

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BUTIRATO DE ISOAMILA EMPREGANDO LIPASES MICROBIANAS COMERCIAIS

Vitor Cardoso Aragão, Andréia Anschau, Barbara Daniele Almeida Porciuncula, Cleidi Thiesen, Susana Juliano Kalil, Carlos André Veiga Burkert e Janaína Fernandes de Medeiros Burkert*

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900 Rio Grande – RS, Brasil

Recebido em 28/5/08; aceito em 21/5/09; publicado na web em 10/11/09

ENZYMATIC SYNTHESIS ISOAMYL BUTYRATE EMPLOYING COMMERCIAL MICROBIAL LIPASES. Isoamyl butyrate production was investigated using free and immobilized lipases by esterification of butyric acid with isoamyl alcohol in a solvent-free system and in an organic media. Among the enzymes studied, Lipozyme TL IM was found to be the most active catalyst in n-hexane as a solvent. The effects of different solvents and the amount of water added on conversion rates were studied. A maximum conversion yield of 80% in n-hexano at 48 h was obtained under the following conditions: 3 g L⁻¹ of Lipozyme TL IM, 30 °C, 180 rpm of agitation, isoamyl alcohol to butyric acid molar ratio of 1:1 and acid substrate concentration of 0.06 M.

Keywords: enzymatic esterification; organic media; lipase.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o estilo de vida saudável vem sendo adotado por um número cada vez maior de pessoas, incluindo principalmente uma alimentação baseada em produtos que não comprometam a saúde ou até promovam benefícios à mesma. Com isso, uma tendência é a preferência por alimentos, ingredientes e aditivos naturais. Nesse contexto, os aditivos naturais têm recebido especial atenção por parte dos consumidores.¹

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios e a conquista de novos mercados aumenta a demanda por aromas, pois as características sensoriais destes produtos estão diretamente relacionadas à aceitação pelo consumidor.²

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.¹

Os ésteres podem ser obtidos por três técnicas: extração de fontes naturais, sínteses químicas e enzimáticas. Muitos deles podem ser obtidos diretamente de extração de plantas, mas o alto custo e a pequena quantidade de produto obtido indica que essa técnica é inadequada para aplicações industriais. Na última década a biotecnologia vem sendo considerada para a produção de ésteres, uma vez que o aroma obtido pode ser considerado como “natural”.³ 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.⁴

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.⁵

Embora o processo biotecnológico ainda seja mais caro que a síntese química, possui vantagens ambientais, ao utilizar enzimas em substituição aos ácidos inorgânicos geralmente aplicados como catalisadores nas sínteses químicas, minimizando a geração de resíduos da reação.³

Nesse sentido, observa-se que ésteres produzidos por síntese enzimática utilizando lipases muitas vezes apresentam aroma e odor característicos mais semelhantes ao natural quando comparados aos produzidos por vias convencionais.⁶

O aroma típico de cada produto é resultado da combinação de dezenas de substâncias voláteis representantes de diversas classes químicas, com diferentes propriedades físico-químicas. Nenhum constituinte individual é totalmente responsável pelo aroma característico de um alimento, mas em alguns produtos existem um ou mais componentes que, sozinhos, lembram a qualidade característica de seu aroma.⁷

A informação relativa à fração volátil responsável pelo aroma das peras é escassa em comparação com outros frutos, no entanto, já foram identificados 79 compostos voláteis que incluem ésteres, álcoois, hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas. O grupo dos ésteres é o mais importante representando 60 a 98% dos voláteis produzidos por estes frutos. O acetato de hexila e butirato de isoamila são compostos voláteis que contribuem em muito para o aroma característico da pera. Estes compostos responsáveis pelo aroma, se forem apreciados isoladamente, têm cheiros característicos e ocorrem nos frutos em proporções bastante diferentes.⁸

As lipases são hidrolases (E.C. 3.1.1.3) que atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Além de quebrar as ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas como, por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico. Essas reações usualmente são processadas com alta regio e/ou enantiosseletividade, tornando as lipases um importante grupo de biocatalisadores. As razões do grande potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: sua alta estabilidade em solventes orgânicos; não requerem a presença de cofatores; possuem uma larga especificidade pelo substrato e, exibem uma alta enantiosseletividade.⁹

Essas enzimas podem ser aplicadas em inúmeras áreas, dentre elas pode-se citar a indústria oleoquímica em processos como hidrólise, glicerólise e alcoólise, na produção de ácidos graxos poli-insaturados (aditivos de alimentos), na indústria têxtil (melhoria da qualidade e propriedade dos tecidos), na indústria de detergentes (remoção de manchas de batom, frituras, manteiga, azeites e molhos), na modificação de sabores (fermentação de salame e queijo), na indústria de aromas, na biorremediação, na síntese de biodiesel, entre outras.¹⁰

*e-mail: jfmb@vetorial.net

A obtenção de ésteres, componentes de aroma, através de via enzimática utilizando lipases como biocatalisadores é descrita em diversos sistemas reacionais. A síntese dos ésteres acetato de isoamila,³ butirato de metila¹¹ e acetato de butila¹² foi realizada em meio orgânico utilizando diferentes solventes. O valerato de etila,¹³ acetato de hexila,¹³ acetato de butila¹² e laurato de hexila¹⁴ foram obtidos através de sistema livre de solvente orgânico. A síntese do acetato de isoamila¹⁵ é descrita utilizando sistemas com líquidos iônicos.

Vários estudos têm demonstrado a obtenção de ésteres sintetizados com altos rendimentos utilizando diversas lipases de origem microbiana.^{2,3,11,16} 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.¹⁷

Enzimas microbianas têm sido imobilizadas em espuma de poliuretano,⁴ nanopartículas de sílica,¹⁸ polímeros microporosos,¹⁹ microesferas magnéticas com grupos epóxi,²⁰ sílica gel²¹ e bentonita modificada²² e inúmeros estudos têm demonstrado suas vantagens como biocatalisadores em meio orgânico, devido à alta produtividade, estabilidade, fácil recuperação e reutilização do catalisador.²³

Este trabalho teve por objetivo investigar a habilidade de lipases microbianas livres e imobilizadas, em catalisar a reação de síntese do éster butirato de isoamila em meio livre de solvente orgânico e na presença de solvente em diferentes condições reacionais.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes

Foram utilizados ácido butírico, álcool isoamílico, álcool etílico (Vetec) e os solventes n-heptano, n-hexano, tolueno, clorofórmio e acetona (Merck Co.). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Biocatalisadores

Foram utilizadas quatro lipases comerciais, cujas atividades enzimáticas foram determinadas segundo o método baseado na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima, sobre os triglicerídeos do óleo de oliva emulsionados em goma arábica.²⁴

Duas lipases imobilizadas foram gentilmente fornecidas pela Novozymes (Dinamarca): a Lipozyme TL IM imobilizada em sílica e a Lipozyme RM IM imobilizada em resina aniônica, produzidas por fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, onde os micro-organismos doadores de gene que expressa a produção de lipase são o *Thermomyces lanuginosus* e o *Rhizomucor miehei*, respectivamente. Segundo a Novozymes, a Lipozyme TL IM é um produto granulado, seco, marrom-claro, com tamanho de partícula de 0,3-1,0 mm. As outras enzimas utilizadas foram as lipases comerciais livres AY “Amano 30” e GC Amano, gentilmente cedidas pela Amano Pharmaceutical CO. (Japão), cujas fontes microbianas são, respectivamente, *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*.

Condições das reações de esterificação

As reações de esterificação foram realizadas em reatores de vidro fechados e selados de 100 mL, contendo 40 mL de volume útil.²⁵ O sistema de reação foi composto pelo ácido butírico, álcool isoamílico, pérolas de vidro e enzima (livre ou imobilizada) em presença de solvente orgânico ou em meio livre de solvente. Experimentos sem adição de enzima foram preparados a fim de avaliar a porcentagem de esterificação espontânea do sistema (controle). Uma vez dissol-

vidos os substratos no solvente, 3 g L⁻¹ da enzima foi adicionada ao meio reacional e os frascos colocados em agitador rotatório a 30 °C e 180 rpm, razão molar álcool:ácido 1:1 e concentração de ácido 0,06 M por 72 h.²⁶ Foram recolhidas alíquotas ao longo de tempos pré-determinados, avaliando-se a porcentagem de esterificação. Os ensaios de síntese enzimática foram realizados em triplicata.

Influência de diferentes solventes

Nas mesmas condições reacionais descritas anteriormente foram testados os solventes acetona, clorofórmio, tolueno, hexano e heptano, que apresentam valores de log P -0,23, 2, 2,5, 3,5 e 4,0, respectivamente.

Adição inicial de água no sistema reacional

Para a avaliação da influência da adição de água no início da reação, primeiramente as soluções de ácido e álcool diluídas em n-hexano foram tratadas com sulfato de magnésio anidro, com o objetivo de eliminar a água presente nas soluções e, então, realizados ensaios com adição inicial de 0, 0,075, 0,125 e 0,175% (v/v), e ainda um ensaio padrão (sem a adição inicial de água e sem tratamento), nas condições reacionais descritas anteriormente.

Determinação da porcentagem de esterificação

O teor de ácido graxo residual foi determinado através da titulação de 1 mL de alíquota, nos diferentes tempos de síntese, diluída em 3 mL de etanol³ contendo 0,1% de fenolftaleína e tituladas com KOH 0,02 N, previamente padronizado.^{3,12,13,27} A esterificação foi expressa em percentual molar do ácido consumido segundo a Equação 1:^{25,28}

$$\% \text{ molar} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

onde: C₀ = concentração inicial dos ácidos graxos residuais livres no tempo 0 h; C = concentração final dos ácidos graxos residuais livres no tempo t.

Análise estatística

Os dados foram tratados estatisticamente através de análise de variância e teste de Tukey (p<0,05) utilizando o software Statistica versão 5.0 (Statsoft) em função do máximo percentual de esterificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência do sistema reacional e dos biocatalisadores

A reação de esterificação para a síntese do butirato de isoamila variou marcadamente com a enzima utilizada tendo em vista que lipases provenientes de fontes distintas exibem diferentes especificidades frente ao substrato, bem como com a presença ou ausência de solvente orgânico e o tipo de suporte utilizado na imobilização.

Através da determinação da atividade lipolítica verificou-se que a Lipozyme TL IM imobilizada em sílica apresentou 53,1 U g⁻¹, enquanto que para Lipozyme RM IM imobilizada em resina aniônica a atividade foi de 4,6 U g⁻¹. Já as lipases comerciais livres AY “Amano 30” e GC Amano alcançaram 1345,5 e 1921 U g⁻¹, respectivamente.

A lipase comercial livre GC Amano, apesar de apresentar a maior atividade lipolítica demonstrada através da hidrólise, não apresentou capacidade de esterificação para o butirato de isoamila, bem como o sistema sem a presença de biocatalisador.

A síntese de butirato de isoamila em meio livre de solvente orgânico somente foi observada com a lipase imobilizada Lipozyme RM IM, conforme apresentado na Figura 1, alcançando valores baixos, com 4% de esterificação após 72 h. Na presença de n-hexano com a lipase comercial imobilizada Lipozyme TL IM a conversão na reação de síntese alcançou aproximadamente 80% de esterificação em 24 h e com a biocatálise através da Lipozyme RM IM atingiu-se 20% em 72 h. Comportamento semelhante foi observado na síntese de isoalerato de isoamila utilizando a lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* em meio livre de solvente e em n-hexano, no qual a reação de síntese alcançou cerca de 20 e 80% de esterificação, respectivamente.²⁹

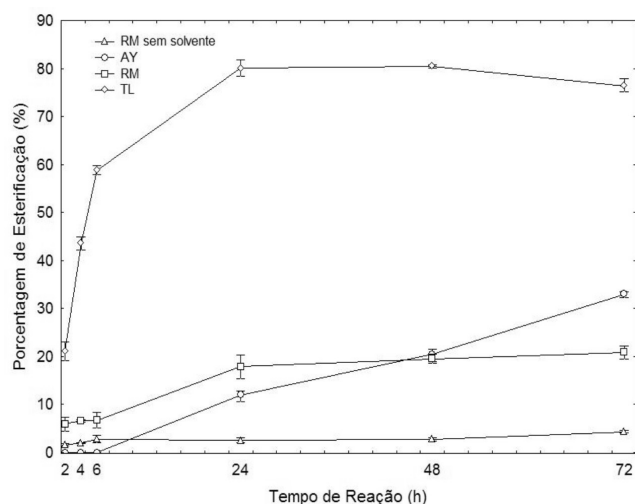


Figura 1. Síntese de butirato de isoamila utilizando lipases comerciais livres e imobilizadas a 30 °C, 180 rpm, razão molar álcool:ácido 1:1, [ácido]=0,06 M e concentração enzimática de 3 g L⁻¹

Em contrapartida em nosso trabalho, quando utilizada a lipase livre AY Amano 30, a reação de síntese apresentou conversões superiores a 30% de esterificação em 72 h (Figura 1), contrariando estudos realizados na síntese de acetoacetato de n-butila onde foram testadas as lipases imobilizadas Novozym SP 435, Lipozyme IM 20 e Lipozyme TL IM e as lipases livres AK e OS (Amano Pharmaceutical CO), não sendo observada esterificação através da utilização das lipases livres.²⁷

Na Figura 1 observa-se que quando utilizada a Lipozyme TL IM na reação de esterificação alcançou-se um máximo de conversão de 80,5% em 48 h; enquanto que com o uso da Lipozyme RM IM obteve-se 20,9% e com a lipase livre AY Amano atingiu-se 33% de esterificação, ambas em 72 h. A maximização da produtividade pode ser alcançada pela utilização de solventes apropriados e pela imobilização das lipases em suportes sólidos, o que traz efeito benéfico na estabilidade das mesmas, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima.²⁸

A presença de um solvente hidrofóbico como o n-hexano que apresenta o logaritmo do coeficiente de partição (log P) igual a 3,5 favoreceu a esterificação de butirato de butila com Lipozyme TM.^{20,25} concordante com o modelo proposto por Laane *et al.*³⁰ em que a reação enzimática se processa em maior extensão na presença de solventes orgânicos com log P > 3.

O uso da lipase TL IM na síntese do butirato de isoamila resultou em valores de conversão promissores, o que possibilita que essa enzima possa ser objeto de estudos posteriores por possuir bom potencial de aplicação na síntese de ésteres, componentes de aroma em alimentos. Conforme os resultados da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p<0,05) observa-se que a lipase imobilizada TL IM apresentou um percentual máximo de conversão superior às demais

lipases (80,5 ± 0,3), diferindo significativamente ao nível de 5%, sendo selecionada nesta etapa.

Efeito de diferentes solventes orgânicos

O logaritmo do coeficiente de partição (log P), de um composto entre n-octanol e água, tem sido amplamente empregado para prever o rendimento de uma reação, em presença de determinado solvente.²⁶ Conforme Laane *et al.*,³⁰ a reação enzimática ocorre em maior extensão na presença de solventes hidrofóbicos (log P > 3,0) e em menor na presença de solventes hidrofílicos (log P < 2,0). Existe, porém, uma tendência de se utilizar critérios adicionais, como densidade, viscosidade, toxicidade, ponto de ebulição, entre outros, para garantir um adequado grau de biocompatibilidade do solvente com o biocatalisador.²⁵

Outro aspecto a ser ressaltado é que os solventes podem agir na enzima inibindo sua atividade, alterando ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, competindo pelo seu sítio ativo³¹ e podem retirar a água essencial que se encontra na superfície externa das moléculas das enzimas que é crucial para manutenção da atividade catalítica.³²

O critério utilizado neste trabalho para a seleção dos solventes foi baseado no log P³⁰ e na legislação vigente para aromatizantes. Os solventes utilizados foram acetona, clorofórmio, tolueno, hexano e heptano, que apresentam log P -0,23, 2, 2,5, 3,5 e 4,0, respectivamente.

A enzima usada neste teste foi a lipase imobilizada TL IM, selecionada no item anterior. Segundo a Novozymes, a Lipozyme TL IM imobilizada em sílica é particularmente indicada para reações de esterificação e interesterificação envolvendo uma grande gama de diferentes moléculas de álcool e ácido, sendo especificamente indicada para aplicações em reatores de leito fixo.

Uma triagem preliminar em cinco solventes baseada na influência do caráter hidrofóbico ou hidrofílico (medido como log P) e no grau de esterificação alcançado está apresentada na Tabela 1, onde a relação entre percentual de esterificação e log P, nas condições experimentais empregadas, não foi plenamente obedecida. Solventes com valores próximos de log P, como clorofórmio e tolueno, forneceram graus de esterificação largamente divergentes estatisticamente através do teste de Tukey (p<0,05), o que reflete a complexidade da atividade de esterificação dependente dos solventes. Provavelmente, este fato pode ser devido à membrana de revestimento da imobilização ter fornecido à lipase uma habilidade mais tolerante à polaridade, realçando a proteção da enzima e impedindo esses solventes de retirarem a água essencial em torno da lipase.

Tabela 1. Máxima porcentagem de esterificação utilizando diferentes solventes na síntese do butirato de isoamila

Solvente	Log P	Percentual Máximo de Esterificação (%)
n-Heptano	4,0	84,5 ^a ± 0,5
n-Hexano	3,5	80,1 ^b ± 1,6
Tolueno	2,5	62,9 ^c ± 2,4
Clorofórmio	2,0	90,3 ^d ± 1,2
Acetona	-0,23	0,00 ^e

Condições reacionais: 30 °C, 180 rpm, razão molar álcool:ácido 1:1, [ácido]=0,06 M e [Lipozyme TL IM]=3 g L⁻¹. Letras distintas de percentual máximo de esterificação significam que as amostras são diferentes (p<0,05).

Os solventes orgânicos n-hexano e n-heptano, de natureza química similar, apresentaram resultados semelhantes, onde se pode constatar que o comprimento da cadeia exerce efeito insignificante, alcançando em 48 h uma conversão de 80,1 e 84,5%, respectivamente (Figura

2). Estes resultados estão de acordo com os obtidos na síntese de acetato de butila com lipase imobilizada de *Rhizopus oryzae*, sendo alcançada uma conversão de 76% de esterificação para o hexano e 80% de esterificação para o heptano após 30 h de reação.¹²

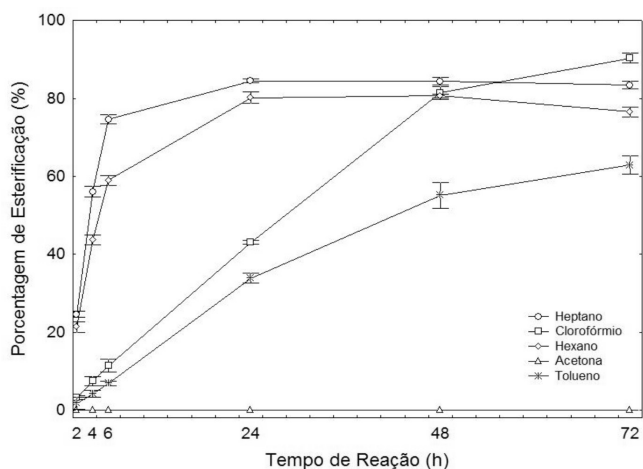


Figura 2. Síntese de butirato de isoamila em diferentes solventes a 30 °C, 180 rpm, razão molar álcool:ácido 1:1, [ácido]=0,06 M e [Lipozyme TL IM]=3 g L⁻¹

Na Tabela 1 e Figura 2, verifica-se que o maior percentual de esterificação (90,3%) foi obtido em clorofórmio com 72 h de reação, sendo diferente estatisticamente dos demais solventes. O butirato de isoamila não foi obtido na presença de acetona, sendo que a mesma pode ter retirado a água essencial, presente na superfície, necessária à atividade da lipase, distorcendo assim a conformação catalítica, conduzindo à inativação da enzima. Resultado semelhante foi observado por Castro *et al.*²⁵ na síntese enzimática do butirato de butila com a Lipozyme TM,²⁰ onde a porcentagem de esterificação utilizando acetona como solvente foi marcadamente inferior do que quando usado clorofórmio, ciclo-hexano, hexano ou heptano.

Com base na RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007 da ANVISA, é permitido o uso de alguns solventes na elaboração de aromatizantes em quantidades prescritas, dentre os quais acetona, n-hexano e tolueno são permitidos em pequenas concentrações. No entanto, o solvente orgânico n-hexano pode ser usado para aplicações em alimentos,³³ sendo este selecionado para estudos posteriores que visam a otimização de parâmetros reacionais na síntese do butirato de isoamila.

Adição inicial de água no sistema reacional

A água é crítica para as enzimas e afeta a sua atividade de várias maneiras: influenciando sua estrutura através da ligação e do rompimento não covalente de ligações de hidrogênio; facilitando a difusão dos reagentes e, influenciando o equilíbrio da reação. Tanto o índice de água muito baixo pode diminuir a atividade da enzima quanto o elevado pode diminuir as taxas da reação, agregando partículas da enzima e causando limitações da difusão.³³

A concentração de água ideal não só é importante para preservar a atividade catalítica de uma enzima, mas também para conseguir uma reação elevada aliada a altos rendimentos e estabilidade da enzima. As exigências de água para enzimas em meios orgânicos variam extremamente; cada enzima deve ser estudada em vários níveis de hidratação.³³

A atividade enzimática em solventes orgânicos depende do conteúdo de água. Em solventes hidrofóbicos muito menos água é necessária para alcançar a máxima atividade do que em solventes

hidrofílicos, onde o conteúdo de água requerido é maior.³⁴ Normalmente, as lipases apresentam maiores atividades em solventes orgânicos contendo uma pequena atividade de água e onde uma completa remoção de água produzida na reação levaria a uma menor taxa de conversão.³⁵

Com o aumento de 0,075% (30 µL) para 0,175% (70 µL), a porcentagem máxima de esterificação decresceu de 83 para 72%. Onde não houve a adição de água ocorreu a maior conversão de 87% e o padrão alcançou 80% (Figura 3). Efeitos semelhantes foram encontrados na síntese de laurato de citrônio em n-heptano com Novozym SP 435.³⁶

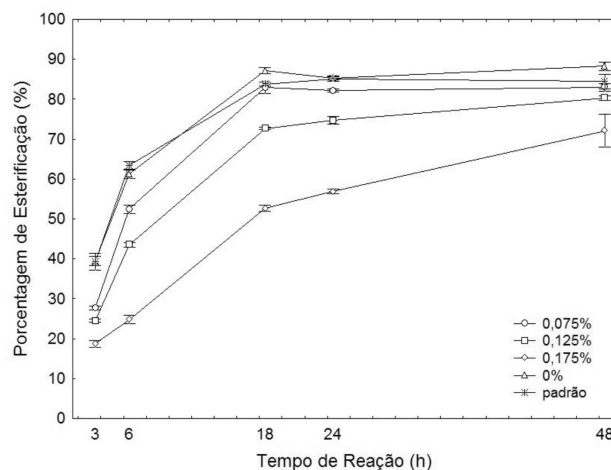


Figura 3. Efeito da adição inicial de água na síntese de butirato de isoamila a 30 °C, 180 rpm, razão molar álcool:ácido 1:1, [ácido]=0,06 M e [Lipozyme TL IM]=3 g L⁻¹

Conforme teste de Tukey realizado observou-se que a adição inicial de água até 0,125% (50 µL) não diferiu do sistema anidro e do padrão. A adição de 0,175% (70 µL) diferiu de todos os outros ensaios, sendo prejudicial à síntese. Resultados similares foram verificados na síntese de oleato de isoamila utilizando a lipase Novozym 435.³⁷ Este comportamento pode ser explicado uma vez que um índice elevado de adição de água inicial no sistema possa ter favorecido a reação inversa, a hidrólise.

A água tem um efeito duplo nas reações catalisadas por enzimas, por um lado preserva a conformação catalítica da enzima favorecendo sua atividade, mas por outro lado afeta sua estabilidade, uma vez que esta participa de seu processo de termoinativação.³⁸

Portanto, para a síntese do butirato de isoamila foi indicado não tratar os reagentes e não adicionar água (ensaio padrão), tornando assim mais econômico o processo, visto que não houve incremento significativo na esterificação.

CONCLUSÕES

A síntese do butirato de isoamila foi conduzida em diferentes sistemas utilizando solventes orgânicos. Com base nos resultados obtidos foi selecionado o sistema reacional em meio orgânico contendo n-hexano, pelo fato deste solvente ser permitido pela legislação brasileira na obtenção de aromas. Quatro lipases comerciais, livres e imobilizadas, foram avaliadas como biocatalisadores, sendo selecionada a lipase comercial imobilizada TL IM para a síntese do butirato de isoamila.

No estudo da influência da adição inicial de água no sistema foi indicado não tratar os reagentes comerciais e não adicionar água, tornando assim o processo mais econômico, visto que não houve aumento significativo na esterificação.

A máxima porcentagem de esterificação atingida na síntese de butirato de isoamila foi utilizando 3 g L⁻¹ de Lipozyme TL IM como biocatalisador a 30 °C, 180 rpm, razão molar álcool:ácido 1:1 e concentração do ácido de 0,06M, alcançando uma conversão superior a 80% em 48 h.

AGRADECIMENTOS

À FAPERGS – Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – e ao Programa de Educação Tutorial - Mec/SeSu.

REFERÊNCIAS

1. Melo, L. L. M. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
2. Nogales, J. M. R.; Roura, E.; Contreras, E.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 63.
3. Romero, M. D.; Calvo, L.; Alba, C.; Daneshfar, A.; *J. Biotechnol.* **2007**, *127*, 269.
4. Pires-Cabral, P.; Fonseca da, M. M. R.; Ferreira-Dias, S.; *Biochem. Eng. J.* **2009**, *43*, 327.
5. Razafindralambo, H.; Blecker, C.; Lognay, G.; Marlier, M.; Wathelet, P.; Severin, M.; *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 247.
6. Krishna, S. H.; Karanth, N. G.; *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *67*, 32.
7. Franco, M. R. B.; *Aroma e sabor de alimentos: temas atuais*, Livraria Varela: São Paulo, 2004, cap. 3.
8. Santinho, C.; Barreiro, M. G.; Sousa, R.; Vilas Boas, L.; *Jornadas Técnicas. Pomóideas. Projecto B. Programa de Apoio à Reforma das Instituições Públicas ou de Interesse Público de Investigação – PARIPIPI*, Alcobaça, Portugal, 2004.
9. Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Aguiar, C. L.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 146.
10. Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.
11. Shih, I. L.; Hung, S. H.; Chen, F. Y.; Ju, H. Y.; Shieh, C. J.; *Food Chem.* **2007**, *100*, 1223.
12. Salah, R. B.; Ghamghui, H.; Miled, N.; Mejdoub, H.; Gargouri, Y.; *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, *103*, 368.
13. Chaabouni, M. K.; Ghamgui, H.; Bezzine, S.; Rekik, A.; Gargouri, Y.; *Process Biochem.* **2006**, *41*, 1692.
14. Chang, S-W.; Shaw, J-F.; Sheih, C-H.; Shieh, C-J.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7125.
15. Fehér, E.; Illeová, V.; Kelemen-Horváth, I.; Bélafi-Bakó, K.; Polakovic, M.; Gubicza, L.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *50*, 28.
16. Iwai, M.; Okumuras, S.; Tsujisaka, Y.; *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 2731.
17. Bezbradica, D.; Mijin, D.; Siler-Marinković, S.; Knežević, Z.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *45*, 97.
18. Dandavate, V.; Keharia, H.; Madamwar, D.; *Process Biochem.* **2009**, *44*, 349.
19. Dizge, N.; Aydinler, C.; Imer, D. I.; Bayramoglu, M.; Tanriseven, A.; Keskinler, ???; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 1983.
20. Lei, L.; Bai, Y.; Li, Y.; Yi, L.; Yang, Y.; Xia, C.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 252.
21. Ozyilmaz, G.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *56*, 231.
22. Ghiaci, M.; Aghaei, H.; Soleimani, S.; Sedaghat, M. E.; *Appl. Clay Sci.* **2009**, *43*, 289.
23. Trubiano, G.; Borio, D.; Errazu, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 716.
24. Burkert, J. F. M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. I.; *Bioresour. Technol.* **2004**, *91*, 77.
25. Castro, H. F.; Oliveira, P. C.; Soares, C. M. F. C.; *Tecnol. Alim.* **1997**, *17*, 237.
26. Krishna, S. H.; Divakar, S.; Prapulla, S. G.; Karanth, N. G.; *J. Biotechnol.* **2001**, *87*, 193.
27. Yadav, G. D.; Lathi, P. S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *32*, 107.
28. Gomes, F. M.; Paula, A. V.; Silva, G. S.; Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 710.
29. Chowdary, G. V.; Ramesh, M. N.; Prapulla, S. C.; *Process Biochem.* **2000**, *36*, 331.
30. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81.
31. Macarie, E. A.; Baratti, J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 377.
32. Wu, J.; Song, B.; Xing, A.; Hayashi, Y.; Talukder, M. M. R.; Wang, S.; *Process Biochem.* **2002**, *37*, 1229.
33. Chowdary, G. V.; Prapulla, S. G.; *Process Biochem.* **2002**, *38*, 393.
34. Kitagawa, M.; Raku, T.; Shimakawa, H.; Fan, H.; Tokiwa, Y.; *Macromol. Biosci.* **2002**, *2*, 233.
35. Tsukamoto, J.; Haebel, S.; Valença, G.; Peter, M.; Franco, T.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 1486.
36. Yadav, G. D.; Lathi, P. S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *27*, 113.
37. Dörmo, N.; Bélafi-Bakó, K.; Barthá, L.; Ehrenstein, U.; Gubicza, L.; *Biochem. Eng. J.* **2004**, *21*, 229.
38. Perez, V. H.; Miranda, E. A.; Valença, G. P.; *Biochem. Biotechnol.* **2007**, *136*, 23.
39. http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.htm, acessada em Maio 2009.
40. [http://www.novozymes.com/en/MainStructure/ProductsAndSolutions/Biocatalysis/ Commercial+products/Lipozyme+TL+IM/ Lipozyme+TL+IM](http://www.novozymes.com/en/MainStructure/ProductsAndSolutions/Biocatalysis/Commercial+products/Lipozyme+TL+IM/Lipozyme+TL+IM), acessada em Março 2009.