



INTER
FACES
CIENTÍFICAS

EXATAS E TECNOLÓGICAS

ISSN IMPRESSO - 2359-4934

E- ISSN - 2359-4942

DOI - 10.17564/2359-4934.2016v2n2p47-56

PRODUÇÃO DE LAURATO DE ISOPROPILA, UTILIZANDO LIPASE ENCAPSULADA EM MATRIZ HIDROFÓBICA

Anderson Santos Barbosa¹
Álvaro Silva Lima³

Nayara Bezerra Carvalho²
Cleide Mara Faria Soares⁴

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi produzir emulsificantes, utilizando lipase do novo isolado de *Bacillus* sp. ITP-001 (ITP-001) imobilizada em matrizes hidrofóbicas pela técnica sol-gel, bem como a determinação dos parâmetros da reação de esterificação e estabilidade enzimática. Os melhores resultados para a produção de laurato de isopropila foram obtidos pela ITP-001 a 52,5°C. A maior conversão de ácido láurico foi a 3000mM para ITP-001 livre e 2340mM para a ITP-001 imobilizada. O percentual de massa de enzima oferecida foi de 0,75% (m/m) para lipase livre e 5,25%

(m/m) para a imobilizada. A estabilidade operacional da lipase de ITP-001 imobilizada, na atividade de esterificação do ácido láurico com álcool isopropílico foi insatisfatória logo após o segundo reciclo.

PALAVRAS-CHAVE

Lipase. Imobilização. Esterificação.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la producción de emulsionantes utilizando lipasa desde el nuevo aislado de *Bacillus* sp. PTI-001 (ITP-001) inmovilizada sobre matrices hidrófobas mediante la técnica sol-gel, así como la determinación de los parámetros de la reacción de esterificación y la estabilidad enzimática. Los mejores resultados para la producción de laurato de isopropilo se obtuvieron por ITP-001 a 52,5°C. La conversión más alta de ácido láurico fue 3000mm de 001-ITP libre y 2340mM para la PTI-001 inmovilizada. El porcentaje de masa de enzima ofrecida fue de

0,75% (m/m) para la lipasa libre y 5,25% (m/m) para inmovilizada. La estabilidad operacional de la ITP-001 inmovilizada en la actividad de esterificación de ácido láurico con alcohol isopropílico fue insatisfactoria luego de la segunda reciclaje.

PALABRAS CLAVE

Lipasa, Inmovilización, Esterificación.

ABSTRACT

The objective of this research was to produce emulsifiers using new lipase isolated from *Bacillus* sp. PTI-001 (ITP-001) immobilized on hydrophobic matrices by the sol-gel technique as well as the determination of the parameters of the esterification reaction and enzymatic stability. Best results for the production of isopropyl laurate were obtained by ITP-001 to 52,5°C. The higher conversion of lauric acid was 3000mm to 001 ITP-free and 2340mM for the ITP-001 immobilized. The enzyme provided mass percentage was 0.75% (w/w) for free lipase and 5.25% (w/w) to im-

mobilized. The operational stability of the ITP-001 immobilized in esterification activity of lauric acid with isopropyl alcohol was soon unsatisfactory after the second recycle.

KEYWORDS

Lipase. Immobilization. Esterification.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas utilizadas como catalisadores nos processos industriais são de fundamental importância para obtenção de produtos derivados da tecnologia limpa. As lipases podem ser produzidas por diversos micro-organismos como as bactérias (BON ET AL., 2008; LIU ET AL., 2006). A produção de enzimas pode ocorrer por meio de fermentação submersa (FS) onde o substrato é líquido, ou fermentação em estado sólido (FES) onde o substrato contém baixa quantidade de água (LI ET AL., 2004).

A FS é mais indicada para crescimento de bactérias e leveduras, onde são frequentemente utilizados os agitadores orbitais. A escolha da forma de cultivo na fermentação submersa se dá devido à maior transferência de oxigênio, que é um fator importante para produção de lipase e maior controle de suas condições quando comparado à fermentação em estado sólido (CARVALHO ET AL., 2008; COUTO; SANROMAN ET AL., 2006).

As enzimas de origem microbiana produzidas por fermentação possuem diversas vantagens quando aplicadas industrialmente, destacando-se fácil produção em escala, atuação em condições suaves, afinidade por diferentes substratos, catalisa diferentes reações, versátil quanto às características do meio reacional, atividade elevada em meio reacional livre de solventes e disponibilidade comercial, tornando-se alternativa de processos de biotransformação viáveis quando comparado às sínteses químicas (DEMIR; TÜKEL, 2010).

A fim de melhorar os processos enzimáticos pela facilidade de recuperação do biocatalisador e produtos, possibilidade de operações contínuas, prevenção da formação de agregados em meio orgânico, minimização de efeitos desnaturantes e maior proteção, manutenção de microambiente com alta atividade de água, alteração favorável das suas pro-

priedades enzimáticas e redução de custos, faz-se necessário estudos de processos de produção de lipase, purificação, imobilização de enzima (GUNCHEVA; ZHIRYAKOVA, 2011).

Dentre as técnicas de imobilização de enzimas, o encapsulamento obtido pela técnica sol gel tem sido bastante explorada e é indiscutivelmente a técnica mais utilizada para preparo de uma matriz híbrida, na qual a enzima fica retida no interior da matriz, formando um reticulado tridimensional (gel), podendo estar localizada na superfície do suporte, no seu interstício e totalmente encapsulada, de forma a torná-las insolúveis em água (KIM ET AL., 2006; SOARES ET AL., 2004).

Enzimas livres e imobilizadas podem ser utilizadas em meios reacionais convencionais e não convencionais, onde além da hidrólise, a lipase catalisa a reação de esterificação para a formação de ésteres, a partir de um álcool e ácido carboxílico. É promissora na produção de ésteres de interesse comercial na área de solventes, diluentes, plastificantes, surfactantes, indústria farmacêutica, herbicidas e pesticidas (TREICHEL ET AL., 2010; JOSEPH ET AL., 2008).

Consequentemente, as exigências para que as indústrias operem em condições de desenvolvimento sustentável, química-verde ou química sustentável (*greenchemistry*) ou em sistemas de tecnologia limpa, são cada vez mais importantes em várias partes do mundo, e tornam-se um estímulo para a biocatálise. E neste contexto, o objetivo desse trabalho foi a imobilização da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 em matrizes hidrofóbicas pela técnica sol-gel em condições pré-estabelecidas e caracterização da reação de esterificação na presença da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre e imobilizada para obtenção de emulsificante.

2 METODOLOGIA

2.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *BACILLUS* SP. ITP-001

A bactéria *Bacillus* sp. ITP 001, utilizada neste trabalho pertence à coleção de micro-organismos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e foi isolado de um solo contaminado por petróleo na região do campo de exploração de petróleo de Carmópolis no Estado de Sergipe. O micro-organismo foi preservado em tubos com ágar nutriente inclinado e estocados a 4°C, no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) (CARVALHO ET AL., 2008).

A obtenção do caldo fermentado foi realizada a partir da metodologia anteriormente estabelecida (FEITOSA ET AL., 2009), com algumas modificações conforme a seguir descrito: a fermentação foi conduzida em frascos agitados a 170rpm, pH 7,0 e mantidas a 37°C em agitador orbital durante 144h. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 15min a 121°C. Os frascos foram inoculados com 10% de volume de inóculo após 48h e 4% de óleo de coco como indutor, o qual foi acrescido após 48h de fermentação.

A enzima foi purificada, utilizando o método de precipitação por *salting-out*. O caldo fermentado foi centrifugado para a separação das células bacterianas e do óleo de coco residual. Neste caldo livre de célula e óleo foi acrescido de sulfato de amônia em percentual de saturação de 80%. A fase aquosa foi dialisada em membrana com massa de corte de 12.000Da contra água Milli-Q durante 12h a 4°C, e purificada em sistema aquoso bifásico (SAB) formado por 20% de polietilenoglicol 8000, 18% de tampão fosfato de potássio, 6% de NaCl em pH 6 e temperatura de 4°C. A fase de fundo do SAB, que continha a enzima foi dialisada novamente. Após esta etapa o caldo purificado foi liofilizado por 72h em liofilizador Labconco Freezone 4.5 (BARBOSA, 2010).

2.2 IMOBILIZAÇÃO EM MATRIZES HIDROFÓBICAS PELA TÉCNICA SOL-GEL

As matrizes foram preparadas, empregando a metodologia anteriormente estabelecida (SOARES ET AL., 2004) com algumas modificações: a solução etanólica foi preparada, dissolvendo tetraetilortosilicato (TEOS) em etanol absoluto (99%) em atmosfera inerte de nitrogênio. A solução etanólica foi mantida sob agitação e a esta solução adicionou-se lentamente (gota a gota), por meio de funil de adição, ácido clorídrico (36%) diluído em de água ultra pura (solução pré-hidrolisante). Após a lenta adição da solução pré-hidrolisante, a temperatura foi mantida a 35°C sob agitação, durante 90min. Adicionou-se 2,70g de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 dissolvida em 10mL de água ultra pura, e simultaneamente foi adicionado hidróxido de amônio dissolvido em etanol (solução hidrolisante), obtendo-se uma solução homogênea e em seguida a mistura foi mantida em repouso à temperatura de 35°C.

Em seguida o material foi lacrado no balão por 24h para permitir a policondensação completa. Depois deste período, o gel foi retirado do balão de três bocas, após 24h de gelação. O material foi transferido para um funil de Büchner e lavado com heptano e acetona, para eliminar o excesso de água. Após a lavagem o material foi succionado por 60min para remover água residual e solvente, e em seguida mantido em dessecador sob vácuo por 72h.

2.3 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO

Foi investigada a esterificação enzimática do ácido láurico com álcool isopropílico, utilizando lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 na forma livre e imobilizada. Para a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 foi realizado o estudo univariável (uma variável por vez), as variáveis foram: temperatura, razão molar, massa de enzima e estabilidade operacional da enzima quando imobilizada, de acordo com o procedimento de Feihrmann colaboradores (2006), com as modificações propostas

neste trabalho: a atividade das enzimas foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação com o álcool isopropílico nas razões molar ácido-álcool.

As reações de esterificação foram conduzidas em reatores fechados de 100mL e agitador orbital, contendo cerca de 5mL de substrato numa concentração variada de ácido láurico (840-4200mM), enzima (0,25-7,88% m/v) e 10% (m/m) de peneira molecular como agente dessecante. A faixa de temperatura estudada foi de 45 a 62,5°C e o tempo máximo de reação foi de 180 minutos.

Foram coletadas alíquotas de 300µL, em triplicata, do meio reacional no tempo zero e após 10 minutos de reação e foram diluídas em 5mL de acetona-etanol (1:1). A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, utilizando como indicador fenolftaleína.

Para construção da curva de saturação a concentração de ácido láurico e álcool isopropílico foram variados para a síntese de ésteres na curva de saturação, análise do efeito da concentração de substrato na velocidade inicial e a ocorrência de algum tipo de inibição durante a reação de esterificação. As concentrações molares de ácido láurico utilizadas para a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre foram de 840, 1000, 3000, 3150 e 3580mM, para a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada foram 1250,1620, 2340, 3000 e 4200 mM. A reação foi realizada na temperatura ideal de 52,5°C na presença de peneira molecular como agente de secagem (10% m/m) e 0,75% (m/m) de enzima livre e 5,25% (m/m) de enzima imobilizada.

Foram realizadas reações com diferentes massas de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre: 0,25% m/m (90U), 0,50% m/m (180U), 0,75% m/m (270U) e 1% m/m (360U), e diferentes concentrações de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizado: 0,75% m/m (25U), 2,63% m/m (90U), 5,25% m/m (180U) e 7,88% m/m (270U). As reações foram realizadas na temperatura ideal de 52,5°C, razão molar de 1:3 (álcool: ácido) ou

3000mM de ácido láurico para enzima livre e 1:2,34 (álcool: ácido) ou 2340mM de ácido láurico para a enzima imobilizada, na presença de peneira molecular como agente secante (10% m/m).

Para a análise da estabilidade operacional da lipase de *Bacillus* ITP-001 imobilizada, empregaram-se as melhores condições para a realização da reação: razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico, temperatura 52,5°C, massa de 5,25% m/m (180U), na presença de peneira molecular como agente secante (10% m/m). A enzima foi colocada em uma bolsa de tecido de linha e adicionado ao reator, após 10min de reação o saco foi removido e lavado com hexano, após secagem a bolsa foi reutilizado em uma nova reação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram realizados estudos preliminares, sem peneira molecular, mas não ocorreu a conversão na reação de esterificação em diferentes temperaturas, provavelmente devido à presença da água em excesso. Na literatura, de acordo com o uso de agentes dessecantes, como peneiras moleculares ou hidratos de sal, pode ser adicionado ao sistema para remover a água produzida pela reação (SEKEROGLU ET AL., 2004; CASTRO ET AL, 1997). Portanto, passou-se a utilizar a peneira molecular para toda a reação.

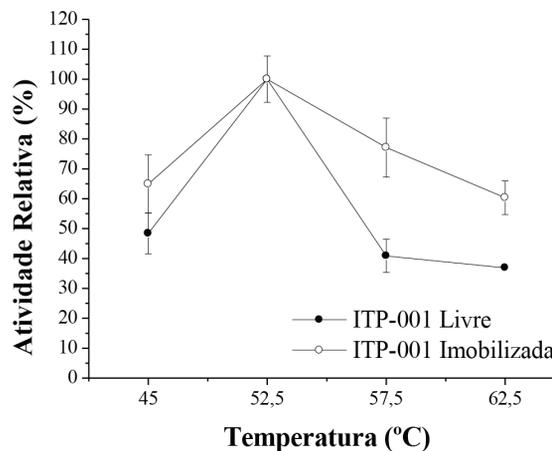
A temperatura foi estudada entre 45-62,5°C, observando-se a influência da temperatura na formação do laurato de isopropila. A lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre e imobilizada apresentou maior atividade de esterificação do ácido láurico a 52,5°C (FIGURA 1). Pode ser observado que acima de 52,5°C ocorreu a diminuição da atividade de esterificação. O perfil da temperatura reacional para esterificação é obtido entre 30 e 62°C de acordo com Malcata e outros autores (1990).

No entanto, em reações catalisadas por lipases, a temperatura influencia a velocidade inicial de reação e estabilidade da enzima e na maioria dos casos, a velocidade de reação aumenta com a temperatura, enquanto a estabilidade das enzimas diminui (MAHAPATRA ET AL., 2009; FORESTI; FERREIRA, 2007). No trabalho realizado por Sekeroglu e outros autores (2004) a lipase de *Candida antarctica* imobilizada comercialmente (Novozyme 435) exibiu atividade máxima a 60°C para a síntese de lauratoisopropílico de álcool isopropílico e ácido láurico e diversos estudos relatam que lipases também catalisam as reações de síntese a alta temperatura até 55°C (SUN ET AL., 2009; KANWAR ET AL., 2007; DANDWATE; MADAMVAR, 2007).

A influência da temperatura ótima da enzima varia com a técnica de imobilização escolhida, pois cada uma apresenta características únicas e dependência de fatores como, por exemplo, a fonte de enzima, tipo de suporte, método de imobilização de enzimas e interação com o suporte (JOSÉ; PRADO, 2005; PEREZ ET AL., 2007).

Paula e outros autores (2008) confirmaram essas informações, trabalhando à temperatura ótima em sistemas imobilizados obtidos por adsorção física (40°C) e covalentes (55°C) e foi comparado com a temperatura ótima da lipase livre (37°C) durante a esterificação do butanol com o ácido butírico. Resultados semelhantes foram observados por Abdullah e colaboradores (2009), no qual a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em aminopropil-mesoporoso SBA-15 foi investigada com base no rendimento da esterificação do citronelol com ácido láurico com a temperatura ideal também a 40°C. Essa diferença pode ser justificada por meio de uma proteção favorecida pela imobilização, resultando em atividades iguais ou superiores aos da lipase livre de 37°C.

Figura 1 – Efeito da temperatura sobre a atividade de esterificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre (●) com massa de enzima de 0,75% (m/m) e imobilizada (○) com massa de enzima de 5,25% (m/m) e razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico



Fonte: Dados da pesquisa.

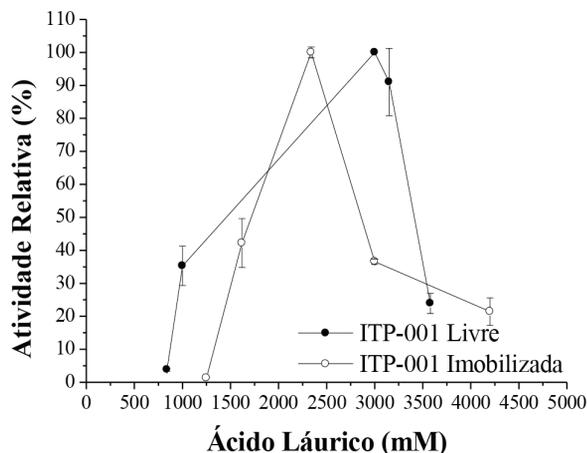
Foi avaliada a quantidade de reagentes, utilizando a enzima livre e imobilizada. A concentração molar dos reagentes são parâmetros importantes na reação catalisada por enzima de tal forma que o rendimento esperado é elevado com o uso mínimo de substratos (PAULA ET AL., 2008).

Sun e outros autores (2009) estudaram a relação do tipo de ácidos graxos e etanol para esterificações catalisadas pela lipase de *Rhizopuschinensis* em n-heptano, a 40°C em 30h. Sete ácidos graxos foram testados e os ácidos caprílico, cáprico e láurico foram os três mais eficientes doadores acila para a enzima. Assim, foram realizadas esterificações com ácido caprílico e sete diferentes álcoois lineares em n-heptano, e a enzima apresentou uma afinidade particular para o etanol e n-propanol, com conversões cerca de 93% com tempo reacional de 20h. Este estudo mostra que o ácido láurico e álcool isopropílico têm cadeias

de carbono necessárias para realizar a esterificação com lipase, confirmando a escolha do reagente neste trabalho para a produção de emulsificantes.

O conteúdo inicial de ácido láurico na reação de esterificação com álcool isopropílico nesse estudo variou de 840 a 4200mM para enzima livre e imobilizada. Os resultados obtidos mostram a relação entre o conteúdo inicial de ácido láurico na reação para a atividade de esterificação da lipase livre e imobilizada (FIGURA 2) e são consistentes, considerando quanto à mudança na concentração inicial, provavelmente devido à carga de enzima oferecida. O máximo consumo de ácido láurico na reação do ácido láurico com álcool isopropílico foi obtido com 7000mg ou 3000mM, quando comparado com o da literatura, podemos concluir que o uso da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada mostrou diferente em relação à Novozyme 435, 0,686 para $30\mu\text{mol}\cdot\text{mLmin}^{-1}$, segundo Sekeroglu e outros autores (2004). Para a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre os valores foram de $7.233\mu\text{mol}\cdot\text{mLmin}^{-1}$ a 11,25mg ou 2340mM de ácido láurico.

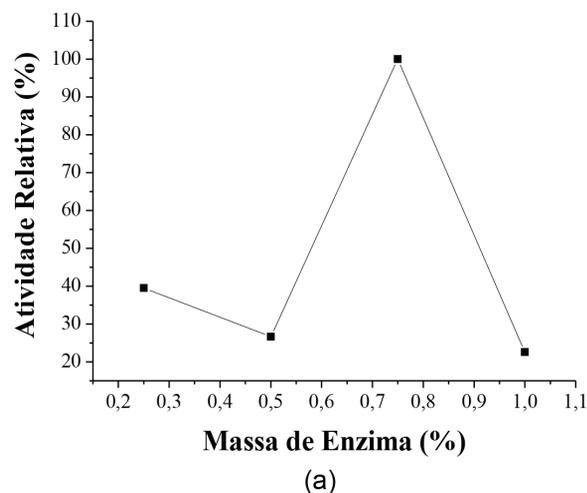
Figura 2 – Efeito da concentração de ácido na atividade de esterificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre (●) com massa de enzima de 0,75% (m/m) e imobilizada (○) com massa de enzima de 5,25% (m/m), à 52,5°C



Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores para a reação de esterificação, utilizando lipase livre e imobilizada variaram a depender da massa de enzima livre e imobilizada entre 0,25-0,75% (m/m) e 0,75-7,88% (m/m) em relação ao meio reacional, respectivamente. Os resultados obtidos para maiores atividades de esterificação foram de 0,75% m/m (270 U) para a lipase livre (FIGURA 3A) e 5,25% m/m (180 U) para a lipase imobilizada (FIGURA 3B).

Figura 3 – Efeito do percentual da massa da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre para reação de esterificação com razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico, à 52,5°C (a) e imobilizada para reação de esterificação com razão molar de 1:2,34 (álcool: ácido) ou 2340mM de ácido láurico, à 52,5°C 2340mM (b)



Fonte: Dados da pesquisa.

Mahapatra e outros autores (2009) estudaram o efeito da quantidade de enzima na esterificação de acetato de n-butila e acetato de n-propila, no qual foi variado a massa de lipase de *Rhizopus-oglossporus* imobilizada em gel de sílica reticulada de 2,5% (1,5U/mL) a 30% (18U/mL) (m/v) a 30°C, foi observado que 50 e 56% de conversão molar de síntese pode ser alcançada após 24 h de reação a uma concentração de enzima de 25% (15U/mL). Ao aumentar a quantidade da enzima adicionada, a velocidade de reação não aumentou significativamente, o que pode ser devido à falta de substrato para acessar o sítio ativo da enzima, e/ou dificuldade em

manter a suspensão uniforme dos biocatalisadores nas maiores massas de enzima.

A conversão do butanol, utilizando diferentes massas de lipase imobilizada em STY-DVB, foi avaliada em substratos constituídos de ácido butírico e butanol na proporção molar de 1,5. As sínteses foram realizadas a 37°C e as massas de lipase imobilizada variaram entre 5% e 60% (80 a 1000 mg, respectivamente) da massa total dos reagentes contidos em 20 mL de substrato em heptano. Valores iguais ou superiores a 15% da massa total de reagentes levaram a uma transformação quase completa no prazo de 24h de reação. Essa concentração é semelhante à utilizada por muitos pesquisadores em estudos experimentais com Lipozyme e outras lipases imobilizadas com aproximadamente 100%, resultando em maior atividade de esterificação (OLIVEIRA ET AL, 2000; ABDULLAH ET AL, 2009).

A estabilidade operacional da lipase imobilizada é também uma característica importante que pode contribuir para redução de capital e custos de operação de produção industrial, uma vez que a enzima livre carece de reciclagem. Em geral, as enzimas são difíceis de ser recuperadas e reutilizadas. A recuperação e reutilização da lipase imobilizada sobre o suporte são aspectos importantes que merecem uma maior investigação (PARK ET AL., 2010; ABDULLAH ET AL., 2009).

Neste estudo, a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada em matrizes hidrofílicas foram utilizadas como biocatalisador para a reação de esterificação de ácido láurico com álcool isopropílico por 10min e, posteriormente, recuperados e reutilizados. A estabilidade operacional da enzima imobilizada na reação de esterificação de 3000mM de ácido láurico com álcool isopropílico e massa de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 de 5,25% (m/m), em 10min, a 52,5°C mostrou-se ineficiente e no segundo ciclo a

atividade relativa foi de apenas 57,14% (152,68 U/g), quando comparada a atividade inicial de 267,18 U/g.

Abdullah e outros autores. (2009) estudaram as enzimas imobilizadas no SBA-15 e FSBA-15. As enzimas imobilizadas foram repetidamente utilizadas como biocatalisador para a reação de esterificação do ácido láurico e citronelol e, posteriormente, recuperados e reutilizados. Concluindo que a atividade das enzimas imobilizadas diminui ligeiramente com o aumento do número de reutilizações e a manutenção da atividade da enzima imobilizada em FSBA-15 foi considerada melhor do que o do SBA-15, a atividade de 90% da enzima imobilizada em FSBA-15 foi mantida mesmo após quatro ciclos de uso. Um dos objetivos mais importantes da tecnologia de imobilização de enzimas é de reforçar a estabilidade conformacional da enzima. O grau de estabilização depende da estrutura da enzima, dos métodos de imobilização e do tipo de suporte.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho, que envolveu a produção de emulsificantes a partir da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre e imobilizada, onde o rendimento de imobilização foi de 43% para a enzima lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 na presença do aditivo polietilenoglicol. Para a reação de esterificação na conversão em laurato de isopropila, utilizando a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre a temperatura ótima foi de 52,5°C, razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou concentração de 3000mM de ácido láurico, 0,75% (m/m) de massa de enzima e para a enzima imobilizada a temperatura ótima também foi de 52,5°C, razão molar de 1:2,34 (álcool:ácido) ou concentração de 2340mM de ácido láurico e 5,25% (m/m) de massa de enzima. Portanto, verificou-se nesse estudo alto potencial para produção de emulsificantes.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.Z.; SULAIMAN, N.S.; KAMARUDDIN, A.H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, 2009. p.263-270.
- BARBOSA, J.M.P. **Purificação e caracterização da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001**. 2010. Dissertação (Mestrado) – ITP/UNIT, Aracaju-SE, Brasil, 2010.
- BON, E.P.S.; FERRARA M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Inteciência, 2008.
- CARVALHO, N.B. *et al.* Sequential production of amyolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.150, 2008. p.25-32.
- CASTRO, H.F.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, 1997. p.237-241.
- COUTO, S.R.; SANROMAN, M.A. Application of solid state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, v.76, 2006. p.291-302.
- DANDWATE, 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, 2007. p.265-270.
- DEMIR, B.S.; TÜKEL, S.S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.64, 2010. p.123-128.
- FEIHRMANN, A.F. *et al.* Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.38, 2006. p.373-382.
- FEITOSA, I.C. *et al.* Produção de lipase por meio de micro-organismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum Technology**, v.32, n.2, 2009. p.27-31.
- FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, 2007. p.769-777.
- GUNCHEVA, M.E.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, 2011. p.1-21.
- JOSE, N.M.; PRADO, L.A.S.A. Materiais híbridos orgânicos inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v.28, 2005. p.281-288.
- JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v.26, 2008. p.457-470.
- KANWAR, S. S. *et al.* Properties of poly (AAc-co-HPMA-cl-EGDMAi) hydrogel-bound lipase of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713 in synthesis of methyl acrylate. **Journal of Applied Polymer Science**, v.104, 2007. p.4636-4644.
- KIM, J.; GRATE, J.W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v.61, 2006. p.1017-1026.
- LI, C.Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochemistry. Engineering. J.**, v.19, 2004. p.25-31.

LIU, C.H.; LU, W.B.; CHANG, J.S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.41, 2006. p.1940-1944.

MAHAPATRA, P. *et al.* Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.60, 2009. p.57-63.

MALCATA, F. X. *et al.* Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A Review. **Journal American Oil Chemist' Society**, v.67, 1990. p.890-910.

OLIVEIRA, P.C.; ALVES, G.M.; CASTRO, H.F.; MEI, L.H.I. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v.23, n.5, 2000. p.632-636.

PARK, J. *et al.* Immobilization of the cross-linked para-nitrobenzyl esterase of *Bacillus subtilis* aggregates onto magnetic beads. **Process Biochemistry**, v.45, 2010. p.259-263.

PAULA, A.V. *et al.* Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v.31, 2008. p.35-40.

PEREZ, V.H.; SILVA, G.R. S.; GOMES F.M., CASTRO H.F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, 2007. p.13-19.

SEKEROGLU, G.; FADILOLU, S.; BANOLU, E. Production and characterization of isopropyl laurate using immobilized lipase. **Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences**, v.28, n.4, 2004. p.241-248.

SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77, n.79, 1999. p.745-758.

SOARES, C.M.F. *et al.* Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113, 2004. p.307-319.

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, 2009. p.2607-2612.

TREICHEL, H. *et al.* Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, 2010. p.182-196.

1. Doutorado em Biotecnologia Industrial, Universidade Tiradentes – UNIT. E-mail: andinhobarbosa@hotmail.com

2. Doutora em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes – UNIT. E-mail: nayara.eng@hotmail.com

3. Doutor em Engenharia Química, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes. E-mail: aslima2001@yahoo.com.br

4. Doutora em Engenharia Química, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes. E-mail: cleide.soares@pq.cnpq.br

Recebido em: 22 de Março de 2016
Avaliado em: 25 de Março de 2016
Aceito em: 7 de Abril de 2016
