155-170, 2004.

HWANG et al. Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels. **Biochemical Engineering Journal**, v.17, n.2, p.85-90, 2004.

IMMANUEL, G. et al. Investigation of lipase production by milk isolate *Serratia rubidaea*. **Food Technology and Biotechnology**, v.46, n.1, p.60-65, 2008.

JANSSENS, L. et al. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v.27, n.4, p.195-215, 1992.

JESUS, M.F.C.P. et al. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.16, n.2, p.113-118, 1999.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; KUMAR, P.A. Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n.6, p.315-320, 2006.

KAKUGAWA, K. et al. Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces* sp. l-11. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.66, n.5, p.978-985, 2002.

KAMIMURA, E.S. et al. Production of lipase from *Geotrichum* sp and adsorption studies on affinity resin. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.16, n.2, p.103-112, 1999.

KANWAR, L.; GOGOI, B.K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in *n*-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology**, v.84, n.3, p.207-211, 2002.

KAR, T. et al. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.35, n.9, p.1053-1059, 2008.

KAUSHIK, R. et al. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.40, n.3-4, p.121-126, 2006.

KEMPKA, A.P. et al. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.31, n.2, p.119-125, 2008.

KEMPLER, G.M. Production of flavor compounds by microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p.29-51, 1983.

KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. Enzyme immobilization. In: KENNEDY, J.F. (Ed.) **Biotechnology**. Weinheim: VCH, 1987. Vol. 7a, p.347-404.

KIM, B.S.; HOU, C.T. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.29, n.1, p.59-64, 2006.

KIRAN, G.S. et al. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.31, n.5, p.483-492, 2008.

KUMAR, R. et al. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, purification and some properties. **World Applied Sciences Journal**, v.16, n.7, p.940-948, 2012.

KUMAR, S.S.; GUPTA, R. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. **Process Biochemistry**, v.43, n.10, p.1054-1060, 2008.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Tradução de Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LI, C-Y. et al. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with repeated fed-batch culture. **Biochemical Engineering Journal**, v.25, n.3, p.195-199, 2005.

LIMA, V.M.G. et al. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, p.65-71, 2004.

LIU, Z. et al. 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**, v.40, n.3, p.445-451, 2008.

LOPES, M. et al. *Yarrowia lipolytica* growth under increased air pressure: influence on enzyme production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.159, n.1, p.46-53, 2009.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v.119, n.1, p.70-75, 2005.

LUCARINI, A.C.; KILIKIAN, B.V.; PESSOA JÚNIOR, A. Precipitação. In: PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B.V. (Coord.) **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. Cap.5, p.89-113.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.115-119, 1997.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v.99, n.6, p.1729-1735, 2008.

MALA, J.G.S. et al. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.53, n.4, p.247-253, 2007.

MALCATA, F.X. et al. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.67, n.12, p.890-910, 1990.

MALDONADO, R.R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. 2006. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MARQUES, D. et al. Protein hydrolysis by immobilized and stabilized trypsin. **Biotechnology Progress**, v.27, n.3, p.677-683, 2011.

MARTÍNEZ-RUIZ, A. et al. Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.151, n.2-3, p.393-401, 2008.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, n.6, p.1451-1463, 2007.

MENONCIN, S. **Concentração, imobilização e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2007.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. The bioreactor step of SSF: a complex interaction of phenomena. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Berlin: Springer, 2006. Cap.2, p.13-32.

MOHAMED, S.A. et al. Characterization of *Mucor racemosus* lipase with potential application for the treatment of cellulite. **Process Biochemistry**, v.46, p.642-648, 2011.

NAWANI, N.; KAUR, J. Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: production, purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, n.4, p.881-887, 2007.

OLIVEIRA, A.C. et al. Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid – a kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, n.4-6, p.999-1005, 2001.

OLIVEIRA, D.L. et al. Caracterização bioquímica da lipase de *Geotrichum candidum* livre e imobilizada frente aos efeitos do pH e temperatura. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 14., 2006, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: USP, 2006. CD-ROM.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.64, n.3-4, p.140-145, 2010.

PALMA, M.B. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, n.1-9, p.1137-1145, 2000.

PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.29, p.119-131, 1999.

PANZANARO, S. et al. Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.9, p.741-745, 2010.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, n.1, p.93-99, 2006.

PARK, H. et al. Effects of methanol on the catalytic properties of porcine pancreatic lipase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, n.2, p.296-301, 2005.

PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.135-140, 2003.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B.V. Introdução. In: PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B.V. (Coord.) **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. Cap.1, p.1-5.

PIMENTEL, M.C.B. et al. Immobilization of *Penicillium citrinum* lipase on ferromagnetic azide-dacron. **Biotechnology**, v.5, n.3, p.228-233, 2006.

PINHEIRO, T.L.F. et al. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.2, p.444-450, 2008.

PITOMBO, R.N.M. Liofilização. In: PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B.V. (Coord.) **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. Cap.17, p.332-348.

POTUMARTHI, R. et al. Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa* – MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole production medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.151, n.2-3, p.700-710, 2008.

PUTHLI, M.S.; RATHOD, V.K.; PANDIT, A.B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, n.3, p.287-294, 2006

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v.24, n.2, p.161-179, 2006.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Evaluation of medium components by Plackett-Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.24, n.3, p.436-444, 2008.

ROBERTS, J.D.; CASERIO, M.C. **Basic Principles of Organic Chemistry**. 2.ed. California: W.A. Benjamin, 1997.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Estratégia experimental para fatoriais fracionados e delineamento composto central rotacional (DCCR). In: RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2.ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. Cap.5, p.135-232.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry**, v.40, n.1, p.63-68, 2005.

RUIZ, B. et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. **Lipids**, v.36, n.3, p.283-289, 2001.

RUCHI, G.; ANSHU, G.; KHARE, S.K. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: production optimization by response surface methodology and application. **Bioresource Technology**, v.99, n.11, p.4796-4802, 2008.

SALAH, R.B. et al. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.103, n.4, p.368-372, 2007.

SANT'ANNA JÚNIOR, G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.) **Biotecnologia Industrial**, 3. Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap.14, p.351-362.

SANTOS, A.M.P. **Síntese de oligossacarídeos a partir de sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. 2002. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SAXENA, R.K. et al. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v.39, n.2, p.239-247, 2003a.

SAXENA, R.K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v.52, n.1, p.1-18, 2003b.

SECADES, P.; GUIJARRO, J.A. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.3969-3975, 1999.

SERNA, R.F. et al. Caracterização bioquímica da lipase de *Geotrichum candidum* imobilizada em alginato e gelatina frente aos efeitos de pH e temperatura. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 15., 2007, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: USP, 2007. CD-ROM.

SHANGGUAN, J-J. et al. Expression and characterization of a novel lipase from *Aspergillus fumigatus* with high specific activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.165, n.3, p.949-962, 2011.

SHARIFF, F.M. et al. Production of L2 lipase by *Bacillus* sp. strain L2: nutritional and physical factors. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.47, p.406-412, 2007.

SHARMA, R. et al. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v.37, n.10, p.1075-1084, 2002.

SHIEH, M.T.; BARKER, P.E. Combined bioreaction and separation in a simulated counter-current chromatographic bioreactor-separator for the hydrolysis of lactose. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.66, n.3, p.265-278, 1996.

SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Production of functional lipids containing polyunsaturated fatty acids with lipase. In: HOU, C.T. (Ed.) **Handbook of Industrial Biocatalysis**. Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap.8, p.128-147.

SHU, C-H.; XU, C-J.; LIN, G-C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v.41, n.3, p.734-738, 2006.

SHU, Z. et al. A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.107, n.6, p.658-661, 2009.

SIMÕES, A.S. et al. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v.34, n.1, p.33-38, 2011.

SIQUEIRA, P.B. **Caracterização bioquímica e compostos bioativos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart.)**. 2012. 147 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SKORONSKI, E. et al. Estudo cinético da obtenção de ésteres utilizando enzima *lipozyme* TL IM como catalisador. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.4, p.897-902, 2010.

SUN, S.Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v.43, n.2, p.219-224, 2008.

SUN, S.Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v.100, n.9, p.2607-2612, 2009.

SURRIBAS, A. et al. Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. **Journal of Biotechnology**, v.130, n.3, p.291-299, 2007.

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 & Biotechnology**, v.35, n.9, p.1019-1025, 2008.

TAN, H.S.G. et al. Lipase catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream. **Food Chemistry**, v.124, n.1, p.80-84, 2011.

TAN, T.; YIN, C. The mechanism and kinetic model for glycerolysis by 1,3 position specific lipase from *Rhizopus arrhizus*. **Biochemical Engineering Journal**, v.25, n.1, p.39-45, 2005.

TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, v.99, n.9, p.3900-3907, 2008.

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**, v.32, n.3, p.397-405, 2009.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipase production. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, n.2, p.182-196, 2010.

ÜLKER, S.; KARAOGLU, S.A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.114, n.4, p.385-390, 2012.

VARGAS, G.D.L.P. et al. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, n.1, p.47-54, 2008.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, n.4-6, p.113-148, 2000.

VITOLO, M. Imobilização de enzimas. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.) **Biotecnologia Industrial**, 3. Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap.18, p.391-404.

VOLPATO, G. et al. Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, n.6, p.821-828, 2008.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v.41, n.1, p.30-37, 2008.

WANG, Y.; MEI, L. Lyophilization of lipase with cyclodextrins for efficient catalysis in ionic liquids. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.103, n.4, p.345-349, 2007.

WANG, Z.G.; WANG, J.Q.; XU, Z.K., Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on electrospun polysulfone nanofibrous membranes by adsorption **Journal of Molecular Catalysis**, v. 42, p 45-51, 2006.

YAHYA, A.R.M.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, n.7-8, p.438-450, 1998.

YAN, J-Y.; YAN, Y-J. Optimization for producing cell-bound lipase from *Geotrichum* sp. and synthesis of methyl oleate in microaqueous solvent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78, n.3, p.431-439, 2008.

YANG, X. et al. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v.40, n.6, p.2095-2103, 2005.

YE, P. et al. Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization. **Biomaterials**, v.26, n.32, p.6394-6403, 2005.

ZHAO, W. et al. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.35, n.3, p.189-195, 2008.