

## IMOBILIZAÇÃO DE CONCENTRADO LIPOLÍTICO DE *PENICILLIUM CRUSTOSUM* EM DIFERENTES SUPORTES PARA APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE SÍNTESE

Gessica Possebom<sup>1</sup>, Gessieli Possebom<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 99709-290, Erechim, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Rural, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, Brasil.

\*E-mail: gessielip@hotmail.com

Recebido em: 26/06/2017  
Aceito em: 30/12/2017

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a imobilização do concentrado lipolítico bruto e precipitado, obtido a partir do fungo filamentosso *Penicillium crustosum* em dois suportes, alginato de sódio e argila poço A, e avaliar a atividade enzimática no processo de esterificação. A imobilização dos extratos foi produzida na URI campus de Erechim. O extrato enzimático bruto e precipitado foi imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado e montmorrolonita Poço A, conforme metodologias consolidadas e, após, determinou-se a atividade enzimática de síntese para os dois suportes. Em seguida, realizou-se a transesterificação enzimática de óleos vegetais em meio orgânico, a síntese enzimática de etil oleato em sistema livre de solvente, a esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico e a determinação de conversão de transesterificação do óleo de soja. Na etapa de imobilização, o suporte mais eficaz foi o alginato de sódio, tanto para o extrato bruto, quanto para o precipitado. A produção enzimática de ésteres foi mais satisfatória na esterificação de ácido oleico e etanol, apresentando conversão de 64,48% de etil oleato para o extrato bruto imobilizado. Para a reação de transesterificação de óleo vegetal, a maior conversão encontrada foi de 4,68% para o extrato bruto imobilizado. Assim, o suporte mais adequado, nas condições estudadas, foi o alginato de sódio. A produção enzimática de ésteres foi mais satisfatória para o extrato bruto imobilizado, concordando com a maior atividade enzimática, também encontrada nessas condições, apresentando-se, então, de modo geral, como o melhor desempenho encontrado.

**Palavras-chave:** Enzimas; lipase, esterificação.

### 1 Introdução

As enzimas têm sido usadas, em sua forma nativa, há séculos, na indústria de alimentos. Graças a avanços tecnológicos, vêm conquistando uma faixa crescente do mercado global nas indústrias; farmacêutica, química fina, cosméticos, couros, polpa de celulose e papel, detergentes, bem como de tratamento de resíduos industriais [1].

Apesar das excelentes perspectivas, as enzimas apresentam algumas características que limitam a sua utilização em escala industrial como da solubilidade no meio reacional e da instabilidade operacional. Como consequência, somente algumas enzimas vêm sendo aplicadas como catalisadores em processos industriais, como é o caso das enzimas da fabricação de ácidos (nitríco e sulfúrico) e da hidrogenação de derivados do petróleo ou óleos [2].

Essa escassez da aplicação de biocatalisadores é, também, o resultado de poucos estudos integrais que apontem soluções aos problemas relacionados à consecução de reações enzimáticas. Assim, ressalta-se a importância da realização de pesquisas que possam ser aplicadas em sistemas de imobilização

e estabilização das enzimas não comerciais, permitindo superar essas desvantagens, tornando-as catalisadores ideais para a produção e transformação de compostos bioativos, seja na indústria alimentícia, química ou farmacêutica [3].

Neste contexto, o uso de concentrados lipolíticos imobilizados, obtidos a partir de matérias-primas renováveis e de baixo custo, pode ser relevante para o desenvolvimento de processos biocatalíticos [4,5]. Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, a imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente.

A imobilização é um método de fixação ou encapsulação de uma enzima, que possibilita diversas aplicações deste catalisador com manutenção da atividade catalítica [6]. A imobilização aumenta a estabilidade da enzima, além de propiciar o desenvolvimento de processos químicos contínuos, que impulsionam e facilitam o desenvolvimento das reações [7]. Assim, ao se obter uma enzima imobilizada ativa e estável, que apresente boa especificidade ao substrato, a maioria das desvantagens dos biocatalisadores é eliminada e as enzimas

podem ser utilizadas nos processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos [8].

Para que o emprego de enzimas imobilizadas se torne economicamente viável, deve-se considerar, ainda, o tipo de suporte empregado no processo. Existem inúmeros materiais inertes que podem ser utilizados. A natureza física pode variar, desde materiais geliformes, até superfícies sólidas, recobertas com substâncias capazes de interagir com a enzima. A escolha do tipo de suporte dependerá, essencialmente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada. Entretanto, é fundamental que apresente grande superfície interna, a fim de haver uma boa interação da enzima na superfície. Se o suporte apresentar superfície menor que a enzima, dificilmente existirá uma intensa interação entre o suporte e a biomolécula. Dentre os suportes, o alginato de sódio e as argilas vêm ganhando espaço, destacando-se por apresentar essas boas características [9-10].

Desse modo, o objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade técnica de imobilização dos extratos lipolíticos brutos e precipitados, obtidos a partir de fungo filamentosos *Penicillium crustosum*, em dois suportes: alginato de sódio com carvão ativado e argila poço A, além da capacidade catalítica destes extratos (livres e imobilizados) em reações de esterificação.

## 2 Metodologia

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- Campus de Erechim/RS, no primeiro semestre de 2013. A imobilização de extrato lipolítico bruto e pré-purificado, provenientes de fungo filamentosos *Penicillium crustosum*, foram produzidos pelo grupo de pesquisadores da mesma instituição e disponibilizado para este estudo. A produção das lipases seguiu a metodologia descrita por Rigo et al. [11] e a precipitação e concentração das mesmas seguiu metodologia de Menoncin et al. [12]. O delineamento experimental apresentou quatro tratamentos (T1: Extrato enzimático bruto; T2: Extrato enzimático bruto imobilizado; T3: Extrato enzimático precipitado; T4: Extrato enzimático precipitado imobilizado), cada qual composto por três repetições.

### 2.1 Imobilizações de enzimas: suportes

O extrato enzimático bruto e precipitado, obtido do fungo filamentosos, foi imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado, conforme metodologia de Riso [13]. Para isso, foi preparada uma solução de gel, com 10 g de água destilada e 0,26 g de alginato de sódio, aquecidos para a dissolução total do alginato. Em seguida, adicionou-se 6,5 g de sacarose e, após a dissolução completa do alginato de sódio, a solução de gel foi

resfriada e acrescentou-se a solução composta por 3 mL de solução enzimática com a atividade pré-estabelecida, 0,65 mL de glutaraldeído e 0,39 g de carvão ativado. Para a formação das esferas, foi utilizada uma bomba peristáltica modelo 7518-10, marca Masterflex L/S. Para fazer o bombeamento do gel sobre uma solução de cloreto de cálcio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  em tampão acetato  $0,1 \text{ M}$  a pH 4,8 com 3,5% de glutaraldeído a  $10^\circ \text{C}$ , sob agitação. Os extratos enzimáticos imobilizados foram em descanso na geladeira por 24 horas, para posterior lavagem com água destilada, e tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 4,8.

O processo de imobilização para o segundo suporte, montmorrolonita Poço A, foi realizado conforme a melhor condição, segundo Coghetto [14]. Ou seja, 2 g do suporte com adição de 60 mL de uma solução contendo o extrato enzimático e tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,8, em uma razão 3:10, respectivamente. Esta solução foi mantida sob agitação magnética, em temperatura de  $4^\circ \text{C}$  (banho de gelo), por um tempo reacional de 10 minutos. Após o término do processo de adsorção, a solução foi filtrada a vácuo, permanecendo posteriormente, 48 horas em dessecador.

### 2.2 Determinação da atividade enzimática de síntese para os dois suportes

A atividade de esterificação das lipases, nas diferentes formas de apresentação, foi quantificada através da reação de síntese do ácido oléico e etanol, 1:1 [15]. A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH)  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ . A atividade enzimática foi calculada através da Equação 1.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 100 \times V_f}{t \cdot M_{EL} \times V_c} \quad [1]$$

Onde:

$AE$  = atividade de esterificação ( $\text{U g}^{-1}$ );

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

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

$M$  = molaridade da solução de NaOH;

$V_f$  = volume final de meio reacional (mL);

$t$  = tempo (min);

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

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

### 2.3 Transesterificação Enzimática de Óleos Vegetais em Meio Orgânico

Para a produção de ésteres etílicos, usando solvente orgânico (cetona), os extratos enzimáticos foram adicionados ao

sistema reacional formado por óleo comercial de soja e etanol, 1:3 respectivamente e n-hexano. Para síntese foram usados 0,2315g de extratos enzimáticos de *Penicillium crustosum*, 1 g de óleo comercial, 0,1579 g de etanol, 99,9% de pureza e 40 mL de n-hexano. Todos os componentes foram adicionados em erlemeyers de 250 mL, fechados com tampa de vidro e incubados em agitador rotativo a 200 rpm, numa temperatura de 40 °C por 6 horas.

As condições experimentais apresentadas foram otimizadas em trabalhos anteriores [16]. Decorrido o tempo de reação, as amostras foram filtradas e concentradas em estufa a ± 60°C até atingir peso constante. Após, as amostras foram mantidas sob refrigeração de geladeira (6 - 10° C) por três dias, até a finalização das análises por cromatografia gasosa.

#### 2.4 Síntese Enzimática de Etil Oleato em Sistema Livre De Solvente

As condições reacionais foram semelhantes às da transesterificação de óleo vegetal. Como substratos utilizaram-se ácido oléico e etanol 99,9% de pureza 1:3, respectivamente. A concentração da enzima (nas diferentes formas de obtenção) foi de 20% (peso/peso) em relação aos substratos. Os mesmos foram incubados em agitador rotativo a 200 rpm à temperatura de 40 °C por 8 horas [17]. Após, as amostras foram filtradas e concentradas em estufa a temperatura de ± 60 °C até atingir o peso constante e, em seguida, foram mantidas sob refrigeração, para posterior análise por cromatografia gasosa.

#### 2.5 Esterificação Enzimática de Geraniol e Ácido Propiônico

A esterificação enzimática para a produção de geranil propionato foi realizada, conforme condições otimizadas por Paroul [18]. Ou seja, foram utilizados geraniol (99% de pureza, da VETEC) e o ácido propiônico (99% de pureza, QUIMEX) na proporção molar de 3:1. Os substratos foram adicionados em erlemeyers de 50 mL mantendo volume médio reacional de 5 mL. Após dissolução completa dos substratos, os concentrados lipolíticos livres e imobilizados foram adicionados ao sistema reacional na proporção de 20% (p/p) em relação aos substratos.

Todos os experimentos foram realizados em shaker com agitação constante de 200 rpm e temperatura de 40 °C. Após o término do tempo de reação fixado em 6 horas, o biocatalisador foi filtrado e as amostras foram mantidas em geladeira (6 - 10°C) para as análises.

#### 2.6 Determinação de Conversão de Transesterificação do Óleo de Soja

Para a determinação de ésteres etílicos, as amostras foram analisadas em triplicata em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, conforme EN14103 [19], usando uma coluna capilar apolar modelo RT-WAX (contendo polietileno

glicol na fase estacionária), de 30 cm de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e com a seguinte programação de temperatura: 150 °C (1min) 150-250 °C (10°C min<sup>-1</sup>), 250 °C (1min), temperatura do injetor e do detector 250 °C gás de arraste H<sub>2</sub> (56kPa), volume injetado 1µL de amostra diluída em n-heptano (1:10)

O rendimento da reação foi calculado através da Equação 2.

$$C = \frac{(\sum A) - A_{ei}}{A_{ei}} \times \frac{C_{ei} \times V_{ei}}{W} \times 100 \quad [2]$$

Onde:

$\sum A$  = área total de picos dos padrões C14 e C24: 1;

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

$C_{ei}$  = concentração, em mg mL<sup>-1</sup>, da solução de padrão interno, C17: 0;

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

$W$  = massa, em mg, da amostra.

#### 2.7 Determinação de Conversão de Geranil Propionato e Etil Oleato

A quantificação dos ésteres geranil propionato e etiloleato foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010, utilizando coluna capilar de sílica fundida INOWAX (30m x 250 µm i.d.), 0,25µm de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40-180°C (3 °C min<sup>-1</sup>), 180-230°C (20 °C min<sup>-1</sup>), 230°C (20 min), temperatura do injetor 250°C, detector a 275°C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H<sub>2</sub> (56 kPa), volume injetado 0,4µL de amostra diluída em n-hexano (1:10). A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante [20].

#### 2.8 Processamento dos dados

Testaram-se a normalidade dos dados e a homogeneidade de variâncias, através dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, através do emprego do Software Action-Excel. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro, através do Software SISVAR [21].

### 3 Resultados e discussões

#### 3.1 Técnicas de Imobilização

Com base nos testes de normalidade e homogeneidade, os dados se mostraram normais e as variâncias homogêneas. Na



figura 1 é possível observar o aspecto dos extratos enzimáticos após imobilização, para os dois suportes estudados.

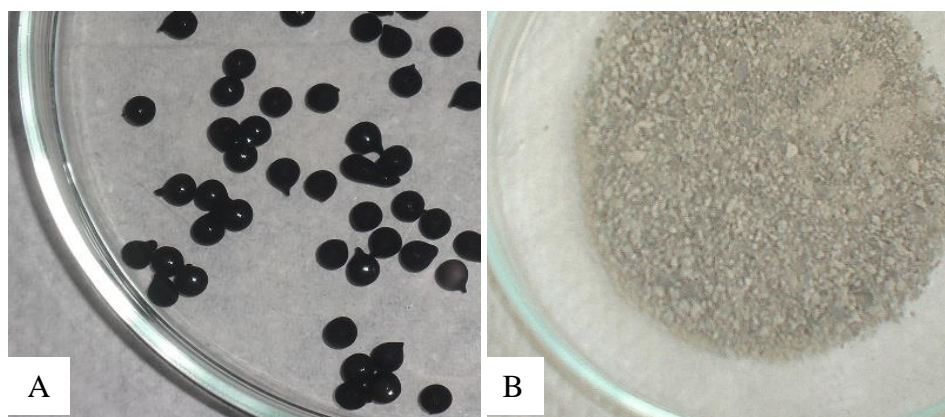


Figura 1 - Aspecto do extrato enzimático do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado (A) e em argila Poço A (B).

O aspecto da imobilização do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* em alginato de sódio com carvão (Figura A), demonstra a técnica de microencapsulação, a qual consiste em confinar a enzima em um polímero insolúvel. Na Figura B o extrato imobilizado em Argila Poço A, após o término do processo de adsorção e dessecação, resulta num pó de coloração clara.

Uma vez imobilizados, é possível observar, na Tabela 1, os resultados obtidos, em termos de atividade de esterificação para os extratos brutos e precipitados, em comparação antes e depois do processo de imobilização.

Tabela 1. Atividade enzimática ( $U\ g^{-1}$ ) dos extratos brutos e precipitados antes e depois da imobilização em alginato de sódio com carvão ativado e argila poço A.

Extrato enzimático	Atividade enzimática ( $U\ g^{-1}$ )	
	Alginato de sódio com carvão ativado	Argila poço A
Bruto (EEB)	202,67 <sup>a</sup>	202,67 <sup>a</sup>
Bruto imobilizado (EEBI)	240,59 <sup>b</sup>	169,42 <sup>b</sup>
Precipitado (EEP)	209,28 <sup>a</sup>	209,28 <sup>a</sup>
Precipitado imobilizado (EEPI)	228,76 <sup>b</sup>	174,26 <sup>b</sup>

Médias não seguidas de mesma letra na coluna diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Como observado na Tabela 1, os extratos enzimáticos imobilizados em alginato de sódio com carvão ativado, apresentaram um acréscimo significativo nas suas atividades enzimáticas (EEBI e EEPI), quando comparadas aos extratos livres EEB e EEP. Entretanto, o mesmo não ocorreu após o processo de imobilização em argila poço A, que apresentou um decréscimo significativo para ambas as formas de apresentação do extrato. Dessa forma, a maior atividade enzimática obtida foi para extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI) no alginato de sódio com carvão ativado ( $240,59\ U\ g^{-1}$ ).

A imobilização de uma biomolécula deve considerar, cuidadosamente, a característica da mesma para que, depois de

imobilizada, mantenha ou melhore sua atividade e estabilidade, acrescentando melhores características físicas como resistência mecânica, viabilizando, com isso, sua utilização em larga escala [6,9, 22].

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante um processo, em comparação à sua forma livre [23]. Dessa forma, a redução das atividades enzimáticas após o processo de imobilização em argila poço A, pode ser um indicativo de que esse processo de imobilização ou suporte não é adequado para os extratos estudados [24].

Mediante o uso do alginato, a enzima (solução enzimática) é extrusada dentro de uma solução, formando uma gota geleificada [25]. Essa característica, em conjunto com o alto grau de pureza química e a capacidade de ajustar a sua composição e estrutura para as mais diversas aplicações, faz do alginato com carvão ativado, um suporte muito visado no meio bioquímico e farmacêutico [26]. Além disso, a redução de custos no processo de fabricação do carvão ativado e a facilidade de obtenção de matéria-prima são outras vantagens apresentadas por esse suporte [27-29].

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas elas. Para cada aplicação de uma enzima

imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato, que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional [30].

### 3.2 Aplicações das Lipases como Catalisadores de Reações de Interesse

A Tabela 2 apresenta a produção de ésteres etílicos, etil oleato e geranil propionato, através da aplicação do extrato enzimático não comercial de *Penicillium crustosum*, nas suas diferentes formas de obtenção: EEB, EEBI, EEP, EEPI, imobilizado em alginato de sódio com carvão ativado, suporte que apresentou melhores resultados em termos de atividade de esterificação.

Tabela 2. Conversões em ésteres utilizando os extratos em diferentes formas de obtenção.

Extrato enzimático	Atividade enzimática (U g <sup>-1</sup> )	Conversão (%)		
		Ésteres etílicos	Etil oleato	Geranil propionato
Bruto (EEB)	202,67	3,86 <sup>c</sup>	56,44 <sup>b</sup>	38,89 <sup>d</sup>
Precipitado (EEP)	209,28	0,64 <sup>b</sup>	52,41 <sup>a</sup>	34,42 <sup>b</sup>
Bruto Imobilizado (EEBI)	240,59	4,68 <sup>d</sup>	64,48 <sup>d</sup>	37,09 <sup>c</sup>
Precipitado Imobilizado (EEPI)	228,76	-	57,86 <sup>c</sup>	13,54 <sup>a</sup>

Médias não seguidas de mesma letra na coluna, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

A partir da Tabela 2, observa-se que houve diferença significativa entre todos os tratamentos analisados, corroborando a maior atividade do extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI) nas propriedades catalíticas das reações de ésteres etílicos e etil oleato. Na reação de geranil propionato, apesar do EEBI não ter se comportado como nas demais reações, o índice por ele apresentado mostrou-se apenas 1,8% inferior ao EEB, o que ao ser analisado em conjunto, ainda torna o EEBI aquele que apresentou resultados mais satisfatórios.

As vantagens da imobilização da enzima vão muito além do contexto da reação química, pelo fato de facilitar a separação do biocatalisador do meio reacional por filtração ou centrifugação, de forma que resulte em um produto final de maior pureza. Consequentemente, a carga de efluentes gerada pelas lavagens do produto para a purificação também é reduzida [9,10,31].

No estudo realizado por Zenevicz [17], as conversões em etil oleato mais baixas (23,1 e 32,8%) foram encontradas para a esterificação enzimática em GLP, pressurizado com enzima microbiana de *P. brevicompactum*, em suas diferentes formas de obtenção. Esse mesmo autor observou conversões variando entre 26,1 e 28,7%, com extratos enzimáticos de *Rhizopus sp.*, nas suas diferentes formas de obtenção, em mesmas condições.

Pode-se observar, também, que a maior conversão em biodiesel foi de 4,68%, obtida com o extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI), seguido do extrato enzimático bruto (EEB), com 3,86%. Silva [32] e Zenevicz [17], obtiveram resultados similares de produção de ésteres etílicos em solvente orgânico, utilizando lipases não comerciais, obtidas por fermentação em estado sólido de *Penicillium brevicompactum* e *Rhizopus sp.* Ambos os autores, através dos extratos enzimáticos em suas diferentes formas de obtenção, conduziram para produções insignificantes de biodiesel, variando numa faixa de 0,1 a 3,7% de conversão.

Quando analisada a produção do aromatizante geranil propionato, esta também pode ser considerada satisfatória para EEB (38,89%) e EEBI (37,09%), uma vez que fatores como razão molar, tempo de reação, temperatura e concentração de enzima influenciam, fortemente, no rendimento das reações [18]. Entretanto, novos estudos poderão ser conduzidos a fim de otimizar a produção desse aroma.

Aromas produzidos biotecnologicamente são considerados naturais e promovem maior aceitação por parte do consumidor [33]. São obtidos, principalmente, através de processos fermentativos e enzimáticos e são menos agressivos ao

meio ambiente. Os ésteres são compostos orgânicos com propriedades aromáticas. Ésteres produzidos a partir de ácidos alifáticos e álcoois terpênicos de origem natural estão sendo utilizados nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentos [18]. A produção de hexil laurato utilizando a enzima Lipozyme IM 77 em sistema livre de solvente, foi estudada por Chang et al. [34]. As condições ótimas de síntese foram encontradas no tempo de reação de 40 minutos, 58° C, concentração da enzima de 25,4 mg L<sup>-1</sup> e um pH de 5,9, com 69,7% de conversão.

Convém salientar que o tipo de imobilização a ser utilizada depende do processo, em que o biocatalisador foi empregado, da natureza da enzima, de seu extrato original e de outros aspectos. A busca pelo “biocatalisador ideal”, que é definido como aquela enzima que se enquadra, idealmente, em um processo otimizado, requer a definição das variáveis de processo e, portanto, de um conjunto de parâmetros relacionados à enzima [35,36].

#### 4 Conclusões

A atividade enzimática dos extratos depende do suporte utilizado, sendo que o mais adequado para a imobilização, nas condições estudadas, foi o alginato de sódio, o qual aumentou a atividade enzimática dos extratos brutos e precipitados de 202,67 U g<sup>-1</sup> e 209,28 U g<sup>-1</sup> para 240,59 U g<sup>-1</sup> e 228,76 U g<sup>-1</sup>, respectivamente. A produção enzimática de ésteres foi mais satisfatória para o extrato bruto imobilizado, corroborando a maior atividade enzimática também encontrada nessas condições, com resultados de esterificação de ácido oleico (64,48%) e do óleo vegetal (4,68%).

#### Agradecimentos

Laboratório de Microbiologia, URI- Campus Erechim/RS.

### IMOBILIZATION OF LIPOLITIC CONCENTRATE OF *PENICILLIUM CRUSTOSUM* IN DIFFERENT SUPPORTS FOR APPLICATION IN SYNTHESIS REACTIONS

**ABSTRACT:** The objective of this work was to evaluate the immobilization of the crude and precipitated lipolytic concentrate obtained from the filamentous fungus *Penicillium crustosum* in two substrates, sodium alginate and clay A and evaluation of the enzymatic activity in the esterification process. An immobilization of extracts was produced at the Erechim campus URI. The crude and precipitated enzymatic extract was immobilized in sodium alginate with activated carbon and well A montmorillonite according to consolidated methodologies and, after that, the enzymatic synthesis activity was determined for the two supports. Next, we performed an enzymatic transesterification of vegetable oils in organic medium, an enzymatic synthesis of ethyl oleate in

a solvent-free system, an enzymatic esterification of geraniol and propionic acid and a determination of the conversion of transesterification of soybean oil. In the immobilization step, the most effective support for the soil, the crude extract, and the precipitate. An enzymatic production of ester and more satisfactory in the esterification of oleic acid, presenting conversion of 64.48% of ethyl oleate to the immobilized crude extract. For a transesterification reaction of vegetable oil, the highest conversion was 4.68% for the immobilized crude extract. Thus, the most adequate support, under the conditions studied, was sodium alginate. An enzymatic production of esters was more satisfactory for the immobilized crude extract, in agreement with a higher enzymatic activity, also found under these conditions, and, therefore, presented in general, as the best performance found.

**Keywords:** Enzymes; Lipase, esterification.

#### Referências

- [1] KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*. Vol. 40, p. 1-15, 2012.
- [2] BADGUJAR, C. K.; DHAKE, P. K.; BHANAGE, M. B. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions. *Process Biochemistry*, Vol. 48, p. 1335-1347, 2013.
- [3] LERIN, L. A. Produção enzimática de ascorbil palmitato em diferentes sistemas reacionais. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010.
- [4] SALIHU, A., et al. Lipase production: Na insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*. Vol. 58, p. 36-44, 2012.
- [5] TREICHEL, J. L., et al. Retinal toxicity in methanol poisoning. *Retina* Vol. 24, p. 309-312, 2004.
- [6] MACARIO, A. et al. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Microporous Mesoporous Mater*. Vol. 118, p.334-340, 2009.
- [7] GIORNO, L.; DE BARTOLO, L.; DRIOLI, E. Membrane bioreactors for biotechnology and medical applications. *Membrane Science and Technology*, Vol. 8, p. 187-217. 2003.
- [8] ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa.; p.35-86, 2004.
- [9] MATEO, C., et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 40, p. 2451-1463, 2007.
- [10] MILETIC, N. et al. Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins- Versatile immobilization supports for biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 56, p. 196-201, 2009.



- [11] RIGO, E., et al. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *Lebensmittel- Wissenschaft + Technol. / Food Science + Technol.* Vol. 43, p. 1132-1137, 2010.
- [12] MENONCIN, S., et al. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran. *Food and Bioprocess Technology: An International Journal.* Vol. 3, p. 537-544, 2009.
- [13] RISSO, F. V. A. Síntese de oligossacarídeos em meio orgânico e aquoso utilizando-se inulinase livre e imobilizada produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 E NRRL Y-7571. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- [14] COGHETTO, C. C. Imobilização da Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em Suporte Inorgânico. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. 2011.
- [15] BERNARDES, O.L., et al. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* Vol. 32, p.136-140, 2007.
- [16] FACCIO, C. Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. 2004.
- [17] ZENEVICZ, M. C. P. Avaliação da atividade enzimática de lipases e aplicações em reações de interesse utilizando GLP pressurizado. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil. 2011.
- [18] PAROUL, N. Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul. 2011a.
- [19] EN14103: 2011 "Fat and oil derivatives- Fatty Acid Methyl Esters (FAME)- Determination of Ester and linolenic acid methyl Ester content", European Committee for Standardization, Management Centre: Avenue Marnix 17:B- 1000 Brussels.
- [20] PAROUL N., et al. Erratum to: Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. *Bioprocess and biosystems engineering.* Vol. 34, p. 331-337. 2011b.
- [21] FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras,* Vol. 38, p. 109-112, 2014.
- [22] DIZGE, N., et al. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology.* Vol. 100, p. 1983-1991, 2009.
- [23] BRYJAK, J.; TROCHIMCZUK, A.W. Immobilization of penicillina cylase on hydrophobic acrylic carriers. *Enzyme and Microbial Technology.* Vol. 39, p. 573-578, 2006.
- [24] NICOLETTI, G. Imobilização de lipase b de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranyl propionato. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.
- [25] ROCHA W. S., GROSSO C.R.F. Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose. *Sitientibus, Feira de Santana.* Vol. 35, p. 125-148, 2006.
- [26] ROSSETTO, E., BERARDIN, R., PENHA, F. G., PERGHER, S. B. C. Caracterização de argilas bentonitas e diatomitas e sua aplicação como adsorventes. *Química Nova.* Vol. 32, p. 2064-2067, 2009.
- [27] ZHANG, T., et al. Preparation of activated carbon from forest and agricultural residues through CO2 activation, *Chem Eng Journal.* Vol. 105, p. 53-59, 2004.
- [28] SAMANT, P. V., et al. Carbon supports for methanol oxidation catalyst. *Journal of Power Sources,* Vol. 151, p. 79-84, 2005.
- [29] KAEWTHONG, W. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palmolein with immobilized lipase. *Process Biochemistry.* Vol. 40, p. 1525-1530, 2005.
- [30] MENDES, A. A., et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova.* Vol. 34, p. 831-840, 2011.
- [31] SECUNDO, F. et al. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous Mesoporous Mater.* Vol. 109, p. 350-361, 2008.
- [32] SILVA M. F.; Produção e caracterização parcial de lipases de *penicillium verrucosum* e *penicillium brevicompactum* utilizando como substratos torta de babaçu e farelo de mamona. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim. 2010.
- [33] MARÓSTICA, J.M.R. Biotransformação de terpenos para produção de compostos de aroma funcionais. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2006.
- [34] CHANG, H.; LIAO, H.; LEE, C.; SHIEH, C. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *Chemical Technology and Biotechnology.* Vol. 80, p.307-312, 2005.
- [35] BURTON, S. G.; COWAN, D. A.; WOODLEY, J. M. The Search for the Ideal Biocatalyst. *Nature Biotechnology.* Vol. 20, p. 37-45, 2002.
- [36] LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and Industrial Applications. *Nature Reviews Microbiology.* Vol. 3, p. 510-516, 2005.