



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS – UFT
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA

DANYLO BEZERRA MENDES

**SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES COM
POTENCIAL DE APLICAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE
ENZIMÁTICA**

PALMAS – TO
2019

DANYLO BEZERRA MENDES

**SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES COM
POTENCIAL DE APLICAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE
ENZIMÁTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e biodiversidade na linha de pesquisa em Bioprospecção e Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos

Orientador: Dr. Emerson Adriano Guarda
Coorientador: Dr. Alex Fernando de Almeida

PALMAS – TO
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M538s Mendes, Danylo Bezerra
 Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases com potencial de aplicação para a produção de biodiesel por catálise enzimática / Danylo Bezerra Mendes. - Palmas, TO, 2019.
 133 f.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas – Curso de Pós-graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia, 2019.
 Orientador: Dr. Emerson Adriano Guarda
 Coorientador: Dr. Alex Fernando de Almeida

 1. Enzima. 2. Catalise. 3. Hidrólise. 4. *Fusarium solani*. I. Título.

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DANYLO BEZERRA MENDES

SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA.

Tese apresentada à Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e biodiversidade na linha de pesquisa em Bioprospecção e Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos

Data de aprovação: 01 / 03 / 2019

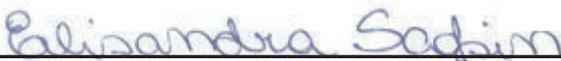
BANCA EXAMINADORA:

PRESIDENTE:

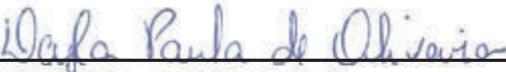


Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda, UFT

EXAMINADORES:



Profª. Dr. Elisandra Scapin, UFT - Bionorte – Palmas



Dr. Deyla Paula de Oliveria, FAPT - Palmas

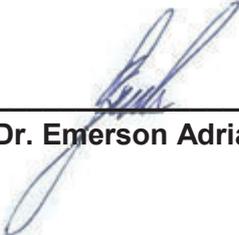


Profª. Dr. Solange Cristina Carreiro UFT – Palmas



Prof. Dr. Guilherme Nobre L. do Nascimento, UFT - Bionorte – Palmas

As sugestões da comissão examinadora e as normas do programa para o formato da tese foram contempladas.



Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda

*Determine que algo pode e deve ser feito, e
então você achará o caminho para fazê-lo.*

Abraham Lincoln

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho (*in memoriam*) a minha querida mãe Telma Bezerra Mendes, minha irmã Neyla Bezerra Mendes, que DEUS esteja as iluminando. Aos meus filhos Mateus Fernandes Bezerra, Ícaro Fernandes Bezerra e minha esposa, amiga e companheira Fabiane Fernandes da Silva. Espero que eles possam desfrutar de tudo que o mundo tem a oferecer de bom, principalmente que não exista mais violência, isso em um futuro bem próximo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por me proporcionar saúde a cada dia de minha vida e a meus familiares;

A minha querida mãe Telma Bezerra Mendes (*in memorian*) e minha querida irmã Neyla Bezerra Mendes (*in memorian*) saudades;

A minha esposa Doutoranda Fabiane Fernandes da Silva e meus filhos Mateus Fernandes Bezerra e Ícaro Fernandes Bezerra, pelo carinho e apoio indispensáveis nas horas difíceis da vida “e deste trabalho”;

Ao meu pai Nermando Veríssimo Mendes e meu irmão Dr. Danyel Bezerra Mendes, pelos ensinamentos de vida, persistência quando necessário e pelo carinho a mim dedicado durante todo esse tempo;

Ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda, pela paciência, dedicação e gentileza de fazer parte da construção deste trabalho, o mesmo me proporcionou um conhecimento inigualável em química;

Ao meu amigo e coorientador, Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida, pela paciência, dedicação e gentileza de fazer parte da construção deste trabalho, o mesmo me proporcionou um conhecimento inigualável em enzimologia e microbiologia;

A todos que fazem parte do LAPEQ – Laboratório de Pesquisas em Química Ambiental e B combustíveis da UFT, pela ajuda e apoio na realização deste trabalho e pelo uso do espaço e equipamentos;

A todos que fazem parte do LAMBIO - laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da UFT, pela ajuda e apoio na realização deste trabalho e pelo uso do espaço e equipamentos;

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com este trabalho e que, mesmo não citados os nomes, tem meu reconhecimento, gratidão e respeito;

A Universidade Federal do Tocantins e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	xi
Lista de gráficos	xii
Lista de figuras	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
OBJETIVO GERAL E ESPECIFICOS	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
CAPÍTULO I – PRODUÇÃO DE BIODIESEL E A CATÁLISE ENZIMÁTICA	
1. Introdução.....	20
2. Biodiesel: Definições e considerações gerais	21
3. Etapas do processo de produção do biodiesel.....	23
4. Reação de transesterificação.....	25
5. Fatores que influenciam a reação de transesterificação.....	27
6. Transesterificação enzimática.....	28
7. Lípases	29
8. Fontes produtoras de lípases.....	31
9. Estrutura e mecanismo de atuação das lípases.....	34
10. Fatores que influenciam a produção de lípases fungicas	36
11. Aplicações biotecnológicas das lípases	37
12. Lípases na produção de biodiesel.....	41
13. Considerações finais.....	44
Referências bibliográficas	44

LISTA DE TABELAS

Capítulo I:

TABELA 1 – Micro-organismos produtores de lipases relatados da literatura	32
TABELA 2 – Fontes e origens de lipases comerciais	39
TABELA 3 – Aplicação biotecnológica de lipases	41
TABELA 4 – Principais vantagens e desvantagens dos processos químicos e enzimáticos para a produção de biodiesel	43

Capítulo II:

TABLE 1. Screening of filamentous fungi for lipolytic enzymes production with hydrolytic and esterification activities	55 e 56
TABLE 2. Molecular identification of filamentous fungi producing lipase	58
TABLE 3. Media composition for lipolytic enzyme production with hydrolytic and esterification activities for <i>Trichodrema sp</i> , <i>Penicilium sp</i> , <i>F. solani</i> and <i>T. harzianum</i>	59
TABLE 4. Source of nitrogen for lipolytic enzyme production with hydrolytic and esterification activities for <i>F. solani</i> F61	61
TABLE 5. Carbon Source for lipolytic enzyme production with hydrolytic and esterification activities for <i>F. solani</i> F61	62 e 63

Capítulo III:

TABLE 1. Range of values studied in experimental planning PB 7, optimization in the production of lipases	76
TABLE 2. First experimental design PB 7, optimization in the production of lipases	77
TABLE 3. Main effects of the variables in PB 7 for optimization in the production of lipases	78
TABLE 4. Range of values studied in the experimental design DCCR 3, optimization in the production of lipases	80
TABLE 5. Experimental planning DCCR 3, optimization in the production of lipases	80
TABLE 6. Regression coefficients for the second experimental design DCCR 3, optimization in the production of lipases	82
TABLE 7. ANOVA for the second experimental design DCCR 3, optimization in the production of lipases	82
TABLE 8. Parameters established for validation	85
TABLE 9. Target for optimization of the enzymatic activity response	85
TABLE 10. Range of DCCR experimental planning, temperature and pH	86
TABLE 11. DCCR experimental design, temperature and pH	87
TABLE 12. Regression coefficients, DCCR experimental design, temperature and pH	88
TABLE 13. ANOVA DCCR experimental design, temperature and pH	88
TABLE 14 Effect of organic solvents on free lipase of <i>Fusarium solani</i>	92

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo III:

Graph 1. Main effects of the significant variables in PB 7	79
Graph 2. Main effects of variables and significant interactions in the second DCCR3	83
Graph 3. Response of experimental validation in lipases production by <i>Fusarium solani</i>	86
Graph 4. Main effects of variables and significant interactions on DCCR, temperature and pH	89
Graphic 5. Effect of pH on the stability of <i>Fusarium solani</i> lipase in the crude extract.	90
Graphic. 6. Thermostability of <i>Fusarium solani</i> in the crude extract	91

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I:

Figura 1 – Etapas do processo de produção de biodiesel	24
Figura 2 – Transesterificação de triacilgliceróis (triglicerídeos)	26
Figura 3 – Reações químicas na transesterificação de triglicerídeos	27
Figura 4 – Processo enzimático da produção de biodiesel	29
Figura 5 – Reações catalisadas por lipase do tipo não específica e 1, 3 específica	30
Figura 6 – Mecanismo de catalise enzimática por lipases	35
Figura 7 – Diferentes reações cat. por lipases em sol. aquosas e não aquosas	39

Capítulo II:

Figure 1. Growth curve for lipolytic enzyme production with hydrolytic and esterification activities for <i>Fusarium solani</i> F61	64
---	----

Capítulo III:

Figure 1 Morphology of <i>Fusarium solani</i> (zoomed 40 times)	72
Figure 2 Response surface for enzymatic activity (Tryptone and Calcium Chloride)	84
Figure 3 Response surface for enzymatic activity (Tryptone and magnesium sulfate)	84
Figure 4 Response surface for enzymatic activity (Calcium chloride and magnesium sulfate)	84
Figure 5 Response surface for the DCCR, temperature and pH	90

LISTA DE ABREVIATURAS

Capítulo I:

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

B-100 – Biodiesel

GEEs – Gases de efeito estufa

CO₂ – Gás Carbônico

SO₂ – Dióxido de enxofre

NaOH – Hidróxido de Sódio

KOH – Hidróxido de Potássio

OFAT – *One factor at time*

DOE – *Design of experiments*

SSF – *Fermentation in solid state*

Capítulo II:

UV – *Ultraviolet*

UFT – *Federal University of Tocantins*

PDA – *Potato dextrose agar*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

PCR – *Polymerase chain reaction*

UFMG – *Federal University of Minas Gerais*

LCPM – *Laboratory of Cellular and Molecular Parasitology*

pNPP – *p-nitrophenyl-palmitate*

Capítulo III:

DCCR – *Rotational compound central delineation*

NaCl – *Sodium chloride*

LAPEQ – *Research Laboratory in Environmental Chemistry and Biofuels*

DMSO – *Dimethylsulfoxide*

PB7 – *Plackett-Burman*

RESUMO

As lipases microbianas são biocatalisadores muito proeminentes devido a sua capacidade de catalisar uma ampla variedade de reações em meios aquosos e não aquosos. Neste trabalho, os fungos filamentosos selecionados foram isolados de folhas decompostas no rio Buritizal, localizado em Taquaruçu no Estado do Tocantins e identificados com o gene ITS, foram rastreados para produção de lipase com atividade hidrolítica e esterificação. *Fusarium solani* apresentou a maior produção de lipase, com 2,37 U/mL e atividade de esterificação de 0,07 U/mL utilizando meio 3 contendo: KH_2PO_4 1,00 g.L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,123 g.L⁻¹, CuSO_4 0,06 g.L⁻¹. A suplementação deste meio de cultura com fontes de nitrogênio orgânico aumentou a produção de lipase em (461,29%) 3,48 U/mL usando triptona e (419,35%) 3,22 U/mL usando extrato de levedura, todos os resultados foram analisados sempre tendo como referência a atividade inicial do fungo 0.62 U/mL. Entre os óleos vegetais avaliados no trabalho, o óleo de algodão degomado induziu a produção de lipase em (1212,90%), 8,14 U/mL. Um planejamento fatorial Plackett-Burman com 15 experimentos foi conduzido para avaliar a influência de sete fatores na produção de lipases por *F. solani*. Os fatores investigados foram: peptona, triptona, extrato de levedura, cloreto de cálcio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e sulfato de cobre, que foram mantidos em cinco variáveis fixas contendo: óleo de algodão, pH, temperatura, agitação e tempo e como resposta à atividade enzimática. A concentração de triptona, cloreto de cálcio e sulfato de magnésio tiveram um efeito significativo ($p < 0,10$) na produção de lipase e foram estudados consecutivamente através de um DCCR (delineamento central composto rotacional) completo, com o intuito de otimizar a produção das lipases do fungo *F. solani*. Após a otimização utilizando o DCCR, obteveram-se atividades lipolíticas máximas de 24,84 U/mL com o uso de 10 g.L⁻¹ de triptona, 3,50 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio e 0,50 g.L⁻¹ sulfato de magnésio, 1 g.L⁻¹ de fosfato de potássio e 1% de óleo de soja. O modelo estatístico mostrou uma correlação de 85,67% com os dados experimentais. A caracterização bioquímica da lipase mostrou que a enzima tem melhor atuação em pH 7 a uma temperatura de 40°C, onde o modelo estatístico mostrou uma correlação de 94,15% com os dados experimentais. Desta forma as lipases produzidas por *F. solani* tem potencial para aplicação e uso na produção de biodiesel, podendo ser uma alternativa aos processos convencionais na produção de biocombustíveis.

Palavras chave: Lipase, otimização, hidrólise, esterificação, *Fusarium solani*

ABSTRACT

Microbial lipases are very prominent biocatalysts due to their ability to catalyze a wide variety of reactions in aqueous and non-aqueous media. In this work, the selected filamentous fungi were isolated from leaves decomposed in the Buritzal River, located in Taquaruçu in the State of Tocantins and identified with the ITS gene, were screened for lipase production with hydrolytic activity and esterification. *Fusarium solani* showed the highest production of lipase, with 2.37 U/mL and esterification activity of 0.07 U/mL using medium 3 containing: KH₂PO₄ 1.00 gL⁻¹, MgSO₄ H₂O 1.123 gL⁻¹, CuSO₄, 06 gL⁻¹. Supplementation of this culture medium with organic nitrogen sources increased lipase production in (461.29%) 3.48 U/mL using tryptone and (419.35%) 3.22 U/mL using yeast extract, all the results were always analyzed with reference to the initial activity of the fungus 0.62 U/mL. Among the vegetable oils evaluated in the work, degummed cotton oil induced lipase production in (1212.90%), 8.14 U/mL. A Plackett-Burman factorial design with 15 experiments was conducted to evaluate the influence of seven factors on the production of lipases by *F. solani*. The factors investigated were: peptone, tryptone, yeast extract, calcium chloride, potassium phosphate, magnesium sulphate and copper sulphate, which were kept in five fixed variables containing: cotton oil, pH, temperature, agitation and time and as a response to enzymatic activity. The concentration of tryptone, calcium chloride and magnesium sulphate had a significant effect ($p < 0.10$) on lipase production and were studied consecutively through a complete DCCR (rotational composite) design, in order to optimize production of the fungus *F. solani* lipases. After optimization using DCCR, maximal lipolytic activities of 24.84 U/mL were obtained with the use of 10 gL⁻¹ tryptone, 3.50 gL⁻¹ calcium chloride and 0.50 gL⁻¹ magnesium, 1 gL⁻¹ potassium phosphate and 1% soybean oil. The statistical model showed a correlation of 85.67% with the experimental data. The biochemical characterization of lipase showed that the enzyme has a better performance at pH 7 at a temperature of 40 ° C, where the statistical model showed a correlation of 94.15% with the experimental data. In this way the lipases produced by *F. solani* have potential for application and use in the production of biodiesel, and can be an alternative to the conventional processes in the production of biofuels.

Keywords: Lipase, optimization, hydrolysis, esterification, *Fusarium solani*

1 - INTRODUÇÃO

Devido aos graves problemas ambientais que acontecem em decorrência da emissão dos gases de efeito estufa (GEEs), causados em grande parte pela utilização do petróleo e seus derivados, muitos países resolveram voltar-se para a utilização de fontes alternativas de energias limpas e renováveis em substituição aos combustíveis fósseis (FREIRE et al., 2012). Neste sentido, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de desenvolver derivados de óleos vegetais com propriedades e desempenho próximo ou igual ao do diesel de hidrocarbonetos.

Desta forma, o biodiesel aparece como uma fonte bastante promissora, uma vez que sua utilização contribui diretamente para a diminuição dos poluentes na atmosfera, pois o CO₂ (gás carbônico) liberado durante a sua combustão é absorvido no crescimento das plantas.

O biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeias longas (ALBUQUERQUE et al., 2010). Essa mistura é oriunda de uma reação denominada de transesterificação onde, os óleos vegetais e ou gorduras animais são catalisados na presença de uma base, com a adição de um álcool de cadeia curta, normalmente o metanol, produzindo ésteres alquílicos e glicerol.

Para a produção do biodiesel, uma grande variedade de matérias primas pode ser utilizadas como óleos vegetais de soja, girassol, canola, algodão, mamona, pinhão manso, entre outros, gorduras de origem animal como sebos, ou ainda os óleos usados em frituras “soja”.

A reação de transesterificação pode fazer uso de vários catalisadores tais como alcalinos, ácidos, heterogêneos e biocatalisadores mais especificamente enzimas (as lípases) ou também pode fazer uso de alcoóis nos seus estados supercríticos. Dos métodos citados o mais comum ou industrialmente utilizado é o alcalino, um processo com um custo efetivo e bastante eficiente. No entanto, esse processo possui alguns inconvenientes como a separação do catalisador e o álcool colocado em excesso que não participa da reação, o que faz a necessidade de realizar repetidas lavagens para alcançar a pureza adequada ao produto.

A produção de biodiesel usando um biocatalisador supera e muito as vantagens dos outros catalisadores, pois atinge um alto grau de pureza, inexistência de rejeito aquoso alcalino, baixa presença de outros contaminantes, maior seletividade com excelentes rendimentos (BAJAJ, et al., 2010), portanto os processos enzimáticos são promissores como alternativa à rota química. Diante destas vantagens, pesquisas vêm sendo realizadas para selecionar, otimizar e diminuir o elevado custo da produção de enzimas puras.

As lipases microbianas são biocatalisadores muito proeminentes devido à sua capacidade de catalisar uma grande variedade de reações em meios aquosos e não aquosos. O comportamento químico, regio e enantio-específico dessas enzimas tem causado enorme interesse entre cientistas e indústrias (HASAN *et al.*, 2009).

As lípases são as principais enzimas usadas como biocatalisadores na reação de transesterificação enzimática. Podendo as mesmas e seus meios de culturas serem selecionados e otimizados para melhorar o desempenho e uso de tais enzimas.

A presente tese de doutorado foi desenvolvida principalmente no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, (LAMBIO UFT) e no Laboratório de Pesquisas em Química Ambiental e Biocombustíveis (LAPEQ UFT).

O trabalho será apresentado na forma de artigos científicos de acordo com as normas estabelecidas por cada revista ao qual o artigo será submetido. O capítulo I é uma revisão bibliográfica abordando os principais pontos do tema proposto. Nos capítulos II e III são apresentados os resultados, na forma como foram submetidos à publicação nos periódicos. Por fim, as considerações finais, com as principais conclusões obtidas e as perspectivas para trabalhos futuros.

OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral, realizar uma triagem e a seleção de fungos filamentosos produtores de lípases capazes de catalisar reações de transesterificação para a produção de biodiesel.

Os objetivos específicos foram:

- Isolar as linhagens de fungos produtores de lípases e caracterizá-las quanto aos aspectos morfofisiológicos;
- Realizar a identificação das linhagens por meio do gene ITS;
- Selecionar linhagens fúngicas produtoras de lípases com atividade lipolítica;
- Analisar quantitativamente a atividade lipolítica dos fungos isolados, em diferentes condições de cultivo
- Aplicar delineamentos experimentais no processo de otimização da atividade Enzimática;
- Otimizar a produção de lipases fúngicas;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima obtida no processo de otimização.

2 - REVISAO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO I

CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO: TOPICOS ESPECIAIS EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE EM DEZEMBRO DE 2017 PELA EDITORA CVR.

Processo de produção de biodiesel e a catálise enzimática

Danylo Bezerra Mendes
Danyel Bezerra Mendes
Fabiane Fernandes da Silva
Emerson Adriano Guarda

Neste capítulo apresentaremos informações que permitirão ao leitor conhecer as características do processo de produção do biodiesel e diversos fatores que influenciam a reação, bem como conhecer as principais características da catalise enzimática.

1. Introdução

Os graves problemas ambientais surgidos em decorrência da emissão dos gases de efeito estufa devido a utilização de petróleo e seus derivados têm encorajado muitos países investir em pesquisas para a utilização de fontes renováveis de energias limpas em substituição aos combustíveis fósseis (Freire et al., 2012). Os óleos vegetais são uma boa opção como fonte de biocombustíveis, pois são recursos renováveis e tem grande produção anual, porém, para o seu uso nesta finalidade é necessário um processo de modificação química, tornando-o compatível com os motores atuais movidos a diesel (Suarez et al., 2009). Este novo produto é denominado biodiesel e possui muitas propriedades e desempenho próximo ou igual ao diesel fóssil, além de reduzir a emissão de poluentes na atmosfera, pois o CO₂ liberado durante a sua combustão pode ser absorvido durante o crescimento das plantas (Santos 2012).

O biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeias longas (Albuquerque et al. 2010). Essa mistura, é oriunda de uma reação denominada de transesterificação, onde os óleos vegetais e ou gorduras animais, em meio básico, com a adição de um álcool de cadeia curta, normalmente o metanol, produz ésteres alquílicos e glicerol.

Para a produção do biodiesel, uma grande variedade de matérias primas pode ser utilizada: óleos vegetais como: soja, girassol, canola, algodão, mamona, pinhão manso, entre outros, gorduras de origem animal como sebos, ou ainda os óleos usados em frituras (óleos de reuso).

A reação de transesterificação deve ser catalisada e pode fazer uso de vários tipos de catalisadores, como alcalinos, ácidos, heterogêneos e biocatalisadores, mais especificamente enzimas (as lipases) ou também pode fazer uso de alcoóis nos seus estados supercríticos. Dos métodos citados o mais utilizado industrialmente é o alcalino, que em geral, resulta em tempos de reação mais curtos com maior produção de rendimento (Amini et al., 2016). No entanto possui alguns inconvenientes, como a separação do catalisador e o álcool colocado em excesso que não participa da reação, o que torna necessária a necessidade de repetidas lavagens para alcançar a pureza adequada ao produto.

O uso de um biocatalisador na produção de biodiesel supera em muito as vantagens dos outros catalisadores, pois atinge um alto grau de pureza, inexistência de rejeito aquoso alcalino, baixa presença de outros contaminantes, maior seletividade com excelentes rendimentos (Bajaj et al., 2010), portanto os processos enzimáticos são promissores como alternativa à rota química. Diante destas vantagens, pesquisas vêm sendo realizadas para selecionar, otimizar e diminuir o elevado custo da produção de enzimas puras.

As lipases microbianas são biocatalisadores muito proeminentes devido à sua capacidade de atuar em uma grande variedade de reações em meios aquosos e não aquosos. O comportamento quimio, regio e enantio-específico dessas enzimas tem causado enorme interesse entre cientistas e indústrias (Hasan et al., 2009). As lipases são as principais enzimas usadas como biocatalisadores na reação de transesterificação enzimática e desta forma este trabalho tem como objetivo apresentar os principais aspectos relacionados ao processo de produção de biodiesel, bem como as principais características da catálise enzimática.

2. Biodiesel: definições e considerações gerais

No dia 13 de janeiro de 2005, a ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível, pela Lei nº 11.097, definiu biocombustível como sendo “Combustível derivado da biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil”. Na mesma lei definiu-se biodiesel como: “Biocombustível derivado da biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil”.

A última resolução aprovada pela ANP de nº 07 de 13 de março de 2008 define biodiesel – B100 – como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais conforme a especificação contida no Regulamento Técnico nº 1/2008, que é parte integrante da referida Resolução.

De acordo com a definição de Parente (2003), biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e ambientalmente correto, sendo, portanto, um promissor substituto ao óleo diesel mineral, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol, respectivamente.

Segundo (Candeia 2008), biodiesel pode ser definido quimicamente como sendo um combustível alternativo constituído por ésteres alquílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa, oriundos de fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animal e ou residual, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão.

Diante da demanda mundial por combustível como fontes de energia, surgiu a necessidade de gerar alternativas como os biocombustíveis (Amini et al., 2016). Desta forma, surge a crescente preocupação com o meio ambiente despertando a busca por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo. Várias pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos insumos básicos, buscando um caráter renovável para a produção de combustíveis que possam vir a substituir os derivados de petróleo. Desta forma, a biomassa encontra-se em um papel de destaque em razão da sua ampla disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (Suarez et al., 2009).

O uso do biodiesel como combustível tem um importante papel nas políticas governamentais, não só na área social e ambiental, como na econômica, tendo em vista as vantagens que este combustível apresenta na economia do país (Santos et al., 2008). Dessa forma, o uso de biodiesel não é apenas uma alternativa econômica e segura diante dos problemas relacionados ao petróleo, muitas são as vantagens que podem ser destacadas no uso desse biocombustível. Entretanto, vale ressaltar que existem também algumas desvantagens. A literatura disponibiliza por meio de autores como: Parente (2003), Candeia (2008), Gomes (2009) e Aranda (2010), relatam alguns aspectos do biodiesel:

a) Vantagens:

- Ausência de enxofre e compostos aromáticos, o que proporciona uma combustão limpa e sem a formação de SO₂ (dióxido de enxofre), gás que

provoca a chuva ácida e de compostos cancerígenos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos);

- Tem número de cetano elevado (superior a 50) e conseqüentemente alto poder de auto-ignição e combustão. Este fator é refletido de modo especial na partida a frio, no ruído do motor e no gradiente de pressão nos motores a diesel;
- Possui teor médio de oxigênio em torno de 11% e composição química homogênea, favorecendo uma combustão mais completa e eficiente, além de expelir menos resíduos para a atmosfera;
- Possui maior ponto de fulgor quando comparado ao diesel convencional, de modo que, em condições normais de transporte, manuseio e armazenamento não é inflamável, proporcionando uma maior segurança;
- Apresenta expressiva melhora na lubrificação do motor, conferindo maior longevidade do mesmo e seus entornos;
- Podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis;
- É seguro, renovável, não tóxico e biodegradável;
- Possui vantagens sociais e econômicas.

b) Desvantagens:

- O biodiesel possui um menor poder calorífico. Todavia, esta desvantagem é bastante pequena, em torno de 5% em relação ao diesel convencional;
- Cristalização em baixas temperaturas em regiões de clima muito frio, a viscosidade do biodiesel aumenta bastante. Assim como o diesel, podem ocorrer formações de pequenos cristais, que se unem e impedem o bom funcionamento do motor. Porém, existem diversas precauções que podem ser tomadas para contornar este problema, como por exemplo, o uso de aditivo ou de mistura biodiesel/diesel mineral, dentre outros.

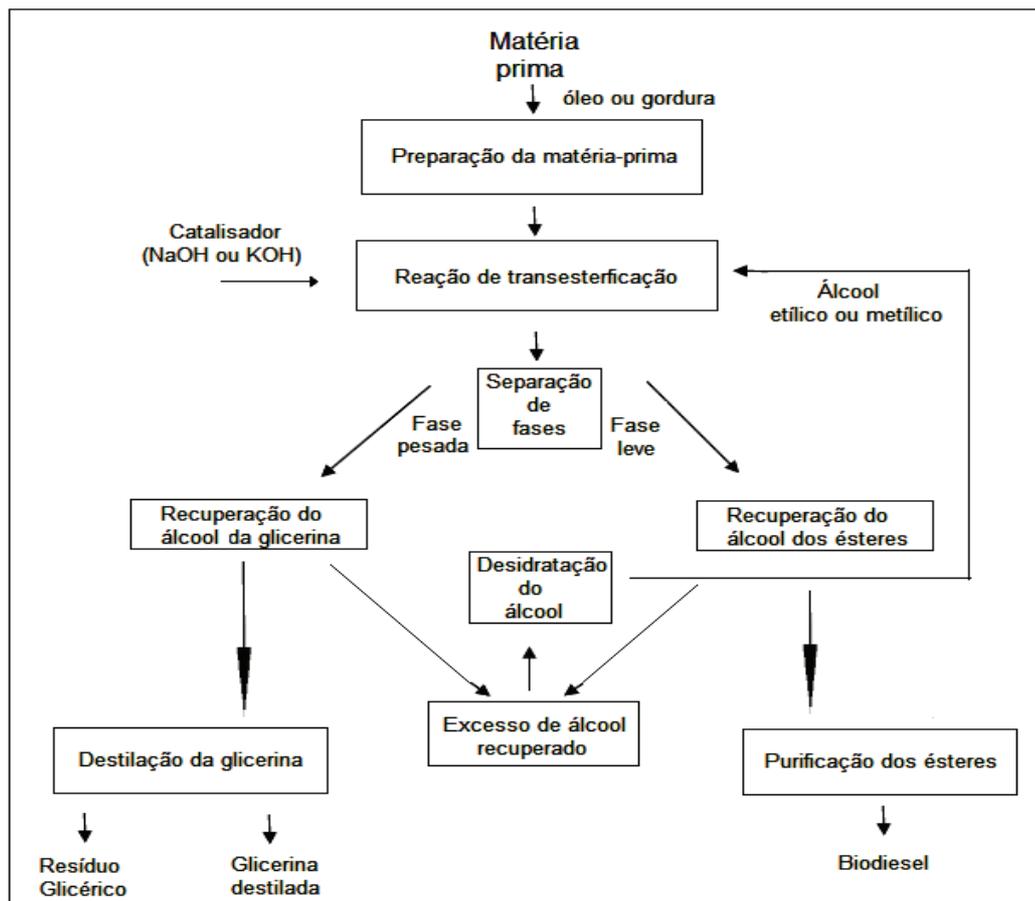
3. Etapas do processo de produção do biodiesel

De acordo com Parente (2003), o processo de produção de biodiesel é constituído de algumas etapas como a preparação da matéria-prima, reação de transesterificação, separação de fases, recuperação do álcool da glicerina,

recuperação do álcool dos ésteres, desidratação do álcool, purificação dos ésteres e destilação da glicerina.

A Figura 1 mostra o processo de produção de biodiesel, partindo de uma matéria-prima graxa qualquer, onde as etapas operacionais são descritas.

Figura 1. Etapas do processo de produção de biodiesel.



Fonte: Adaptado de Parente (2003).

Parente (2003) descreve de forma sumária as etapas do processo de produção de biodiesel:

- **Preparação da matéria prima** – Essa etapa consiste em preparar a matéria graxa para uma maior conversão em ésteres por meio da transesterificação. Para essa transformação ser alcançada, a matéria-prima deve ter essencialmente o mínimo de umidade e sua acidez a menor possível;

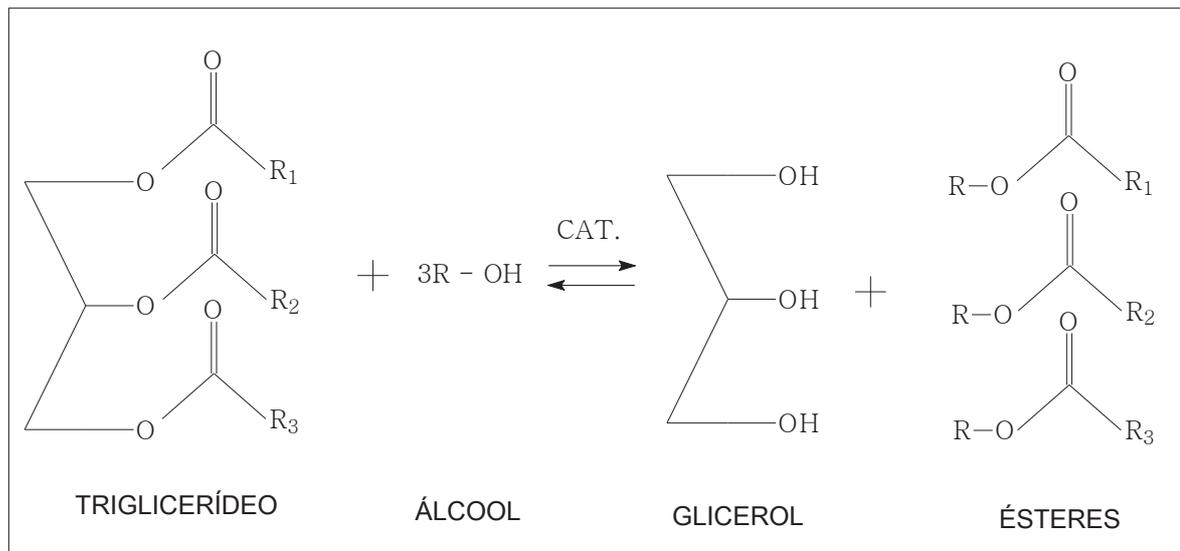
- Reação de transesterificação - Nessa etapa, a matéria prima passa por uma reação química que a converte em ésteres metílicos ou etílicos por meio da transesterificação com o uso de um catalisador;
- Separação de fases – A mistura reacional é composta de duas fases, uma densa e outra leve, que podem ser separadas por decantação ou centrifugação. A fase densa é constituída de glicerina, impurezas e excesso de álcool utilizado na reação. A fase leve é uma mistura de ésteres podendo ser metílicos ou etílicos, dependendo do tipo de álcool utilizado;
- Recuperação do álcool da glicerina – A fase pesada (glicerina) é submetida a uma evaporação para a retirada do excesso de álcool. Este é tratado posteriormente para reutilização no processo de produção;
- Recuperação do álcool dos ésteres – A fase leve (biodiesel) passa basicamente pelo mesmo tratamento como o descrito acima na recuperação do álcool da glicerina;
- Desidratação do álcool – Nessa reação, uma quantidade em excesso de álcool é utilizada para garantir o deslocamento da reação no sentido dos produtos. Esse produto passa por uma destilação onde é retirada boa parte da umidade (água) oriunda da lavagem do biodiesel. Esse processo é fácil de ser conduzido usando calor;
- Purificação dos ésteres – Após várias etapas, o biodiesel passa por uma sequência de lavagens para retirada de vestígios de catalisador e glicerina, seguido de uma desumidificação para se enquadrar nas especificações de comercialização do produto; e
- Destilação da glicerina – A purificação é feita por destilação a vácuo, resultando em um produto límpido e transparente conhecida como “glicerina destilada”.

4. Reação de transesterificação

A principal rota para obtenção de biodiesel no Brasil e no mundo é a transesterificação (ou alcoólise) alcalina, homogênea, de óleos e gorduras. Essa reação ocorre entre óleos ou gorduras que tem em sua composição tri-ésteres da glicerina com ácidos graxos, misturados a metanol ou etanol, com um catalisador

básico (Hidróxido de sódio - NaOH ou Hidróxido de Potássio - KOH), resultando em uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, hoje mais conhecido como biodiesel (Fig 2) (Suarez et al., 2009).

Figura 2. Transesterificação de triacilgliceróis.

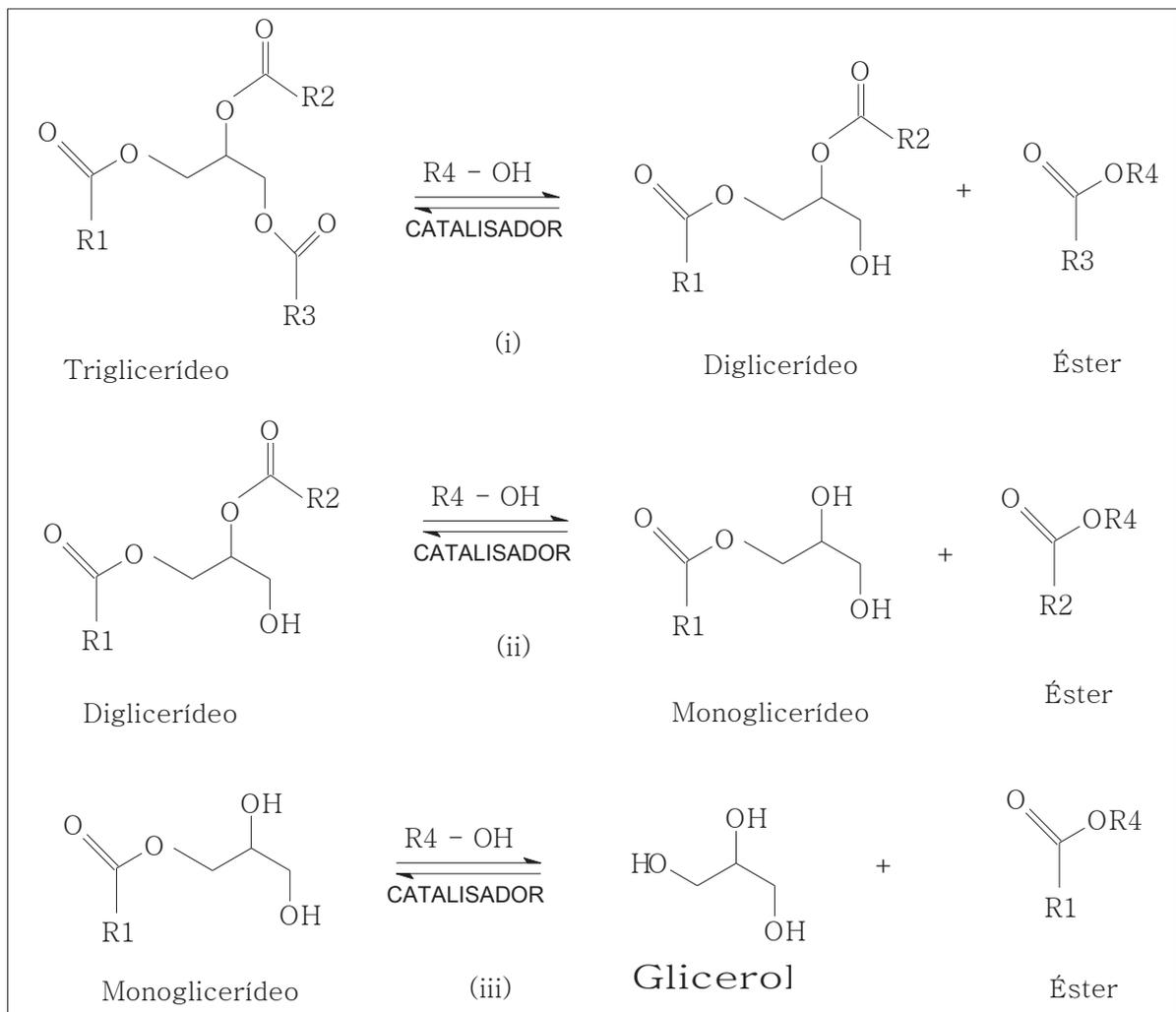


Fonte: Suarez et al. (2009)

Percebe-se pela reação que a mesma é reversível, o que faz necessário o uso de álcool em excesso para deslocar a reação no sentido da obtenção do produto (Lima 2005). Com a reação de transesterificação ocorre a separação da glicerina do óleo vegetal e cerca de 20% da massa molecular do óleo vegetal é devida a glicerina. A glicerina torna o óleo mais denso e viscoso, e durante o processo de transesterificação é removida do óleo vegetal, deixando-o menos denso reduzindo a viscosidade (Melo 2009).

A figura 3 (i, ii e iii) ilustra as reações químicas envolvidas para a transesterificação de triglicerídeos e obtenção dos ésteres. Suarez & Meneghetti (2007) reafirma a reversibilidade das reações i, ii e iii o que exige realmente um excesso de álcool no meio reacional para promover um aumento no rendimento em mono-álcoois.

Figura 3. Reações químicas na transesterificação de triglicerídeos.



Fonte: Suarez & Meneghetti (2007)

Três tipos de catalisadores podem ser usados para acelerar a reação de transesterificação: os catalisadores ácidos, básicos e enzimáticos. Por razões econômicas e pela grande disponibilidade, o hidróxido de sódio (NaOH) é o mais utilizado, sendo este mais rápido que os catalisadores ácidos (Lima 2005).

O metanol tem sido o álcool mais utilizado nas reações de transesterificação, devido a sua natureza física e química (cadeia curta e polaridade). No entanto, a utilização do etanol pode ser uma alternativa, considerando o ponto de vista ambiental e por este ser um produto menos tóxico e oriundo da cana de açúcar que é uma fonte renovável (Lima 2005).

5. Fatores que influenciam a reação de transesterificação

A transesterificação utilizando a catálise básica requer que os insumos possuam certo grau de pureza para que a reação não tenha a formação de produtos indesejados. O mínimo de umidade (água), fosfatídeos e ácidos graxos livres são essenciais para minimizar a formação de sabão (Suarez et al., 2009). Nos processos que usam óleo “in natura”, adiciona-se álcali em excesso para remover todos os ácidos graxos livres e este tratamento é conhecido como neutralização (Lima 2005).

Existe um reconhecimento na literatura científica que a catálise básica possui problemas operacionais quando o óleo vegetal apresenta altos teores de ácido graxo livre, que são formadores de sabão, além de consumir parte do catalisador durante a sua formação, dificultando assim, a separação dos produtos (ésteres e glicerina) no final do processo (Suarez & Meneghetti 2007).

Chialastri et al. (2011) realizando um estudo sobre fatores de influência no rendimento da reação de transesterificação etílica, relatou que a temperatura, agitação, tempo de reação, razão molar e tipo de catalisador são também variáveis significativas quanto ao rendimento final da reação.

Para Demirbas (2008) em estudo sobre fatores de influência no rendimento da reação de transesterificação metílica, o mesmo apresenta algumas variáveis significativas como a razão molar de álcool para óleo vegetal e a temperatura e esses são fatores primordiais que afetam quanto ao rendimento final da reação.

De acordo com Saad (2005), outra desvantagem atrelada à rota da transesterificação é a formação de água no meio reacional, decorrente da pré-solubilização dos hidróxidos no álcool para a produção do alcóxido correspondente, que atua como o verdadeiro catalisador na reação.

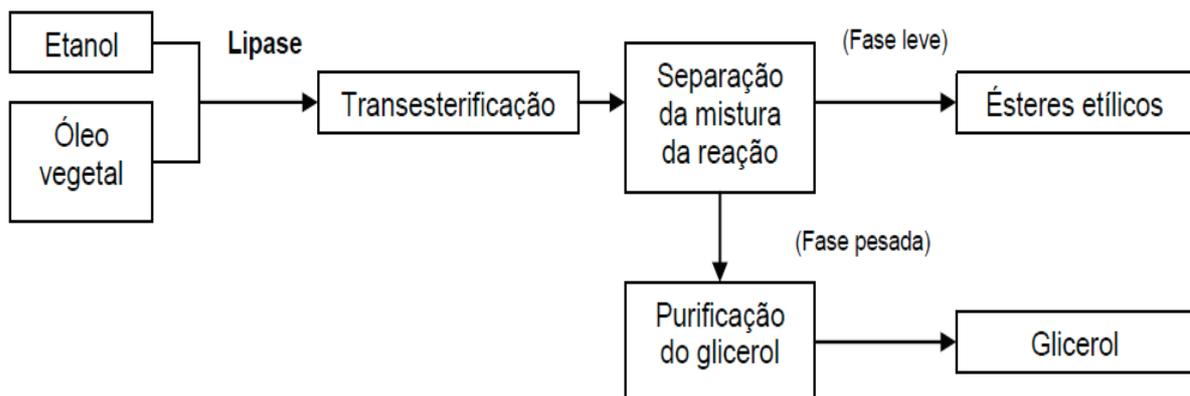
6. Transesterificação enzimática

A transesterificação enzimática consiste na modificação lipídica realizada pelas lipases e tem vantagem de permitir maior controle sobre a distribuição

posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases (Andrade 2012).

Na reação de transesterificação enzimática, ocorrem algumas etapas como a fase contendo o glicerol, denominada de pesada, que pode ser simplesmente separada da fase com o biodiesel, denominada de leve, sendo que após a separação não há necessidade de desodorização nem neutralização do produto final, reduzindo assim o tempo de reação. Igualmente como ocorre no processo de transesterificação por catalise básica, o excesso de álcool utilizado, tende a deslocar a reação no sentido da formação do produto e desta forma, elevar o rendimento de biodiesel e o biocatalizador pode ser utilizado por várias vezes. A Figura 4 abaixo ilustra o processo enzimático da produção de biodiesel.

Figura 4. Processo enzimático da produção de biodiesel.



Fonte: Andrade (2012).

7. Lipases

As lipases constituem o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas (Ahmed 2009). Lipases (triacilglicerol acil-hidrolase, E.C.3.1.1.3) são enzimas ubíquas produzidas pela maioria dos sistemas biológicos incluindo animais, plantas e micro-organismos (Mohanasrinivasan et al., 2009).

O interesse industrial por lipases vem aumentando gradativamente, especialmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (Roveda et al., 2010). Elas

catalisam a esterificação, interesterificação (acidólise, alcoólise, aminólise e transesterificação), além da atividade hidrolítica dos triglicerídeos (Hasan et al., 2009).

As lipases são amplamente utilizadas no processamento de gorduras e óleos, detergentes e formulações de desengorduramento, processamento de alimentos, síntese de produtos químicos finos e produtos farmacêuticos, fabricação de papel e produção de cosméticos (Sharma et al., 2001).

De acordo com Paques et al. (2006) as lipases são enzimas com certa especificidade e podem ser classificadas ou dítidas de acordo a sua ação da seguinte forma:

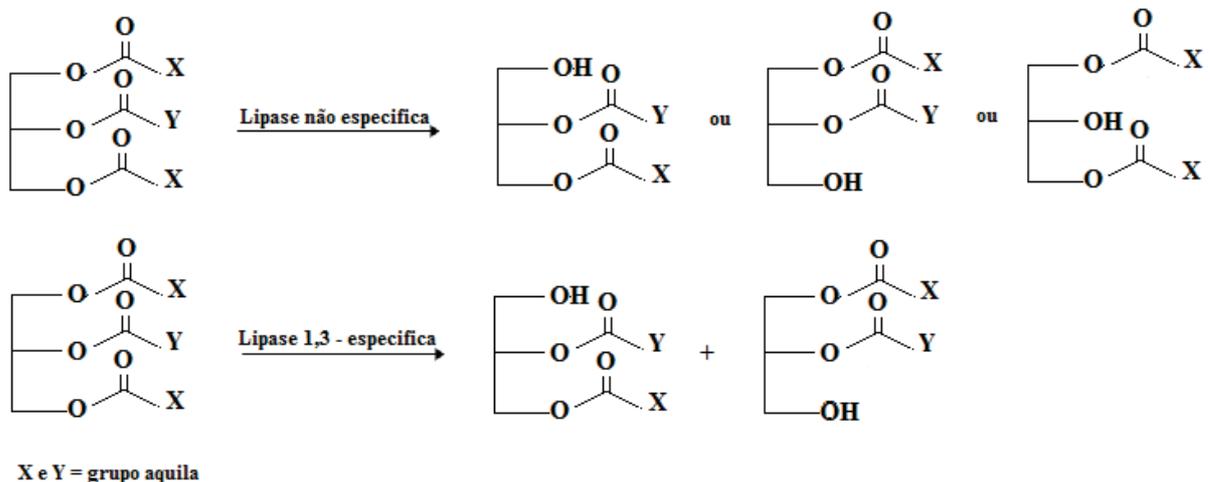
1. Regiosseletivas - subdivididas em:

- I. lipases não-específicas - hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2;
- II. lipases 1, 3 - específicas - hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3 (Figura 5).

2. Tipo-seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ ou ao número de insaturação do grupo acila.

3. Enantiosseletivas.

Figura 5. Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1, 3 específica.



Das inúmeras fontes de obtenção de lipases, as de origem microbiana são as mais utilizadas industrialmente, pois apresentam procedimentos mais simples de isolamento, são mais estáveis e com propriedades mais diversificadas que as lipases de outras fontes (Macedo et al., 2009). Por serem biocatalisadores bastante eficazes devido à elevada atividade específica do substrato, elas possuem um baixo impacto no ambiente (Franken et al., 2010). As lipases podem ser produzidas em cultivo submerso e em estado sólido por meio de micro-organismos tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Almeida et al., 2016).

As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas (Roveda et al., 2010).

Muitos trabalhos têm sido realizados na transesterificação catalisada por lipase de triglicerídeos. Pesquisadores de todo o mundo vêm tentando superar as limitações de uma produção de biodiesel catalisada por enzimas, tentando reduzir o alto custo da enzima, o baixo rendimento, o alto tempo de reação, a necessidade de solventes orgânicos e a necessidade de água na mistura de reação (Bajaj et al., 2010).

8. Fontes produtoras de lipases

As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os micro-organismos, embora estas sejam produzidas também por eucariotos superiores (plantas e animais) (Messias et al., 2011).

Os fungos filamentosos são popularmente conhecidos como bolores e encontram-se amplamente disseminados na natureza, sendo frequentemente observados em pães, queijos velhos e frutas deterioradas. Cada filamento desses micro-organismos cresce principalmente em sua extremidade, a partir da extensão da célula terminal (Almeida 2007). Tanto micro-organismos eucariotos (leveduras e fungos) como procariotos (bactérias, incluindo-se os actinomicetos), são produtores de lipases e suas propriedades variam de acordo com a procedência (Messias et al., 2011).

As enzimas produzidas por fermentação microbiana são em sua maioria extracelulares (Gutarra et al., 2009) e este fato facilita os processos de extração e purificação. Desta forma, conferindo maior estabilidade à enzima que conseqüentemente permite o fácil controle das condições de cultivo que pode ser realizada em escala industrial (Mendes 2009). A fermentação de estado sólido (SSF) é uma alternativa interessante para a produção de enzimas microbianas devido à possibilidade de usar resíduos agropecuários e subprodutos como fontes de nutrientes e suporte ao desenvolvimento de micro-organismos (Rigo et al., 2010).

As lipases extracelulares são secretadas em quantidades significativas por algumas espécies de fungos filamentosos quando são cultivados em condições apropriadas, sendo facilmente separadas da massa micelial por filtração ou centrifugação (Colen 2006). A otimização da condição de cultivo para a produção de lipases microbianas é de suma importância, uma vez que os parâmetros influenciam as propriedades do micro-organismo produtor, assim como a razão de lipases extracelulares e intracelulares (Andrade 2012).

Os fungos filamentosos principalmente aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Thermomyces* são reconhecidos como os melhores agentes microbianos produtores de lipases (Cardenas et al., 2001).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 KDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas que podem variar de ambiente a 70°C (Mendes 2009).

Abaixo segue a Tabela 1 com micro-organismos produtores de lipases relatados na literatura:

Tabela 1. Micro-organismos produtores de lipases relatados na literatura

Fonte	Micro-organismos	Referências
Arqueobactérias	<i>Natronococcus</i> sp.	Boutaiba et al., 2006
Bactérias	<i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7	Kambourova et al., 2003

(Gram-positivas)	<i>B. megaterium</i>	Lima et al., 2004
	<i>Burkholderia glumae</i>	Khattabi et al., 2003
	<i>B. cepacia</i>	Fernandes et al., 2007
	<i>Ralstonia</i> sp.	Yoo et al., 2011
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Shah & Wilson 1965
	<i>S. epidermidis</i>	Simons et al., 1998
	<i>S. xylosus</i>	Mosbah et al., 2007
Bactérias	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Jaeger & Reetz 1998
(Gram-negativas)	<i>Photobacterium lipolyticum</i>	Yang, Sohn & Kim 2009
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Jaeger et al., 1997
	<i>P. mendocina</i>	Jaeger & Reetz 1998
	<i>P. fluorescens</i> HU380	Kojima & Shimizu 2003
	<i>Serratia marcescens</i>	Jaeger et al., 1997
Actinomicetos	<i>Streptomyces cinnamomeus</i> Tü89	Sommer, Bormann & Götz 1997
	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Côté & Shareck 2008
Fungos	<i>Candida rugosa</i>	Dalmau et al., 2000
Leveduriformes	<i>C. cylindracea</i>	Brozzoli et al., 2009
	<i>Torulopsis ernobii</i>	Yoshida, Motai & Ichishima 1968
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Costas, Deive & Longo 2004
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Domínguez et al., 2003
Fungos	<i>Antrodia cinnamomea</i>	Lin, Wang & Sung, 2007
Filamentosos	<i>Alternaria</i> sp.	Tom & Crisan 1975
	<i>Aspergillus carneus</i>	Saxena et al., 2003
	<i>A. terreus</i>	Gulati et al., 1999
	<i>A. Níger</i>	Edwinoliver et al., 2010

<i>A. oryzae</i>	Toida et al. 2000
<i>Beauveria bassiana</i>	Hegedus & Khachatourians 1988
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Messias et al., 2009
<i>B. ribi</i>	Messias et al., 2009
<i>Botrytis cinérea</i>	Comménil et al., 1999
<i>Cunninghamella verticillata</i>	Gopinath et al., 2002
<i>Geotrichum</i> sp.	Burket et al., 2004
<i>Fusarium globulosum</i>	Gulati et al., 2005
<i>F. oxysporum</i>	Prazeres, Cruz & Pastore 2006
<i>Mucor circinelloides</i>	Szczesna-Antczak et al., 2006

<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lima et al., 2003
<i>P. citrinum</i>	Miranda et al., 1999
<i>P. restrictum</i>	Cammarota & Freire 2006
<i>P. simplicissimum</i>	Gutarra et al., 2007
<i>P. verrucosum</i>	Kempka et al., 2008
<i>Rhizomucor miehei</i>	Jaeger & Reetz 1998
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Li, Wang & Tan 2006
<i>R. chinensis</i>	Sun & Xu 2009
<i>R. delemar</i>	Açikel, Erşan & Açikel 2010
<i>R. homothallicus</i>	Diaz et al., 2006
<i>R. oryzae</i>	Essamri, Deyris & Comeau 1998
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Fernandes et al., 2004
<i>Trichoderma viride</i>	Kashmiri, Adnan & Butt 2006

Adaptado de (Messias et al., 2011).

9. Estrutura e mecanismo de atuação das lipases

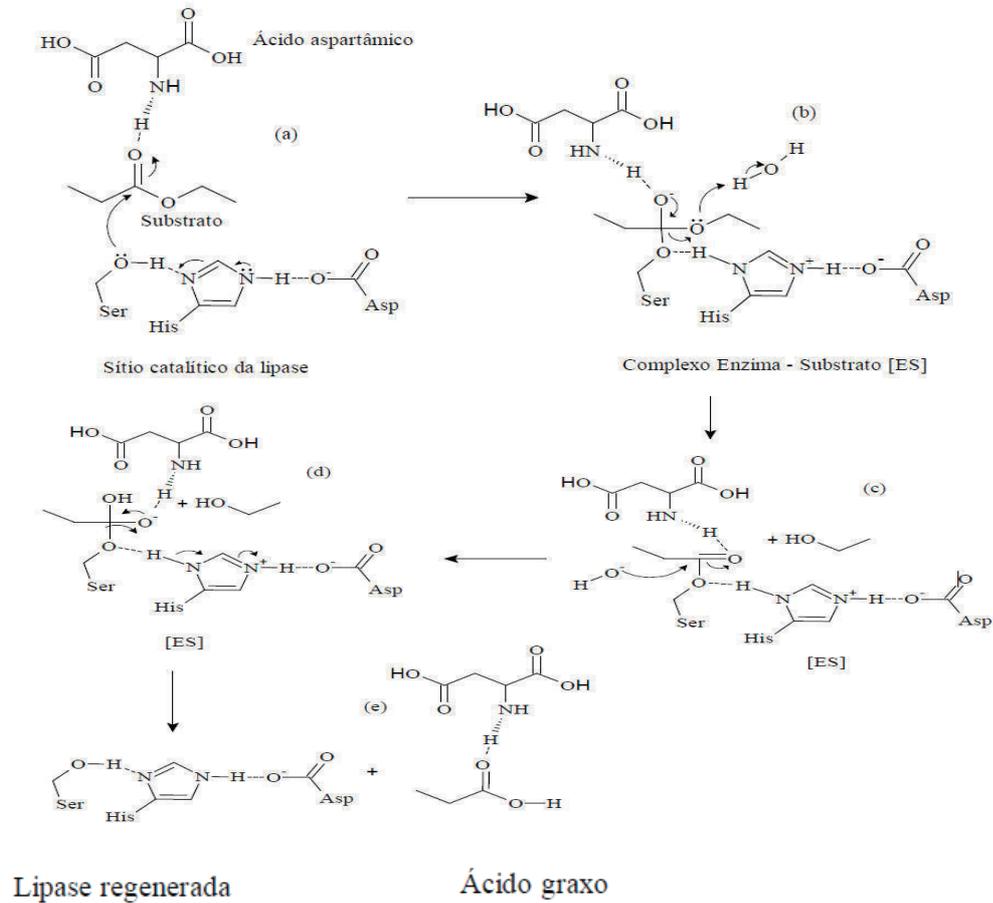
As lipases são enzimas que apresentam um mecanismo peculiar de atuação, chamado de ativação interfacial (Rodrigues 2009), que difere do clássico Michaelis-Menten. A ativação interfacial é explicada pela estrutura tridimensional e o sítio ativo da enzima. O sítio ativo da lipase é caracterizado pela tríade composta de serina, histidina e ácido glutâmico, também complexos acil-enzima. Em meios aquosos e na ausência de solventes orgânicos e interface, os sítios ativos das lipases apresentam uma conformação fechada e possuem baixa atividade. Por outro lado, no meio reacional, acessível ao substrato, o sítio ativo está aberto expondo a sua zona hidrofóbica e interage com a interface lipídica (Jaeger & Reetz 1998, Rodrigues 2009, Salvador et al., 2009).

Nas reações enzimáticas, necessariamente deve ocorrer a formação de um intermediário, denominado complexo enzima-substrato para que ocorra a reação, que acontece no sítio ativo das lipases que é coberto por uma cadeia peptídica denominada “tampa”, de característica hidrofóbica (Carvalho 2014). Quando a tampa encontra a interface água-lipídeo, ocorre interação no sistema e a tampa sofre uma alteração conformacional e o sítio ativo da enzima fica exposto, permitindo a catálise (Messias et al., 2011).

A estrutura química e as características cinéticas das lipases microbianas variam dependendo do micro-organismo, gênero, espécie e também da cepa (Messias et al., 2011).

Na Figura 6 está representado o mecanismo de hidrólise enzimática, onde a reação envolve a formação de dois intermediários tetraédricos. O mecanismo de ação de lipases se inicia com um ataque do átomo de oxigênio do grupo –OH do resíduo de Ser nucleofílico ao carbono carbonílico ativado do éster lipídico, que está ligado ao sítio ativo da enzima (Almeida 2012). Este é estabilizado pelos resíduos catalíticos de histidina e ácido aspartâmico e ocorre um rearranjo e uma molécula de álcool é liberada, após ocorre o segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila referente à água. Por fim, há um rearranjo na molécula e o ácido graxo é liberado e em seguida a enzima é regenerada (Jaeger & Reetz 1998).

Figura 6. Mecanismo de catálise enzimática por lipases



Fonte: Adaptado de (Jaeger & Reetz 1998).

10. Fatores que influenciam a produção de lipases fúngicas

Diversos fatores são de extrema importância para a produção de lipases por micro-organismos como as fontes de carbono, fontes de nitrogênio, pH inicial, meio mineral, inóculo, agitação/aeração e temperatura são fatores que geram estratégias, que podem ser empregadas para aumentar a eficiência na produção de lipases microbianas e estes influenciam de forma significativa na produção de lipases (Kumar et al. 2011).

Sharma et al., (2001), Colla et al., (2012) e Kumar et al., (2011) descrevem em seus trabalhos a importância dos fatores para a produção de enzimas lipolíticas, e estes são de forma sucinta apresentados abaixo.

- Efeito das fontes de carbono: É o fator mais importante para a expressão dessas enzimas. As fontes de carbono atuam tanto como fonte de energia e também meio indutor;
- Efeito das fontes de nitrogênio: apresentam importante função na síntese de enzimas, sendo utilizadas pelas células para síntese de muitos fatores de crescimento celular e aminoácidos necessários para o metabolismo celular e síntese de enzimas;
- Efeito do meio mineral: a suplementação dos meios de cultivo com uma solução de minerais ocasionou um aumento de três vezes na atividade enzimática dos meios contendo os óleos de gergelim e oliva, e de quatro vezes no meio contendo óleo de milho. Os elementos traços são geralmente componentes estruturais das enzimas e estes podem influenciar positivamente a produção de lipases;
- Efeito da temperatura: as temperaturas na faixa de 26,5°C a 32°C foram utilizadas em inúmeros trabalhos de pesquisa de produção de lipases, sendo 30°C a temperatura utilizada com maior frequência;
- Efeito da agitação/aeração: na produção de lipases via bioprocessos submerso, a implementação da transferência de oxigênio através de agitação e inserção de ar é um importante fator para a produção de lipases por micro-organismos, em especial fungos filamentosos;
- Efeito do pH: o pH desempenha um papel muito importante na produção de enzimas, bem como na sua estabilidade. O efeito do pH na produção de enzimas foi estudado e observou-se que o rendimento ótimo para lipases foi alcançado a pH 7.

Há dois métodos de se avaliar a influência desses parâmetros sobre a resposta: o método “um fator por vez”(one-factor-at-time - OFAT) analisa um parâmetro por vez, enquanto os outros estão fixos e o método “planejamento experimental” (*design of experiments - DOE*), em que se analisam todos os parâmetros de uma só vez (Videira 2014).

O uso de ferramentas como o planejamento experimental para otimizar condições de cultivo e produção é bastante utilizado, uma vez que esses programas possibilitam a análise de muitas interações entre os parâmetros utilizados com um número reduzido de experimentos, o que leva a uma avaliação e compreensão das

interações entre os diferentes parâmetros do processo, gerando assim economia de tempo e reagentes (Chennupati et al., 2009).

11. Aplicações biotecnológicas das lipases

As lipases microbianas apresentam uma grande versatilidade, podendo as mesmas promover um grande número de reações em temperatura ambiente, moderada e ou em pressões moderadas. O uso dessas enzimas em aplicações biotecnológicas como reações de hidrólises, bioconversões e sínteses, aumentou significativamente nos últimos anos (Almeida 2012).

As muitas aplicações de lipases incluem sínteses orgânicas de especialidade, hidrólise de gorduras e óleos, modificação de gorduras, melhoramento de sabor no processamento de alimentos, resolução de misturas racêmicas e análises químicas (Sharma et al., 2001).

Sob certas condições, elas também catalisam reações de esterificações, tiotransesterificações em solventes orgânicos, sistemas bifásicos e em suspensões micelares (Babicz 2009). O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (Babicz 2009).

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. Além de quebrar as ligações de 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 (síntese de éster) (Castro et al., 2004).

A atividade hidrolítica da lipase pode ser diretamente relacionada com sua atividade de síntese, mas é independente de sua atividade de interesterificação. Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (Castro et al., 2004).

As reações de esterificação catalisadas por lipase receberam grande importância devido a numerosos produtos que podem ser obtidos (Kiran et al.,

2000). Neste contexto, um conhecimento das atividades de esterificação de lipases de diferentes fontes, bem como preparações de lipase obtidas através de diferentes procedimentos, como a imobilização, são essenciais para explorar um grande número de reações de esterificação até então ainda não estudadas (Kiran et al., 2000).

Para a reação de esterificação é possível produzir lipases com a fermentação em estado sólido (SSF), pois, neste processo o fermentado produzido pode ser usado diretamente para catalisar as reações de esterificação e transesterificação (Rigo et al. 2010).

No caso da produção de lipases por fermentação em estado sólido, as principais vantagens, envolvem a possibilidade de usar o catalisador em processos biossintéticos sem qualquer extração e imobilização antes da sua utilização, uma vez que as enzimas produzidas desta forma consistem em um biocatalisador barato e naturalmente imobilizado, que pode ser aplicado para diversos processos, inclusive para a esterificação (Rigo et al., 2010).

Embora a síntese de éster possa ser feita quimicamente com catálise ácida ou básica, o uso da tecnologia enzimática oferece as vantagens de condições suaves, reações laterais reduzidas e com maior especificidade (Villeneuve et al., 2000).

A Figura 7 abaixo apresenta as diferentes reações catalisadas por lipase em soluções aquosas e não aquosas.

Figura 7. Diferentes reações catalisadas por lípase em soluções aquosas e não aquosas.

REAÇÃO DE HIDRÓLISE

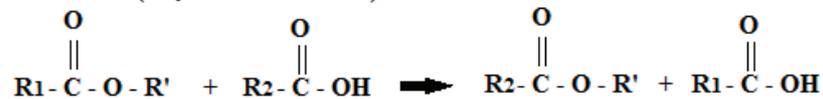


REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO



REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO

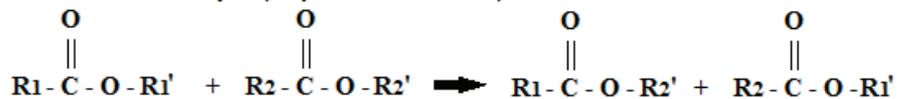
ACIDOLISE (reação de éster com ácido)



ALCOÓLISE (reação de éster com álcool)



TRANSESTERIFICAÇÃO (reação de éster com éster)



O potencial de exploração comercial de uma lípase microbiana é determinado pelo seu rendimento, atividade, estabilidade dentre outras características (Shu et al., 2010). Para a exploração comercial de uma lípase microbiana, as características de alto rendimento e alta atividade significam que o produto lípase tem maior competitividade no mercado (Li & Zong 2010). Já a alta estabilidade do produto da lípase, ajudará a expandir seu campo de aplicação, a prolongar sua meia-vida da prateleira e prolongar seus ciclos de uso (Shu et al., 2010).

A Tabela 2 a seguir apresenta uma lista com as fontes e origens de lipases comerciais.

TABELA 2. Fontes e origens de lípase comerciais

Fonte biológica	Fornecedor
<i>Achromobacter</i> sp.	Meito Sangyo
<i>Aspergillus niger</i>	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Fluka, Novozymes, Röhm
<i>Aspergillus</i> sp.	Novozymes
<i>Candida antarctica A</i>	Boehringer, Fluka, Novozymes
<i>Candida antarctica B</i>	Fluka, Novozymes, Boehringer
<i>Candida cylindracea</i>	Meito
<i>Candida rugosa</i>	Aldrich, Altus, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Meito Sangyo, Sigma, Roche
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Asahi
<i>Geotrichum candidum</i>	Amano, Biocatalysts
<i>Mucor javanicus</i>	Amano
<i>Mucor miehei</i>	Amano, Boehringer, Biocatalysts, Fluka, Novozymes
<i>Penicillium roqueforti</i>	Amano, Biocatalysts, Fluka
<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano, Boehringer, Fluka, Mitsubishi, Röhm, Sigma
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Sigma
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano, Sigma
Germe de trigo	Fluka, Sigma
Pâncreas de suíno	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Röhm, Sigma

Fonte: Adaptado de (Paques et al., 2006).

As principais aplicações industriais descritas na literatura sobre o uso de lipases são nas indústrias de alimentos, detergentes, farmacêuticas, cosméticos, química, petroquímica, bebidas. (Rondhane et al., 2010); (Bussamara et al., 2010); (Li & Zong 2010) e (Contesini et al., 2010).

A Tabela 3 a seguir apresenta uma relação de indústrias e aplicações possíveis para as lipases.

Tabela 3. Aplicação biotecnológica de lipases

Indústria	Ação	Produto ou aplicação
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite	Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite
Panificação	Aumento do aroma	Prolongar a vida de prateleira
Cervejaria	Aceleração da fermentação em função dos lipídios	Melhorar a qualidade das bebidas
Carnes e peixes	Desenvolvimento do aroma	Remoção do excesso de gordura
Farmacêutica	Digestão de óleos e gorduras em alimentos	Lipídios específicos e digestivos
Médica	Determinação de triglicerídeos no sangue	Realização de exames clínicos
Papel	Tratamento de polpas de celulose	Melhoria da qualidade do papel
Tratamento de resíduos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Resíduos isentos de gorduras
Produção de biocombustíveis	Modificação lipídica e remoção do glicerol	Produção de biocombustíveis
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de óleos
Couro	Hidrólise	Produtos de couro
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, umidificantes

Fonte: Adaptado de (Andrade 2012) e (Colla et al., 2012)

12. Lipases na produção de biodiesel

Nos últimos anos, a transesterificação catalisada por lipase tornou-se uma alternativa efetiva à catálise básica e ácida para a produção de biodiesel. A transesterificação baseada em enzimas usa menos energia que os processos quimicamente catalisados. Além disso, ao contrário da catálise básica, pode ser usado com substratos que contenham ácidos graxos livres (Canet et al., 2016).

As aplicações industriais das lipases estão contribuindo para um contínuo aumento do mercado mundial de enzimas, uma vez que as lipases estão entre as enzimas mais utilizadas em processos industriais (Almeida 2012).

A produção de biodiesel catalisada por lipases microbianas é uma excelente alternativa na tentativa de substituir as vias químicas de síntese e reduzir os custos de produção do biodiesel e das enzimas (Ramos et al., 2011). O uso de lipases para produção de biodiesel é de relevante importância, considerando-se o crescimento da utilização desse biocombustível em âmbito mundial, não somente pelo aspecto de meio ambiente, mas, principalmente, por se tratar de uma fonte de energia renovável (Castro et al., 2004).

O custo da enzima é o principal obstáculo a ser superado pelas indústrias de produção. Desta forma, o que se busca é o desenvolvimento de produtos e processos de biodiesel, para alcançar alta pureza com um processo econômico e favorável ao meio ambiente em condições moderadas de reação (Jegannathan et al., 2008).

O processo de produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizado por via química, mas a rota enzimática tem despertado grande interesse na comunidade científica (Tan et al., 2010). Um aspecto comum a estes processos é a busca pela otimização das condições de reação, de modo a lhes conferir características que os tornem viáveis e disponíveis para aplicações industriais (Bajaj et al., 2010). Entretanto, dentre algumas desvantagens essencialmente econômicas, o processo enzimático, uma vez otimizado, poderá apresentar vantagens muito interessantes em relação ao processo químico, tais como a facilidade de separação do catalisador a obtenção de produtos mais puros por permitir o uso de etanol hidratado na reação (Colla et al., 2012).

Embora os processos de transesterificação enzimática para obtenção de biodiesel ainda não sejam comercialmente desenvolvidos, novos resultados têm sido reportados em artigos e patentes. O aspecto comum desses estudos consiste na otimização das condições de reação como solvente, temperatura, pH, tipo de micro-organismo que gera a enzima, etc. a fim de estabelecer as características para aplicações industriais. Contudo, tanto o rendimento como o tempo de reação ainda são desfavoráveis se comparados com o sistema de reação por catálise básica (Nascimento et al., 2001).

Bajaj et al., (2010), relatou em seu trabalho que foram investigadas lipases de diferentes fontes para determinação de sua atividade de transesterificação em diferentes óleos. As características investigadas nas lipases foram sua capacidade de utilizar todos os mono, di e triglicerídeos, bem como os ácidos graxos livres na transesterificação, baixa inibição do produto, alta atividade e rendimento, menor tempo de reação, reutilização da enzima imobilizada, temperatura e resistência ao álcool.

A Tabela 4 a seguir apresenta as principais vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático para a produção de biodiesel.

Tabela 4. Principais vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático para a produção de biodiesel

Processos	Vantagens	Desvantagens
Químico	Simplicidade	Dificuldade de separação do catalisador
	Alto rendimento	Impossibilidade de reutilização do catalisador
	Curto tempo de reação	Dificuldade de utilização de etanol hidratado
Enzimático	Facilidade de separação do catalisador (suporte);	Obtenção de produtos com menor grau de pureza
	Obtenção de produtos com maior grau de pureza;	Longo tempo de reação
	Possibilidade de reutilizar o catalisador (enzima) na reação;	Elevado custo da enzimas
	Possibilidade de utilizar etanol hidratado na reação;	Rendimentos inferiores ao processo químico

Fonte: Adaptado de (Nascimento et al. 2001)

13. Considerações finais

O processo de produção de biodiesel no país já se encontra bem consolidado, uma vez que a produção atende à demanda de uso deste biocombustível e também consegue atingir todos os seus parâmetros de qualidade. A reação de transesterificação ainda é o método mais utilizado para a produção de biodiesel em grande escala, o que é economicamente e industrialmente viável quando comparado a outros processos de produção. O único inconveniente neste

processo é o uso do metanol na cadeia produtiva, pois sabemos que o mesmo é oriundo de fontes não renováveis fazendo com que o biodiesel perca seu caráter de biocombustível biodegradável.

O uso de catalisadores biológicos (enzimas) cresceu bastante, mas ainda existe o inconveniente de ser um processo de produção com um custo elevado, o que torna o uso deste processo ainda distante da realidade de nosso país. Mas é neste sentido que pesquisas vem sendo desenvolvidas para superar o obstáculo do custo das enzimas e o desenvolvimento de produtos e processos de produção de biodiesel, para alcançar alta pureza com uma viabilidade econômica favorável a indústria e ao meio ambiente.

Referências

ALBUQUERQUE, Mariana Helena de O. et al. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel metílico de girassol com adição diferentes concentrações de BHT pelo método Rancimat e PDSC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4 & SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1, 2010, João Pessoa. Inclusão Social e Energia: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2010. p.18-23. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/855086/1/BID28.pdf>>. Acesso em: 06 de jan de 2017.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução nº 07 de 19 de março de 2008 -. Disponível em: <www.anp.gov.br>. Acesso 5 jan. 2017.

ARANDA, Donato Alexandre Gomes et al. Vantagens e desvantagens das rotas de produção de biodiesel para o Brasil. Cadernos de Estudos Estratégicos. Centro de Estudos Estratégicos da Escola Superior de Guerra (Brasil) - N. 09 (jul. 2010) – Rio de Janeiro: CEE - ESG, 2010 - p.v.; 21cm. Anual 246 p.

ADHAM, N. Z. & AHMED, E. M.; Extracellular lipase of aspergillus niger nrrl3 ; production , partial purifi cation and properties. 2009. n. March.

ALMEIDA, A. F. de. et al. Agroindustrial wastes as alternative for lipase production by candida viswanathii under solid-state cultivation : purification , biochemical properties , and its potential for poultry fat hydrolysis. 2016. v. 2016.

ALMEIDA, A. F. De. Cultivo de mucor circinelloides em substratos líquido e sólido para produção de ácidos graxos insaturados. 2007. v. **Dissertação de Mestrado**.

ALMEIDA, A. F. DE. Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de. **Tese de doutorado**, 2012.

AMINIA Z.; IILHAMB, Z.; ONG, H.; MAZAHERI, C. H.; CHEN, W. H. State of the art and prospective of lipase-catalyzed tran sesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management** Volume 141,1 June 2017, Pages 339-353. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.049>

ANDRADE, G. S. S. Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais usando células íntegras imobilizadas de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica. **Tese de doutorado**, 2012.

BABICZ, I. Produção de diacilglicerois via hidrólise enzimática do óleo de palma. **Dissertação de mestrado, escola de química, ufrj**, 2009. p. 95 f.: il.

BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. **Journal of molecular catalysis b: enzymatic**, 2010. v. 62, n. 1, p. 9–14.

CANDEIA, R. A. Biodiesel de soja: síntese, degradação e misturas binárias. 2008. p. 150.

CARDENAS, F. et al. Novel microbial lipases : catalytic activity in reactions in organic media. 2001. v. 28, p. 145–154.

CARVALHO, P. de O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D'A.; OLIVEIRA, J. G. de.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. da. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 1, 75-80, 2003.

CARVALHO, K. M. G. De. Hidrólise enzimática do óleo de amêndoas de tucumã na síntese de biodiesel etílico via processo hidrólise-esterificação. **Dissertação de mestrado**, 2014. p. 130f.

CASTRO, H. F. De et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quim. nova**, 2004. v. 27, n. 1, p. 146–156.

CANET, A.; RAGEL, K. B.; BENAIGES. M. D.; VALERO, F. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. **Biomass and Bioenergy**. Volume 85, February 2016, Pages 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.11.021>

CHENNUPATI, S.; POTUMARTHI, R. Multiple responses optimization and modeling of lipase production by *rhodotorula mucilaginosa* mtcc-8737 using response surface methodology. 2009. p. 317–329.

CHIALASTRI, R. A.; CASTRO, C. E. B; LEMES, V. C; PORTELA, F. M; TERRONES, M. G. H. Estudo dos fatores de influência no rendimento da reação de transesterificação etílica de girassol. 51º Congresso Brasileiro de Química: Meio Ambiente e Energia - São Luis / MA

2011.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. **Tese de doutorado**, 2006.

COLLA; L. M.; CHRISTIAN, O. R. .; JORGE, A. V. C. Applications and production of microbial lipases. **Revista ciatec**, 2012. v. 4, n. 2, p. 1–14.

CONTESINI, F. J. et al. Aspergillus sp . lipase: potential biocatalyst for industrial use. **Journal of molecular catalysis b : enzymatic**, 2010. v. 67, p. 163–171.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy conversion and management**, 2008. v. 50, n. 1, p. 14–34.

FRANKEN, L. P. G. et al. Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity. **Food and bioprocess technology**, 2010. v. 3, n. 4, p. 511–520.

GUTARRA, M. L. E. et al. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus penicillium simplicissimum by solid-state fermentation. **Bioresource technology**, 2009. v. 100, p. 5249–5254.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. Biotechnology advances.**

JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. 1998. v. 16, n. September, p. 396–403.

JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of biodiesel using immobilized lipase. **A critical review**, 2008.

KIRAN, K. R. et al. An esterification method for determination of lipase activity. **Biotechnology letters**, 2000. v. 22, p. 1511–1514.

KUMAR, S. et al. Use of evolutionary operation (evop) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource technology**, 2011. v. 102, n. 7, p. 4909–4912.

LI, N.; ZONG, M. H. Lipases from the genus penicillium: production, purification, characterization and applications. **Journal of molecular catalysis b: enzymatic**, 2010. v. 66, n. 1–2, p. 43–54.

LIMA, P. C. R. Biodiesel: um novo combustível. **Câmara dos deputados; consultoria legislativa.**, 2005.

MACEDO, L. N. et al. Estudo da influência de variáveis de processo na produção de lipases por fungo filamentoso. [s.d.].

MELO, M. A. R. De. Monitoramento da estabilidade oxidativa no armazenamento de biodiesel metílico de soja / mamona e blends em recipientes de vidro. 2009. p. 95.

- MENDES, A. A. . Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel. **Tese de doutorado**, 2009.
- MESSIAS, J. M. et al. Microbial lipases: production, properties and biotechnological applications. **Semina: ciências exatas e tecnológicas**, 2011. v. 32, n. 2, p. 213–234.
- MOHANASRINIVASAN, V. et al. Full length research paper a comparative study of the lipase yield by solid state and submerged fermentations using fungal species from biopharmaceutical oil waste. 2009. v. 8, n. 1, p. 73–76.
- NASCIMENTO, M. Da G. .; NETO, P. R. Da C. .; MAZZUCO, L. M. Biotransformação de óleos e gorduras. 2001. p. 28–31.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Quim. nova**, 2006. v. 29, n. 1, p. 93–99.
- PARENTE, E. J. S. Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza, CE. Tecbio, 2003.
- RAMOS, L. P. et al. Biodiesel production technologies. **Rev. virtual quim**, 2011. v. 3, n. 5, p. 385–405.
- RIGO, E. et al. Esterification activity of novel fungal and yeast lipases. **Applied biochemistry and biotechnology**, 2010. v. 162, n. 7, p. 1881–1888.
- RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. **Tese de doutorado**, 2009.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation. **Ciência e tecnologia de alimentos**, 2010. v. 30, n. 1, p. 126–131.
- SAAD, E. B. Etanolise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos. 2005.
- SALVADOR, A. A. et al. Biodiesel : aspectos gerais e produção enzimática. 2009.
- SANTOS, V. F. dos.; Biodiesel: O Combustível Ecológico. Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense v. 2, n. 1, p. 215-219, 2012.
- SANTOS, J. R. D. J. et al. Biodiesel de babaçu : avaliação térmica , oxidativa e misturas binárias biodiesel de babaçu : **Journal of chemical information and modeling**, 2008. v. 53, n. 9, p. 1689–1699.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology advances** 2001 v. 19, p. 627–662.
- SHU, Z. et al. Technical methods to improve yield , activity and stability in the development

of microbial lipases. **Journal of molecular catalysis b : enzymatic**, 2010. v. 62, p. 1–8.

SILVA, J. B. A. Diversidade e atividade enzimática da comunidade fúngica filamentosa associada à decomposição de detrito foliar em um riacho no cerrado. **Dissertação de mestrado**, 2014. p. 77f.

SUAREZ, P. A. Z. et al. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química nova**, 2009. v. 32, n. 3, p. 768–775.

SUAREZ, P.; MENEGHETTI, S. Transformation of triglycerides into fuels, polymers and chemicals: some applications of catalysis in oleochemistry. **Química nova**, 2007. v. 30, n. 3, p. 667–676.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. **Biotechnology advances**, 2010. v. 28, n. 5, p. 628–634.

VIDEIRA, A. Lipases produzidas por fungos derivados de ambiente marinho: otimização, purificação e caracterização bioquímica. **Dissertação de mestrado**, 2014.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis : a survey of chemical , physical and molecular biological approaches. 2000.