Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto de Química

Anna Carolina Veiga Fercher

Síntese de ésteres derivados do ácido oléico empregando lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica*.

Rio de Janeiro
2014

Anna Carolina Veiga Fercher

Síntese de ésteres derivados do ácido oléico empregando lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica*.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração:

Orientadoras: Marta Pereira Antunes Langone

Maria Alice Zarur Coelho

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

F346 Fercher, Anna Carolina Veiga.

Síntese de ésteres derivados do ácido oléico empregando lipases produzidas por *yarrowia lipolytica*. / Anna Carolina Veiga Fercher. / 2014.
97 f.

Orientador: Marta Pereira Antunes Langone.

Orientador: Maria Alice Zarur Coelho.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Biodiesel - Teses. 2. Lípase – Teses. 3. Ácido oléico – Teses. I. Langone, Marta Pereira Antunes. II. Coelho, Maria Alice Zarur. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 662.756.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

_____ _____

Assinatura Data

Anna Carolina Veiga Fercher

Síntese de ésteres derivados do ácido oléico empregando lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica*.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração:

Aprovada em 3 de outubro de 2014

Orientadores:

Profª. Dra. Marta Pereira Antunes Langone
Instituto de Química -UERJ

Profª. Dra. Maria Alice Zarur Coelho (Orientadora)
Escola de Química -UFRJ

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Antônio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química-UERJ

_____

Prof. Dr. Bernardo Dias Ribeiro
Escola de Química- UFRJ

_____

Profª. Dra. Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Instituto de Química- UERJ

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família
e ao meu namorado, que sempre
me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

As minhas orientadoras, professora Marta Pereira Antunes Langone e professora Maria Alice Zarur Coelho, pela atenção e paciência.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pelo suporte dado para a execução deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia Enzimática, Kelly Cristina, Daniele Queiroz, Juliana Masello, Douglas e Otavio Bernardes por todo auxílio que me deram durante todo o trabalho.

Aos parceiros do Laboratório BIOSE, por todo apoio.

A minha gerente Rafaela Peixoto, minha coordenadora Karinna Ribeiro e aos meus colegas de trabalho Paula Serra, Monica Oka, Claudia Lima, Evandro Cruz, Isabella Parracho e Ney Rosa, por compreenderem minha ausência e me apoiarem na elaboração deste trabalho.

A minha família por tudo que sou.

Aos meus amigos acreditarem em mim e compreenderem minhas faltas.

Ao meu namorado André por estar sempre comigo me dando apoio e incentivo.

E a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente desta conquista.

RESUMO

FERCHER, Anna Carolina Veiga. *Síntese de ésteres derivados do ácido oléico empregando lipases produzidas por Yarrowia lipolytica.* 2014. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Biodiesel é um biocombustível que consiste na mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa. O processo usual de produção deste combustível é a transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta. Nesse processo, a matéria prima deve conter baixo conteúdo de ácido graxos livres (≤ 1%) e água (≤ 0,5%). Como alternativa ao processo de transesterificação, destaca-se o emprego de matérias-primas de baixo custo, com elevado teor de ácidos graxos livres, para a síntese de ésteres alquílicos através de reações de esterificação. As reações de produção do biodiesel podem ser catalisadas por via química (ácida e básica) ou enzimática. Na catálise enzimática, os biocatalisadores empregados são as lipases, que catalisam a hidrólise e síntese de ésteres e podem ser obtidas a partir de microrganismos, plantas ou tecido animal, sendo as de origem microbiana as mais utilizadas. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial da lipase de *Yarrowia lipolytica*, uma levedura não convencional, na síntese de ésteres do ácido oleico visando à obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel). Foram estudados os efeitos da temperatura (25, 30, 35, 40, 50 e 60°C), do teor enzimático (5, 10, 20, 30 e 40% v/v) e do tipo de álcool (metanol, etanol, n-propanol e n-butanol) nas reações de esterificação do ácido oleico empregando o extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica*. Os resultados obtidos mostraram que as reações conduzidas a 30°C e com 10% v/v do extrato enzimático apresentaram maior taxa inicial de reação. Também foi avaliada a utilização do extrato enzimático liofilizado (5% m/v) e do PES (produto enzimático sólido) (5% m/v) de *Yarrowia lipolytica* na reação de esterificação do ácido oleico com n-butanol a 30°C. O maior consumo de ácido oleico ocorreu na reação conduzida com o PES. O efeito da temperatura (25, 30, 35, 40 e 50°C) na síntese de oleato de butila foi, então, investigado nas reações empregando PES como biocatalisador e a maior conversão de ácido oleico foi verificada na temperatura de 40°C.

Palavras-chave: Biodiesel. Ácido oléico. Lipases. *Yarrowia lipolytica*.

ABSTRACT

FERCHER, Anna Carolina Veiga. Synthesis of esters derived from oleic acid employing lipase produced by *Yarrowia lipolytica.* 2014. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Biodiesel is a biofuel which consists in a mix of monoalkylesters from long chain fatty acids. The usual method of producing this fuel is transesterification of vegetable oils with lower alcohols. In this process, the raw material should have a low content of free fatty acid (≤ 1%) and water(≤ 0.5%). As an alternative to the transesterification process stands out the use of low cost raw materials with high content of free fatty acids for the synthesis of alkyl esters through esterification reactions. Reactions for biodiesel production can be catalyzed chemically (acid and basic) or enzymatic. In enzymatic catalysis biocatalysts employed are lipases which are enzymes that catalyze hydrolysis and ester synthesis and can be obtained from microorganisms, plants and animal tissue and the most widely used is from microbial origin. The main objective of this study was to evaluate the potential of *Yarrowia lipolytica's* lipase a non-conventional yeast on the synthesis of esters of oleic acid in order to obtain alkyl esters (biodiesel). Effects of temperature (25, 30, 35, 40, 50 and 60°C) enzyme content (5, 10, 20, 30 and 40% v/v) and type of alcohol (methanol, ethanol, n-propanol and n-butanol) were studied in the esterification reactions of oleic acid employing enzymatic liquid produced by *Yarrowia lipolytica*. The results demonstrated that reactions conducted at 30°C and with 10% v/v of the enzyme extract showed higher initial reaction rate and higher conversion of oleic acid for all alcohols studied. Use of lyophilized enzyme extract (5%w/v) and SEP(solid enzymatic product) (5% w/v) from *Yarrowia lipolytica* was also evaluated in the esterification reaction of oleic acid with n-butanol at 30°C. The higher consumption of oleic acid has occurred in the reaction conducted with SEP. The effect of temperature (25, 30, 35, 40 and 50°C) in the synthesis of butyloleate was then investigated in reactions employing SEP as biocatalyst, and the higher conversion of oleic acid was observed at 40°C.

Keywords: Biodiesel. Oleic acid. Lipases. *Yarrowia lipolytica.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Matérias primas utilizadas para a produção de biodiesel no âmbito nacional..... 20

Figura 2- Reação de transesterificação entre um triglicerol e um álcool em presença de catalisador..... 23

Figura 3- Reação de esterificação entre um ácido graxo e um álcool em presença de catalisador..... 27

Figura 4- Esquema formação da ligação peptídica..... 29

Figura 5- Esquema da α-hélice e da folha β-pregueada..... 30

Figura 6- Reações catalisadas por lípases..... 34

Figura 7- Representação do dobramento α/β hidrolases..... 36

Figura 8- Diagrama de energia livre de reações não catalisadas e de reações catalisadas..... 41

Figura 9- Mecanismo de atuação das lípases..... 46

Figura 10- Curva de progressão de uma reação enzimática..... 47

Figura 11- Notação de Cleland para os mecanismos de reações sequenciais.. 49

Figura 12- Notação de Cleland para o mecanismo de reações Ping Pong BiBi 49

Figura 13- Sistema reacional utilizado..... 55

Figura 14- Titulador automático usado no acompanhamento das reações..... 57

Figura 15- Efeito da temperatura na reação de esterificação entre o ácido oléico e metanol, etanol,n-propanol e n-butanol empregando razão molar ácido oléico/álcool=1 e 20% v/v de extrato enzimático líquido de *Yarrowia lipolytica*..... 60

Figura 16- Influencia da temperatura na conversão dos substratos nas reações de esterificação do ácido oléico com metanol, etanol, n-propanol e n-butanol após 6 minutos de reação, empregando a razão molar ácido oléico/álcool=1 e 20% v/v de extrato enzimático de *Yarrowia lipolytica*..... 61

Figura 17- Gráfico de velocidade inicial de reações de esterificação do ácido oléico com metanol, etanol, n-propanol e n-butanol empregando o

teor enzimático de 20% v/v e variando a temperatura..... 62

Figura 18- Efeito da concentração enzimática na reação de esterificação entre o ácido oléico e metanol, etanol,n-propanol e n-butanol empregando razão molar ácido oléico/álcool=1 e temperatura de 30°C..... 64

Figura 19- Influência da concentração enzimática na conversão dos substratos nas reações de esterificação do ácido oléico com metanol, etanol, n-probpanol e n-butanol após 6 minutos de reação, empregando razão molar ácido oléico/álcool=1 e temperatura de 30°C..... 65

Figura 20- Gráfico de velocidade inicial de reações de esterificação do ácido oléico com metanol, etanol, n-propanol e n-butanol empregando a temperatura de 30°C e variando a concentração enzimática..... 67

Figura 21- Consumo de ácido oleico (%) em 3 horas de reações de esterificação com butanol empregando a razão molar ácido oleico/butanol =1, concentração enzimática de 10% v/v e temperatura de 30°C..... 68

Figura 22- Seletividade em relação ao álcool da lipase de *Yarrowia lipolytica* presente no extrato enzimático líquido na reação de esterificação entre o ácido oléico com metanol, etanol, n-propanol e n-butanol empregando razão molar ácido oléico/álcool=1, concentração enzimática de 10% v/v e temperatura de 30°C..... 69

Figura 23- Consumo de ácido oléico (%) com o tempo na reação de esterificação do ácido oléico com n-butanol a 30oC e empregando 5% m/v do extrato enzimático líquido liofilizado de *Yarrowia lipolytica*..... 72

Figura 24- Consumo de ácido oléico (%) com o tempo na reação de esterificação do ácido oléico com n-butanol a 30°C e empregando 5% m/v do PES de *Yarrowia lipolytica*..... 73

Figura 25- Consumo de ácido oleico (%) após 6 minutos de reação de esterificação do ácido oleico com n-butanol a 30°C e empregando o extrato enzimático liquido, o extrato liofilizado e o PES de *Yarrowia lipolytica*..... 74

Figura 26- Efeito da temperatura na reação de esterificação entre o ácido oléico e o n-butanol empregando a razão molar ácido oléico/n-

butanol=1 e 5% m/v de PES de *Yarrowia lipolytica*..... 75

Figura 27- Gráfico de velocidade inicial de reações de esterificação do ácido oleico com n-butanol a temperatura de 30oC e 5% m/v de PES de *Yarrowia lipolytica*..... 76

Figura 28- Reações de esterificação do ácido oléico com butanol empregando lipases comerciais CALB, Novozym 435 e Lipozyme RM IM conduzidas a 30°C..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição dos principais ácidos graxos encontrados nos óleos vegetais e a estrutura química de cada um deles..... 21

Tabela 2- Vantagens e desvantagens das enzimas frente a catalisadores convencionais..... 32

Tabela 3- Classificação de enzimas segundo o tipo de reação..... 32

Tabela 4- Conversões obtidas após 30 minutos de esterificação do ácido oleico com n-butanol a 30°C, empregando 5% v/v ou m/v das lipases de *Yarrowia lipolytica* (líquida, liofilizada e PES) e das lipases comercias (CALB, Novozym 435 e Lipozyme RM IM)..... 79

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANP	Agência Nacional de Petróleo e Gás Natural
ASTM	American Society of Testing and Materials
CMC	Concentração Micelar Crítica
EC	Enzyme Commission
FES	Fermentação em Estado Sólido
FDA	Food and Grugs Administration
FS	Fermentação Submersa
PES	Preparado Enzimático Sólido
SCO	Single Cell Oil
U	Unidade de Atividade

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 14
1. **OBJETIVOS** 18
1.1. **Objetivo Geral** 18
1.2. **Objetivos Específicos** 18
2. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 19
2.1. **Biodiesel** 19
2.1.1. Produção 19
2.1.2. Processos de obtenção 23
2.2. **Lipases** 28
2.2.1. Estrutura e características 28
2.2.2. Fontes de obtenção 37
2.2.3. Yarrowia lipolytica 38
2.2.4. Catálise e atividade enzimática 40
2.2.5. Ativação interfacial 44
2.2.6. Cinética reacional 47
2.2.7. Catálise em meios não convencionais 50
3. **Materiais e Métodos** 53
3.1. **Materiais** 53
3.2. **Reações de Esterificação** 54
3.2.1. Reação de esterificação utilizando extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica.* 55
3.2.1.1. Avaliação do efeito da temperatura. 55
3.2.1.2. Avaliação da concentração do extrato enzimático líquido empregado 56
3.2.2. Reações de esterificação utilizando extrato enzimático líquido liofilizado e o preparado enzimático sólido (PES) de *Yarrowia lipolytica.* 56
3.2.3. Reação de esterificação utilizando lipases comerciais. 56
3.3. **Volumetria de neutralização** 57
3.4. **Velocidade inicial da reação** 58

4. **Resultados** 59
4.1. **Reações de Esterificação utilizando extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica*.** 59
4.1.1. Avaliação do efeito da temperatura 59
4.1.2. Avaliação da concentração do extrato enzimático líquido. 64
4.1.3. Seletividade em relação ao álcool 69
4.2. **Reações de Esterificação utilizando extrato enzimático líquido liofilizado e Preparado Enzimático Sólido (PES) produzidos por *Yarrowia lipolytica*** 71
4.3. **Reações de Esterificação utilizando lipases comerciais** 77
CONCLUSÕES 80
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 82
REFERÊNCIAS 84

INTRODUÇÃO

A maior parte da energia consumida mundialmente é oriunda de fontes fósseis como o petróleo, o carvão e o gás natural, as quais são fontes limitadas e com previsão de esgotamento. Em função desse esgotamento, da alta no preço dessas fontes de energia e da crescente preocupação mundial com o meio ambiente, muitas pesquisas estão sendo voltadas para a busca por fontes de energia renováveis e ambientalmente corretas.

Por suas características produtivas, o biodiesel aparece como uma das principais fontes de energia sustentável, limpa, renovável e biodegradável (AKOH *et al*.,2007).

O biodiesel é um combustível para motores a diesel, feito a partir de fontes renováveis como óleos vegetais, gordura animal, óleos de reuso e óleo microbiano, é biodegradável, atóxico e ambientalmente correto, sendo, portanto, um potencial substituto para o diesel derivado de petróleo.

No Brasil, o biodiesel foi inserido na matriz energética a partir do Programa de Produção e Uso do Biodiesel, lançado em dezembro de 2004. Visando incrementar, em bases econômicas, sociais e ambientais, a participação dos biocombustíveis na matriz energética nacional, em 13 de janeiro de 2005 foi sancionada a Lei nº 11.097, que definiu o biodiesel como: “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”, o que inclui o uso de óleos vegetais *in natura*, misturas binárias óleo/diesel, álcool/diesel e ésteres/diesel, micro-emulsões, hidrocarbonetos derivados da pirólise de biomassa vegetal como o bagaço de cana, óleos vegetais craqueados e misturas ternárias álcool/diesel/co-solventes (ANP, 2014).

Além disso, a Lei n° 11.097 estabelecia percentuais mínimos de mistura do biodiesel com o diesel de petróleo. Entre 2005 e 2007, foi estabelecida a adição de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo, essa adição se tornou obrigatória de 2008 a

2012, gerando a necessidade de 1 bilhão de litros por ano. Em 2008, a Resolução n°2 do Conselho Nacional de Política e Energia aumentou de 2% para 3% o percentual obrigatório de biodiesel e, a partir de 2013, a adição de 5% se tornou obrigatória, representando um consumo de 2,4 bilhões de litros por ano (ANP, 2014). Em maio de 2014, o governo federal lançou a Medida Provisória n° 647 onde ficaram estabelecidos novos percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel, sendo de 6 % até julho e 7% até novembro do mesmo ano (MPV 647, 2014).

A Diretiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu, publicada em maio de 2003 com objetivo de promover a utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes, define o biodiesel como “ésteres metílicos produzidos a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustível para motores a diesel, para utilização como biocombustível” (JO, 2003).

Nos Estados Unidos, a norma ASTM D 6751, 2008 (ASTM- *American Society of Testing and Materials*) define o biodiesel como sendo mono-alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, produzidos a partir de óleos vegetais ou animais, para ser utilizado em motores de ciclo a diesel.

As especificações brasileiras para o biodiesel permitem que o mesmo seja produzido com base em diversas matérias primas, dentre estas pode-se destacar o uso de óleos de algodão, milho, amendoim, canola, babaçu, dendê, girassol, mamona e soja, sendo a produção de cada um deles específica em uma região brasileira. Por serem essas matérias primas originadas de óleos comestíveis, cresce a preocupação com a competição entre a produção de óleos destinados ao setor alimentício e o setor de biocombustíveis, podendo em longo prazo, levar a um desequilíbrio entre a oferta e a demanda dos mesmos (GUI *et al*., 2008). Desta forma, atualmente muitas pesquisas estão voltadas para encontrar matérias-primas que atendam a produção de biocombustíveis e que não afete de maneira significativa a produção alimentícia. Dentre as alternativas estão, a utilização de óleos vegetais com elevado índice de acidez, de óleo microbiano e de óleos e gorduras residuais (FELTES *et al*., 2011 ; RAMOS, *et al.,*2011 e MAGALHÃES, 2010).

Os principais processos empregados na produção de biodiesel são: a transesterificação (MA *et al.*, 1999; MAGALHÃES, 2010; PORTAL BIODIESELBR, 2014) e a esterificação (AGUIERAS *et al.*, 2013 ; RAMOS *et al.*, 2011; PORTAL BIODIESELBR, 2014) .

O processo industrial de síntese de biodiesel mais utilizado é a transesterificação de óleos vegetais ou de gorduras animais com um álcool de cadeia curta (metanol) empregando catalisador homogêneo alcalino (hidróxido de sódio ou de potássio. Este processo é muito eficiente e promove rendimento de cerca de 98%. Catalisadores ácidos e enzimáticos também podem ser empregados no processo (LÔBO *et al.*, 2009; MEDINA *et al.*, 2009, CERVERÓ *et al.*, 2008; PORTAL BIODIESELBR, 2014).

Apesar dos altos rendimentos obtidos com o processo de transesterificação, este apresenta algumas desvantagens, por exemplo, a necessidade de matérias primas com baixo grau de acidez contendo no máximo 1% de ácidos graxos livres e teor de água abaixo de 0,5%, uma vez que, a presença de ácidos graxos livres acarreta na formação indesejável de sabões e a presença de água leva a hidrólise dos triacilgliceróis, levando a redução no rendimento, dificultando a purificação do produto final e agregando maior custo ao processo (PISARELLO *et al.*, 2010, BANKOVIC *et al.*, 2012).

Devido aos requisitos apresentados, a matéria prima para a produção do biodiesel por transesterificação pode representar de 50 % a 85% do custo total do biocombustível (MA *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2009).

Como alternativa ao processo de transesterificação, muitos trabalhos relatam a possibilidade do emprego de matérias-primas de baixo custo com altos teores de ácidos graxos livres para a síntese de ésteres monoalquílicos através de reações de esterificação (AGUIEIRAS *et al.*, 2013; PISARELLO *et al.*, 2010 ; ENCARNAÇÃO, 2008 ; CAVALCANTI *et al.*, 2010; GOMES, 2009; BASTOS, 2013).

Os processos de produção de biodiesel podem ser conduzidos empregando catalisadores químicos (ácidos ou básicos) ou catalisadores enzimáticos (lipases) (MEDINA et al., 2009).

O emprego da catalise enzimática para a síntese do biodiesel apresenta várias vantagens, visto que as lipases catalisam a esterificação de ácidos graxos livres e transesterificação de trigicerídeos com alcoóis, sem que ocorra a saponificação diminuindo as etapas de purificação. Além disso, como as reações ocorrem em condições brandas de temperatura, pH e pressão, o gasto energético é menor. Portanto reações enzimáticas podem representar uma alternativa, principalmente quando a matéria prima utilizada apresenta alta concentração de ácidos graxos livres como os óleos ácidos, que apresentam menor valor de mercado (FJERBAEK *et a*l., 2009 ; NELSON *et al*., 1996; KUMARI *et al*., 2007).

As lipases (triacilglicerolacilhidrolases, EC 3.1.3) constituem um dos grupos mais importantes de enzimas usadas industrialmente. Essas enzimas hidrolisam ligações ésteres de triglicerídeos preferencialmente na interface entre lipídio e água. Em meios não aquosos, as lipases catalisam reações de esterificação e de transesterificação (BUCHHOLZ *et al*., 2005; FREIRE *et al*., 2008).

Uma das dificuldades atreladas à utilização de lipases como catalisadores industriais é o alto custo das mesmas quando comparado ao custo de catalisadores químicos (ZANG *et al.*, 2003 ; MA *et al.*, 1999; MEHER *et al.*, 2006; FJERBAEK *et al.*, 2009). Para viabilizar a utilização de catalisadores enzimáticos em escala industrial, a produção de lipases não comerciais deve ser estudada, para diminuir o custo do processo.

Diante disto, este trabalho aborda a produção de ésteres alquílicos a partir de reações de esterificação do ácido oleico com um álcool de cadeia curta empregando lipases de *Yarrowia lipolytica*. Algumas condições reacionais, visando a otimização dos parâmetros, foram avaliadas nas reações entre o ácido oleico e álcoois de cadeia curta.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

O principal objetivo desse trabalho é avaliar o potencial das lipases de *Yarrowia lipolytica* em catalisar reações de esterificação do ácido oleico com álcool visando à obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel).

1.2. Objetivos Específicos

A. Análise da influência dos parâmetros reacionais: Temperatura (^{o}C), tamanho da cadeia do álcool (metanol, etanol, propanol e butanol) e quantidade de enzima (% v/v ou % m/v);

- ✓ Avaliação da influência da temperatura na taxa da reação e na determinação da temperatura ótima de síntese do éster do ácido oleico nas condições empregadas;
- ✓ Estudo da seletividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* em relação ao tamanho da cadeia do álcool;
- ✓ Estudo do efeito da concentração enzimática empregada e da influência da água (presente no extrato enzimático líquido) no meio reacional;

B. Comparação das lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica* com as lipases comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e CALB nas reações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biodiesel

2.1.1. Produção

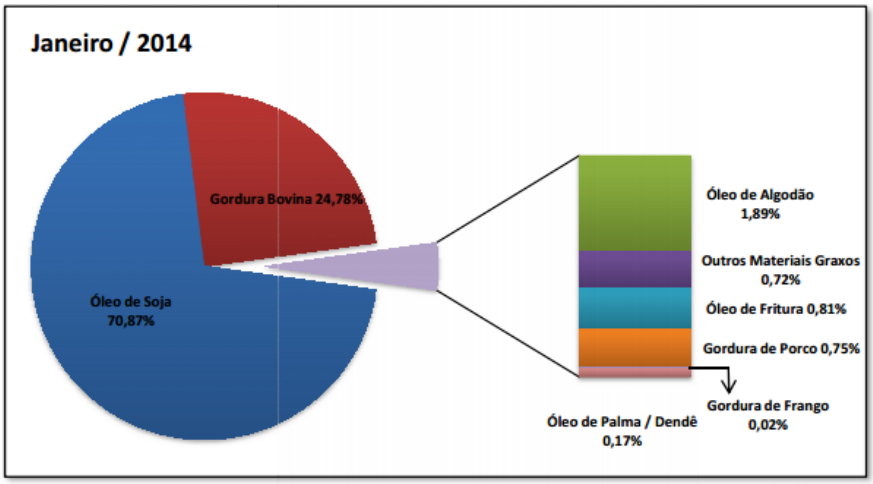
Atualmente a produção de biodiesel tem recebido grande atenção de pesquisadores e investidores devido à redução das fontes de obtenção do diesel de petróleo e à necessidade do desenvolvimento de combustíveis renováveis, menos poluentes e economicamente vantajosos. O biodiesel é um combustível constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, sendo quimicamente definido como uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa (LUKOVIC *et al*., 2011).

O biodiesel apresenta inúmeras vantagens do ponto de vista ambiental como, por exemplo, é derivado de fontes renováveis, é biodegradável, apresenta um alto valor energético, baixo conteúdo de enxofre, o que permite a queima limpa do combustível com redução de emissões de SOx, CO, hidrocarbonetos e partículas sólidas, reduzindo consideravelmente a poluição (MA *et al*., 1999; AL-ZUHAIR, 2007; SALIS *et al*., 2005 e LUKOVIC *et al*., 2011). Quando comparado a outros combustíveis alternativos, o biodiesel apresenta muitas vantagens, uma vez que suas propriedades físicas e químicas, como suas propriedades lubrificantes e seu conteúdo energético, são similares às do diesel de petróleo, podendo, portanto ser utilizado puro ou misturado ao diesel convencional sem a necessidade de alteração no sistema de ignição dos motores aos quais será empregado (GOMES, 2009; AL-ZUHAIR, 2007; BOZBAS, 2008; MEDINA *et al*., 2009). Além disso, os sistemas de bombeamento, transporte e armazenamento utilizados para o diesel de petróleo podem ser empregados para este biocombustível sem ser necessária adaptação (BOZBAS, 2008; AL-ZUHAIR, 2007; MEDINA *et al*., 2009). O biodiesel não produz

vapores explosivos e em virtude do seu alto ponto de fulgor, aproximadamente 150°C, seu transporte e seu armazenamento são muito seguros (AL-ZUHAIR, 2007).

As fontes de matéria prima empregadas na produção deste combustível são: óleos vegetais, gorduras animais, óleos de descarte e óleos microbianos. Os óleos extraídos de plantas oleaginosas são atualmente a matéria prima mais empregada na produção do biodiesel (ANP, 2014; RAMOS *et al*., 2009 ; FELTES *et al*., 2011). No Brasil, o óleo de soja é o mais empregado para a produção do biodiesel representando cerca de 70,9%, seguido pela gordura animal representando cerca de 24,8% (Figura 1) (ANP, 2014; FELTES *et al*., 2011; RAMOS, 2009; MAGALHÃES, 2010).

Figura 1. Matérias primas utilizadas para a produção de biodiesel no âmbito nacional.



Fonte: Boletim Mensal do Biodiesel ANP, Superintendência de Refino, Processamento de Gás Natural e Produção de Biocombustíveis

A qualidade do biocombustível produzido está diretamente relacionada com a composição e tipo de ácidos graxos presentes nos óleos empregados como matéria-prima para sua produção, fatores como o grau de insaturação, o tamanho das moléculas e a presença ou não de grupos químicos nesses ácidos graxos são muito influentes e irão determinar a qualidade do produto gerado.

A Tabela 1 relaciona a composição dos principais ácidos graxos encontrados nos óleos vegetais e a estrutura química de cada um deles.

Tabela 1 Composição (%) dos principais ácidos graxos presentes em óleos vegetais e em óleo microbiano de *Y. lipolytica.*

Ácidos Graxos	Ponto de Fusão (^{0}C)	*Yarrowia lipolytica*	Óleo de soja	Óleo de palma	Óleo de babaçu	Óleo de milho	Óleo de coco	Óleo de girassol
Palmítico (C16:0)	61-62,5	14-23	10,3	43,9	9	9,9	9,2	6
Esteárico (C18:0)	67-72	47-68	4,7	4,9	3,5	3,1	2,9	5,9
Oleico (C18:1)	13-14	7-18	22,5	39,0	15	29,1	6,9	16
Linoléico (C18:2)	-5	2-9	54,1	9,5	2,6	56,8	1,7	71,4
Outros	-	-	8,3	1,4	69,9	0,1	79,3	0,7

Fonte: PAPANIKOLAOU et al., 2007; THE MERCK INDEX, 2006; BALAT, 2008 e MACHADO et al., 2006; GOMES,2009.

Dessa forma, os ésteres alquílicos (biodiesel) podem ser obtidos a partir de qualquer óleo vegetal, porém alguns óleos são considerados não ideais para a produção desse biocombustível, como por exemplo aqueles que apresentam alto índice de iodo (elevado índice de insaturação) e alta viscosidade, tornando o combustível suscetível à oxidação. De uma forma geral, o biodiesel produzido a partir de matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos mono-insaturados (oleico e ricinoleico) apresenta melhor qualidade. Além disso, a matéria prima utilizada deve conter baixo conteúdo de ácido graxos livres (≤ 1%) e água (≤ 0,5%), pois a presença de ácidos graxos livres acarreta na formação indesejável de sabão e a presença de água pode levar a hidrólise dos triacilgliceróis (BANKOVIC *et al*., 2012 ; LOTERO *et al*., 2005).

Outro fator importante na seleção do óleo a ser empregado está relacionado às questões de fluxo do combustível a baixas temperaturas. Matérias primas com

alto teor de ácidos graxos saturados tendem a apresentar problemas de solidificação. O aumento da viscosidade dos ésteres saturados pode causar entupimento nos filtros e sistemas de injeção (RAMOS *et al.,* 2011).

Um dos principais desafios no processo de produção de biodiesel é encontrar matérias-primas que atendam às expectativas dos programas energéticos sem causar impacto significativo na produção de alimentos. Dessa forma, fontes alternativas de matéria prima vêm sendo estudadas, como é o caso de óleos não comestíveis (pinhão-manso, babaçu), das microalgas e de alguns micro-organismos oleaginosos (fungos, leveduras e bactérias) que são capazes de acumular lipídios em sua biomassa (RATLEDGE *et al*., 2002 ; GUI *et al*., 2008 ; MAGALHÃES, 2010).

As microalgas são a matéria prima mais barata, porém a produção de óleo a partir destas é um obstáculo, pois as condições de crescimento nas quais há uma maior produção de óleo são as mesmas em que a taxa de crescimento das microalgas é baixa (baixa temperatura, pouca luz e pouco nitrogênio disponível) (MEDINA *et al*., 2009).

Os lipídios microbianos vêm sendo destacados como potencial fonte de triglicerídeos, dentre as vantagens na utilização dos mesmos como matéria-prima para a produção de biodiesel está o curto tempo de crescimento do micro-organismo, facilidade de produção do óleo em larga escala e sua produção não é afetada por fatores climáticos (LI *et al*., 2008 ; MENG *et al*., 2009). Os micro-organismos empregados para tal finalidade são conhecidos como *single cell oil* (SCO) e são capazes de acumular lipideos na forma de triglicerídeos. São considerados SCO aqueles que apresentam 20% ou mais de sua biomassa constituída de lipídios. As leveduras oleaginosas mais conhecidas incluem os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporam* e *Yarrowia* (CASTANHA, 2012 ; KATRE *et al*., 2012).

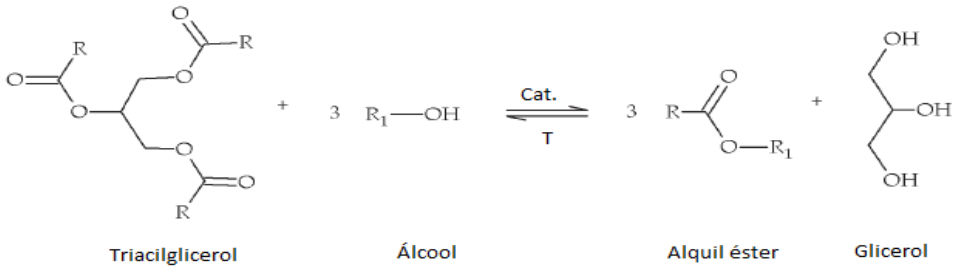
Dentre os óleos vegetais não comestíveis está o pinhão-manso, que desperta grande interesse no setor de biocombustíveis, uma vez que apresenta ciclo perene com elevada produção anual de óleo (PENHA *et al*., 2007; SOUZA *et al*., 2009). Seus frutos são cápsulas que contêm em seu interior sementes ricas em óleo cuja composição é basicamente, ácido palmítico (14,3 %), ácido esteárico (5,1 %), ácido

oleico (41,1 %) e ácido linoleico (38,1%) (PENHA *et al*., 2007). Seu alto teor de ácidos graxos livres acarreta em dificuldades de purificação do produto final e saponificação durante a produção de biodiesel por transesterificação.

2.1.2. Processos de Obtenção

As reações de transesterificação (Figura 2) de óleos ou gorduras em presença de metanol, produzindo ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol, vêm sendo reportadas, como o principal processo de produção de biodiesel, porém o etanol, propanol e butanol também podem ser utilizados como alquil doadores (FELTES *et al*., 2011). A transesterificação pode ser catalisada por via química (ácida e básica) ou enzimática. Essas são reações orgânicas onde um éster é transformado em outro através da troca de resíduo alcoxilas, resultando em um alquil éster e glicerol bruto (subproduto) (AKOH *et al*., 2007). O glicerol bruto obtido como subproduto da reação pode ser utilizado como substrato para síntese de monoacilgliceróis, os quais são aplicados, por exemplo, na indústria de alimentos (FREITAS *et al*., 2009).

Figura 2-Reação de transesterificação entre um triacilglicerol e um álcool em presença de catalisador.



Fonte: Feltes, 2011.

As reações de transesterificação ocorrem em três etapas reversíveis e consecutivas, apresentadas a seguir, nas quais diglicerídeos e monoglicerídeos são intermediários formados.

1ª etapa:

$$\text{Triglicerídeo (TG)} + \text{R}'\text{OH} \overset{\text{cat}}{\leftrightarrow} \text{Diglicerídeo (DG)} + \text{R}'\text{COOR}_1$$

2ª etapa:

$$\text{Diglicerídeo (DG)} + \text{R}'\text{OH} \overset{\text{cat}}{\leftrightarrow} \text{Monoglicerídeo (MG)} + \text{R}'\text{COOR}_2$$

3ª etapa:

$$\text{Monoglicerídeo (MG)} + \text{R}'\text{OH} \overset{\text{cat}}{\leftrightarrow} \text{Glicerol (GL)} + \text{R}'\text{COOR}_3$$

Para garantir o equilíbrio da reação geralmente utiliza-se álcool em excesso. Seguindo a estequiometria da reação, para cada mol de triglicerídeo são produzidos 3 mols de biodiesel e 1mol de glicerol (LUKOVIC *et al*., 2011).

Em geral, na transesterificação são utilizados óleos/gorduras com acidez menor ou igual a 1%, uma vez que a acidez maior do que essa representa alta concentração de ácidos graxos, levando a um maior consumo de catalisador e elevados índices de saponificação, dificultado a purificação do produto final (GOMES, 2009 ; SRINIVAS *et al*., 2011).

Os álcoois mais utilizados para este processo são aqueles que apresentam baixa massa molecular, cadeia polar e curta como por ex., metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico, sendo o metanol e o etanol os mais empregados (MEDINA *et al*., 2009 e GOMES, 2009). Metanol é o mais utilizado devido ao seu baixo custo e as suas vantagens físicas e químicas (polaridade, álcool de cadeia mais curta reage rapidamente com o triacilglicerídeo e dissolve facilmente o catalisador básico), além de facilitar a separação do glicerol. A mesma reação usando etanol requer um álcool anidro e um óleo com baixo teor de água para levar a separação do subproduto (GERIS *et al*., 2007). Apesar de algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel através da rota etílica (mais lenta, consome mais álcool, maiores dificuldades de separação), o biodiesel etílico possui uma viscosidade maior

que o biodiesel metílico promovendo uma maior lubricidade em relação ao biodiesel metílico. Pode-se destacar também que o biodiesel etílico gera significativamente menos opacidade na fumaça que o biodiesel metílico, sua temperatura de combustão é menor, significando, entre outros aspectos, uma redução nas emissões de NOx. Além disso, o metanol é tóxico e gerado a partir de uma fonte esgotável que é o gás natural, de modo que o biodiesel produzido a partir desse reagente não é totalmente renovável. Já o biodiesel proveniente da reação do óleo com o etanol pode ser considerado um combustível totalmente renovável (BOZBAS, 2008), visto que esse álcool é obtido no Brasil majoritariamente pela fermentação da cana-de-açúcar.

As reações de transesterificação podem ser catalisadas por bases (NaOH, KOH, carbonatos ou alcóxidos), ácidos (HCl, H_2SO_4 e HSO_3-R) ou enzimas (lipases) (MEDINA *et al*., 2009).

A catálise alcalina é mais eficiente, e, atualmente, a mais empregada nas reações de transesterificação, apresentando maiores rendimentos, menor tempo de reação, maior seletividade e menos problemas associados à corrosão de equipamentos, porém a saponificação de ácidos graxos livres e dos glicerídeos e ésteres monoalquilicos formados são desvantagens associadas a este tipo de catálise (PISARELLO *et al*.,2010) reduzindo o rendimento e aumentando o número de etapas de purificação do produto final (MEDINA *et al*.,2009).

Na catálise ácida, os catalisadores mais usados são os ácidos de Brönsted, como os ácidos sulfônicos e o sulfúrico. Este tipo de catalise é mais utilizada para óleos com alto teor de ácidos graxos livres e fornecem bons rendimentos, porém as reações são mais lentas e necessitam de altas temperaturas e elevada razão molar de substrato para alcançar a conversão completa (MEDINA *et al*., 2009) . Além disso, ácidos residuais podem gerar corrosão nos motores, sendo, portanto, necessárias muitas etapas de purificação para a remoção completa dos mesmos (GOMES, 2009 e MEDINA *et al*.,2009).

A catálise enzimática vem sendo muito proposta como alternativa para o processo, os biocatalisadores empregados são as lipases. As principais vantagens no emprego de biocatalisadores são: ampla disponibilidade, condições brandas de

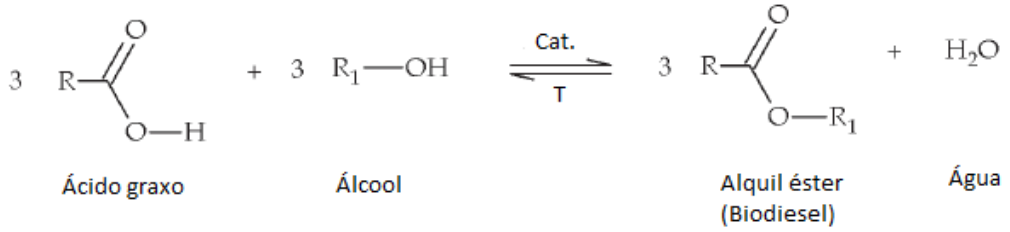
reação (temperatura, pressão e pH) o que representa um menor consumo de energia, elevada especificidade e facilidade na separação da glicerina, que é um subproduto da reação, resultando em um produto de melhor qualidade (CERVERÓ *et al*., 2008 e LUKOVIC *et al*., 2011). Além disso, os ácidos graxos presentes no óleo utilizado podem ser completamente convertidos em metil/etil ésteres, sem a formação de sabão, e ainda existe a possibilidade de reutilização dos biocatalisadores imobilizados, o que reduz o custo de produção do biocombustível. Essa característica dos catalisadores enzimáticos permite a utilização dos mesmos em processos nos quais a matéria prima contém alto conteúdo de ácidos graxos ou alto teor de água, como é o caso dos óleos de descarte de cozinha e industriais (LUKOVIC *et al*., 2011).

Apesar de todas as vantagens apresentadas, os processos enzimáticos para produção de biodiesel apresentam pontos negativos como, por exemplo, baixa taxa de reação, custo da enzima e baixa estabilidade da enzima em presença de metanol dentre outros (BAJAJ *et al*., 2010 e FJERBAEK *et al*., 2009).

Como alternativa ao processo de transesterificação, muitos trabalhos relatam a possibilidade do emprego de matérias-primas de baixo custo e com qualquer teor de ácidos graxos livres e umidade (óleos de plantas oleaginosas, materiais graxos residuais, óleo microbiano, etc.) para a síntese de ésteres monoalquílicos através de reações de esterificação. A utilização destas matérias primas para a produção de biocombustíveis é de grande interesse econômico, uma vez que são mais baratas e disponíveis. Além disso, reações de esterificação ocorrem em uma única etapa e, como não há formação de glicerol e seu produto não necessita de purificação (AGUIEIRAS *et al*., 2013 ; PISARELLO *et al*., 2010 ; GOMES, 2009; MA *et al*., 1999; SOARES, 2014).

Reações de esterificação (Figura 3) são reações entre ácidos graxos e álcoois que resultam na formação de ésteres e água como subproduto. Para aumentar a velocidade do processo são utilizados catalisadores que podem ser ácidos ou enzimas.

Figura 3- Reação de esterificação entre um ácido graxo e um álcool em presença de catalisador.



Fonte: SOARES, 2014

A esterificação gera alquil éster (biodiesel) de elevada pureza e como subproduto a água, sendo assim, não são necessárias etapas de lavagem, que geram efluentes e elevado consumo de compostos químicos.

Essas reações são reversíveis, podendo ocorrer tanto no sentido direto (esterificação) como no sentido inverso (hidrólise do éster), sendo assim, faz-se necessária a adoção de métodos para deslocar o equilíbrio da reação a fim de se obter maior rendimento. Os métodos que podem ser empregados neste caso são a remoção de um dos produtos, preferencialmente a água, ou a utilização de excesso de um dos substratos, preferencialmente o álcool (NEVES, 2008). São em geral reações de primeira ordem e podem ser afetadas por diversos fatores como temperatura reacional, pureza de reagentes, quantidade de água no meio, razão molar álcool/ácido graxo e concentração do catalisador (VIEIRA, 2011).

A produção de biodiesel também pode ser realizada pelo processo de hidroesterificação (GOMES, 2009). A hidroesterificação consiste em duas etapas, nas quais primeiramente todos os glicerídeos (mono-, di- e triglicerídeos) são convertidos em ácidos graxos a partir da reação de hidrólise. Em seguida, os ácidos graxos livres são esterificados com um álcool de cadeia curta dando origem a ésteres alquílicos de elevada pureza. A hidroesterificação pode ser realizada empregando catalisadores químicos ou enzimáticos.

Fatores como a quantidade de enzima adicionada, a razão molar dos reagentes, a quantidade de água, a temperatura, o emprego de solventes, o tipo do álcool empregado e a forma de adição do álcool (única ou escalonada), o suporte

empregado para a imobilização e a estabilidade da preparação enzimática influenciam no rendimento das reações de síntese de biodiesel catalisada por lipases, e variam de acordo com a enzima e com os reagentes, portanto, devem ser estudados para cada caso.

Atualmente muitas pesquisas estão voltadas para o desenvolvimento de catalisadores enzimáticos, a fim de torná-los economicamente vantajosos e mais eficientes tanto em meio aquoso, como em meio não aquoso. Técnicas de modificação de lipases estão sendo estudadas, buscando uma maior atividade, estabilidade e seletividade dessas enzimas.

2.2. **Lipases**

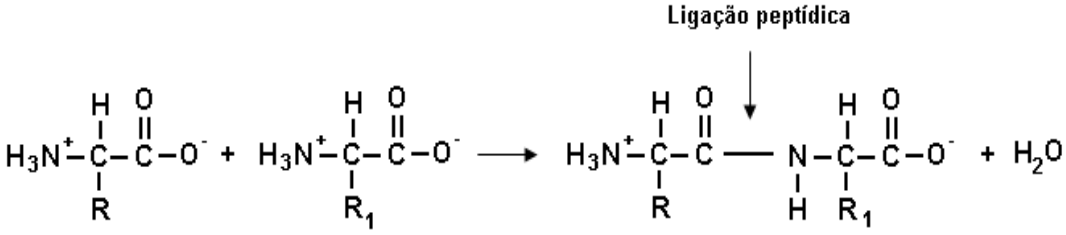
2.2.1. Estrutura e Características

As enzimas são em sua maioria proteínas com atividade catalítica. Quimicamente, são definidas como macromoléculas de alta massa molecular formadas por subunidades de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Figura 2.4). O grupamento amino de um aminoácido se liga ao grupamento carboxílico do outro por ligações covalentes, constituindo cadeias polipeptídicas extensas que assumem um arranjo espacial e estrutural complexo (TAIPA *et al.*, 2003 ; TORRES, 2001).

O número de aminoácidos e a ordem na qual eles se ligam são responsáveis pelas propriedades físicas e químicas da enzima. A cadeia de aminoácidos ligados uns aos outros, formam a estrutura primária, cujo conhecimento permite a comparação entre as formas nativas e mutantes de uma mesma enzima, a comparação entre enzimas homólogas em espécies diferentes, a clonagem para a melhoria das propriedades da atividade e estabilidade por manipulação genética, a

obtenção de informações sobre a estrutura terciária e o estabelecimento da relação estrutura/função das enzimas.

Figura 4- Esquema da formação da ligação peptídica.



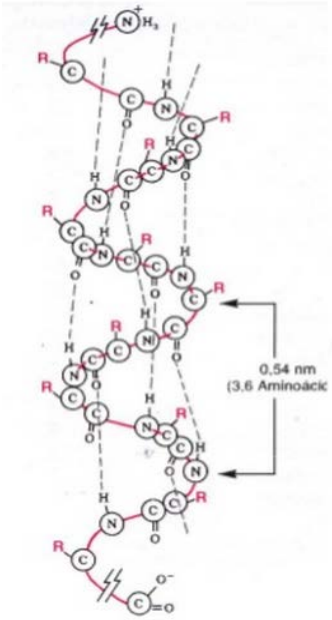
Fonte: Adaptado de Torres, 2011

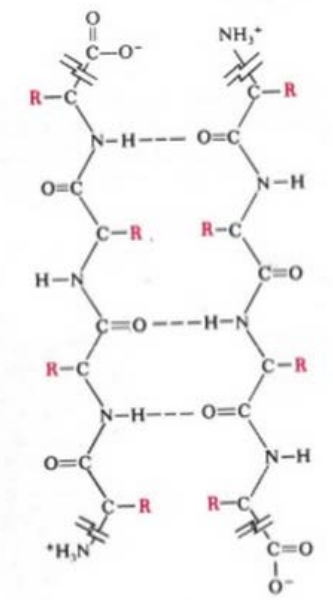
Estruturas polipeptídicas periódicas da cadeia principal, organizadas em α-hélice e folha plissada β, formam a estrutura secundária (Figura 5), que é estabilizada por ligações de hidrogênio estabelecidas entre o átomo de nitrogênio e o átomo de oxigênio, cada ligação peptídica possui um átomo de hidrogênio ligado covalentemente ao nitrogênio e o oxigênio preso ao carbono por uma dupla ligação (TORRES, 2001).

A estrutura secundária também diferencia uma enzima da outra, quanto ao tipo, quantidade e arranjo, e está dividida em cinco classes (TORRES, 2001).

- Constituídas quase que exclusivamente por α hélices;
- Constituídas quase que exclusivamente por folhas β;
- Contendo α hélices e folhas β em regiões separadas ao longo da cadeia(α+β);
- Contendo α hélices e folhas β alternadamente ao longo da cadeia (α/β);
- Não contendo α hélices nem folhas β.

Figura 5- Esquema da a) α-hélice e b) folha β-pregueada





a) α-hélice estabilizada por ligações de hidrogênio, dispostas perpendicularmente à cadeia polipeptídica
Fonte: Torres, 2001.

b) folha β-pregueada, estabilizada por ligações de hidrogênio formadas entre dois segmentos da cadeia polipeptídica.

A estrutura terciária é representada pela conformação tridimensional resultante dos arranjos estruturais da cadeia polipeptídica (estrutura secundária) e dos vários tipos de interações que se estabelecem entre as cadeias laterais de aminoácidos que podem ser apolares, portanto hidrofóbicos (glicina, alanina, triptofano etc), polares com carga positiva (lisina, histidina, arginina), polares com carga negativa (aspartato, glutamato) ou polares sem carga (cisteína, glutamina, serina) com regiões do grupo R mais negativas (oxigênio da serina) ou regiões do grupo R mais positivas (átomos de hidrogênio ligados aos átomos mais negativos).

Quando em solução, os grupos polares tendem a se aproximar uns dos outros de forma a excluir a água da cadeia, se voltando para o interior da molécula, enquanto os grupos apolares ficam voltados para a superfície levando ao dobramento causado por interações hidrofóbicas. Grupos R com carga positiva fazem ligações eletroestáticas com grupos R com carga negativa (TAIPA *et al*., 2003 ; TORRES, 2001).

Todas essas interações estabelecidas entre as cadeias laterais dos aminoácidos (forças de *Van der Walls*, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto e ligações iônicas) são responsáveis pela estabilidade estrutural da enzima. Geralmente existe uma única conformação na qual a enzima mantém atividade biológica, essa é designada conformação nativa (TAIPA *et al*., 2003; BUCHHOLZ *et al*., 2005). A perda da integridade da conformação nativa da enzima faz com que sua atividade catalítica seja destruída (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Algumas enzimas necessitam da associação com outras moléculas ou íons para exercer seu papel catalítico, esses são chamados de co-fatores e podem ser íons metálicos (Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, etc.) ou moléculas orgânicas não proteicas (ATP, Coenzima etc) (TORRES, 2001).

As enzimas catalisam reações bioquímicas, aumentando sua velocidade, assim como os catalisadores químicos, reduzem a energia de ativação da reação e não alteram o equilíbrio químico das reações que participam. Dentre as vantagens dos catalisadores enzimáticos está o fato de serem altamente específicos, apresentarem menor número de etapas de reação, poucos problemas associados à separação do subproduto e menor consumo de energia, podem ser utilizadas com uma ampla variedade de substratos, incluindo substratos não-naturais. Entretanto as enzimas são muito sensíveis a variações de temperatura, pH e presença de alguns compostos químicos (desnaturantes) (BUCHHOLZ *et al*., 2005; FREIRE *et al.*, 2008; TAIPA *et al*., 2003). Muitos estudos vêem sendo realizados para contornar esta sensibilidade e visando a melhoria nas propriedades das enzimas, bem como: modificações químicas, imobilização em matrizes sólidas, cristalização, agregação e mutagênese (BORNSCHERUER *et al*., 2006). A Tabela 2.2 apresenta vantagens e desvantagens no emprego dos catalisadores enzimáticos comparados a catalisadores químicos.

Aproximadamente 4000 enzimas são conhecidas e em torno de 200 são utilizadas comercialmente, sendo em sua maioria de origem microbiana. Cerca de 75% das enzimas industrializadas são hidrolases e 90% destas são produzidas por micro-organismos através de processos fermentativos (MESSIAS *et al*., 2011; JAEGER *et al*., 1997).

Tabela 2- Vantagens e desvantagens das enzimas frente a catalisadores convencionais.

Vantagens	**Desvantagens**
Alta especificidade	Alta complexidade molecular
Alta atividade em condições moderadas	Alto custo de produção
Alto *turnover number**	Fragilidade intrínseca
Biodegradabilidade	
Oriundo de fontes renovável	

*turnover number representa o número máximo de moléculas de substrato que a enzima pode converter a produto por sítio catalítico por unidade de tempo
Fonte: ILLANES, 2008

A classificação das enzimas pela *Enzyme Commission* (Tabela 3) é feita por quatro números, o primeiro indica sua classe principal, o segundo indica sua subclasse, o terceiro indica a sub-subclasse e o quarto é o número de série designado arbitrariamente nessa subclasse (VOET *et al*., 2008).

Tabela 3- Classificação de enzimas segundo o tipo de reação

Classificação	**Tipo de Reação Catalisada**
1. Oxidorredutases	Reações de Oxidorredução
2.Transferases	Transferência de Grupos Funcionais
3. Hidrolases	Reações de hidrólise
4.Liases	Eliminação de grupos para formação de ligações duplas
5.Isomerases	Isomerização
6.Ligases	Formação de ligações pelo acoplamento com hidrólise de ATP

Fonte: VOET *et al*., 2008

As lipases (triacilglicerol esteracilhidrolases E.C.3.1.1.3.) são enzimas pertencentes à família das hidrolases, que catalisam hidrólise e síntese de ésteres

de forma quimio-, regio- e enantioseletivas. Apesar do ambiente natural dessas enzimas ser em meio aquoso, elas apresentam grande potencial de atuação em solventes não aquosos (biocatálise em meios não convencionais). São as enzimas mais utilizadas em sínteses orgânicas, nas quais apresentam grande potencial catalítico, sendo aplicadas em muitos setores como na indústria de alimentos, farmacêutica, de química fina, oleoquímica, de detergentes etc (BUCHHOLZ *et al*., 2005; FREIRE *et al*., 2008). Além disso, estão comercialmente disponíveis e podem ser utilizadas em larga escala de pH e temperatura.

Em meio aquoso, a reação de hidrólise de triacilgliceróis de cadeias longas ocorre na interface água/lipídio, formando ácidos graxos livres e glicerol (YOO *et al.,* 2011, KADEMI *et al*., 2005 e CORZO *et al*., 1999). Em meio aquo-restrito, catalisam a reação reversa (esterificação) atuando na síntese de mono-, di- ou triacilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol (SAXENA *et al*., 1999).

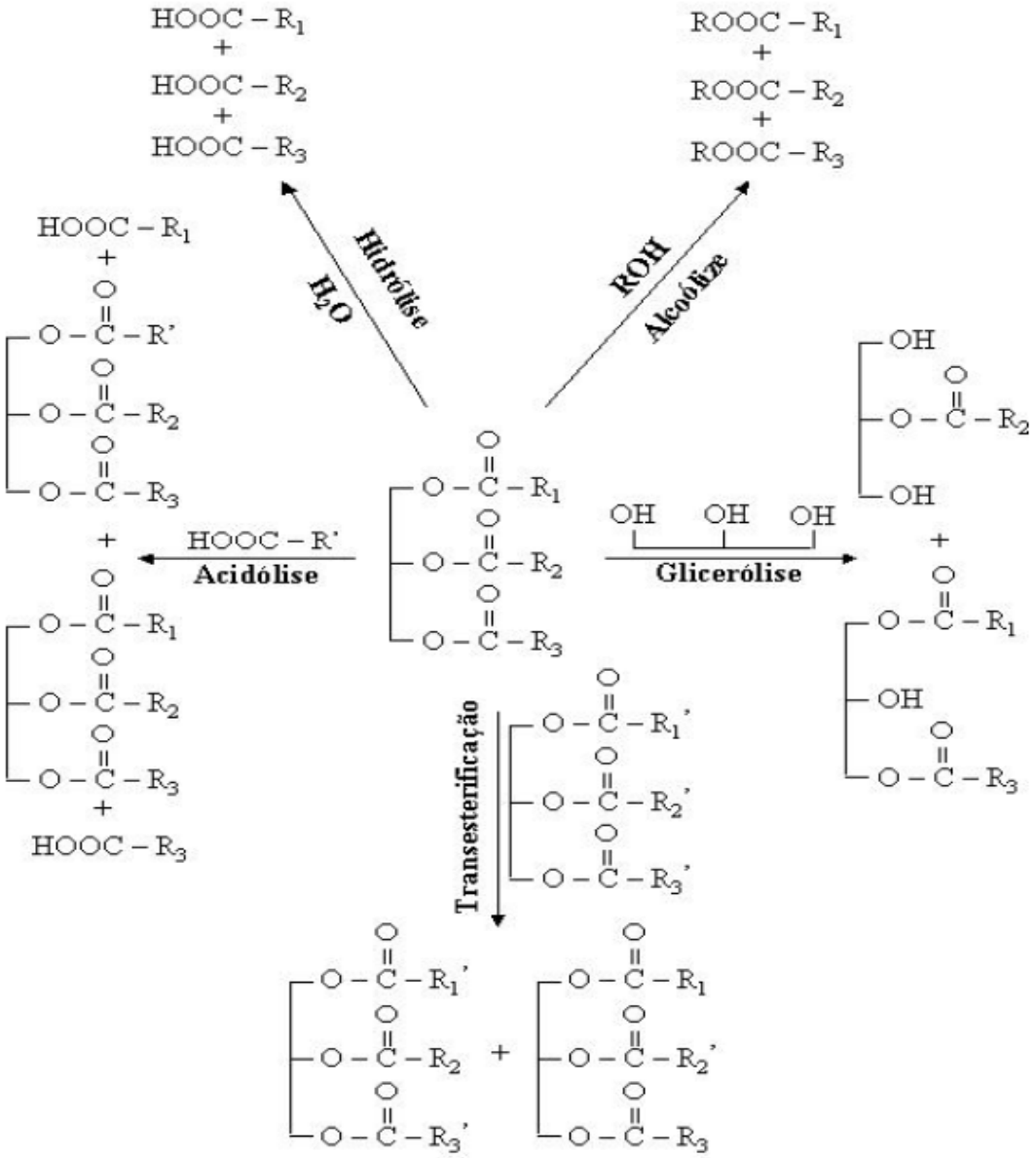
Dependendo do reagente de partida, as lipases podem catalisar reações de acidólise, alcoólise ou interesterificação, bem como reações de aminólise, tiotransesterificação, lactonização e peroxidação, em solventes orgânicos, com elevada seletividade (CASTRO *et al.*, 2004 e DALLA-VECCHIA *et al*., 2004). A Figura 6 apresenta algumas dessas reações que podem ser catalisadas por lipases.

Em geral, as lipases possuem peso molecular entre 19kDa (lipase de *Bacillus subitllis*) e 97 kDa (lipase de *Aeromonas sobria*), a excessão da lipase de *Candida deformans* que apresenta peso molecular de 207kDa (CYGLER *et al*., 1997).

A diferença entre as "verdadeiras" lipases (carboxilesterases) e outras hidrolases, como as esterases, está na forma de atuação. As esterases catalisam a hidrólise de ácidos graxos hidrossolúveis de cadeia curta (menos de 10 átomos de carbono), enquanto que as lipases são mais seletivas para substratos de cadeia longa (mais de 10 átomos de carbono) e atuam na interface entre o substrato e a água (JAEGER *et al.,* 2002 e MESSIAS *et al*.,2011). Em triglicerídeos de cadeia longa atuam na interface água-lipídio, fenômeno conhecido como ativação interfacial. As lipases, em sua maioria, possuem uma tampa hidrofóbica que na ausência de substratos permanece apoiada sobre o sítio catalítico. Quando interage

com o substrato, essa tampa se abre e ocorre a ligação lipase-substrato (JAEGER *et al*., 1998 e GHANEM, 2007).

Figura 6- Reações catalisadas por lipases.



Fonte: CASTRO *et al*., 2004.

Os triglicerídeos de cadeia longa são os principais substratos para as lipases, porém essas enzimas são capazes de atuar sobre uma ampla gama de substratos

não-naturais (ésteres não-lipídicos) e de diversos tamanhos. As lipases não necessitam de cofatores e, em geral, apresentam quimiosseletividade (atuação sobre um grupamento químico específico), regiosseletividade (distinção entre grupos funcionais situados em diferentes regiões na mesma molécula do substrato) e enantiosseletividade (capacidade de distinguir compostos quirais) (MESSIAS *et al*., 2011).

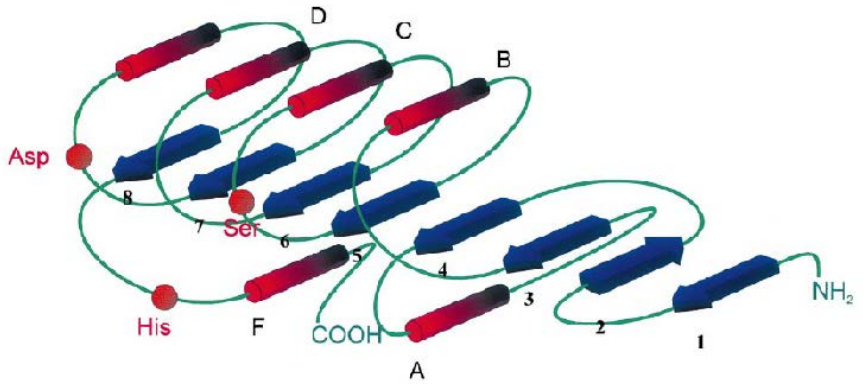
Lipases de diferentes fontes podem apresentar diferentes especificidades quanto ao substrato. A maioria das lipases apresenta regioespecificidade, sendo divididas em dois grupos: sn-1,3-específicas, que hidrolisam as ligações éster nas posições sn-1 e sn-3 do glicerol, e as não específicas ou aleatórias, que agem nas três posições (TONGBORIBOON *et al.*, 2010).

A estrutura das lipases consiste em um enovelamento conhecido como dobramento de α/β hidrolase, seu núcleo é composto por uma superfície central β (de β1 a β8) conectadas por α hélices (de α1 a α6) e seu sitio ativo é formado por três resíduos catalíticos, um resíduo nucleofílico (serina, cisteína ou aspartato), que é responsável pela catálise unido por ligações de hidrogênio a um resíduo carboxilado (histidina), que também está ligado a um resíduo ácido (aspartato ou glutamato), esta estrutura está representada na Figura 7 (JAEGER *et al*., 1999; TAIPA et al., 2003 ; BUCHHOLZ *et al*., 2005; BORNSCHEUER,2002).

Apesar da semelhança topológica entre as lipases, o entrelaçamento das fitas β e a posição das α-hélices podem variar consideravelmente de uma lipase para outra (BRIGIDA, 2010).

Além desta região que compõe o sítio ativo, existe também uma estrutura anfipática móvel chamada tampa hidrofóbica ou *lid*, que cobre o sítio ativo catalítico da maioria das lipases. Durante a interação da lipase com o substrato, ocorre uma mudança conformacional na estrutura da enzima, essa tampa se abre expondo o sítio ativo e favorecendo a ligação com o substrato (GHANEM *et al*., 2007; DALLA-VECHIA *et al*., 2004).

Figura 7- Representação do dobramento α/β hidrolase.



Legenda: As fitas β são representadas pela seta azul, as α hélices são representadas pelo cilindro vermelho. Os aminoácidos são representados pelas esferas vermelhas.
Fonte: BORNSCHEUER,2002.

O fato de a maior parte das lipases serem ativadas na interface água/lipídio proporcionou o desenvolvimento de metodologias de estudo da ativação interfacial, fenômeno que foi por muito tempo relacionado à presença da tampa hidrofóbica nas lipases. Porém, alguns estudos revelaram que a presença da estrutura em forma de tampa não está correlacionada com a ativação interfacial (CYGLER *et al*., 1997; YAO *et al*., 1994; JAEGER *et al*., 1998). Lipases de origem microbiana como *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia glumae* e *Candida antarctica B* e uma lipase pancreática não específica não demonstraram ativação interfacial, embora apresentem uma “tampa” anfifílica cobrindo seus sítios ativos. Sendo assim, a presença de uma tampa e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como a lipase (JAEGER *et al*., 1998), justificando a definição para verdadeiras lipases como sendo aquelas que hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa.

Outra característica estrutural importante das lipases é a cavidade do oxiânion, região eletrofílica formada pela abertura da tampa, responsável pela estabilização das cargas negativas do intermediário tetraédrico durante o estado de transição. As lipases que não possuem uma tampa helicoidal, como por exemplo, a lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, apresentam a cavidade do oxiânion pré-formado (BALCÃO *et al.*, 1996; PAIVA *et al*., 2000; ALOULOU *et al*., 2006).

2.2.2. Fontes de Obtenção

As lipases podem ser obtidas a partir de micro-organismos, plantas ou tecido animal, sendo as de origem microbiana as mais utilizadas em função de altos rendimentos, facilidade de manipulação genética, ausência de variações sazonais e ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios de cultivo com o custo relativamente baixo (MEDINA *et al*., 2009 ; KADEMI *et al*., 2005).

As bactérias, fungos filamentosos e leveduras estão dentre os micro-organismos produtores de lipases e podem ser encontrados em efluentes industriais, fábricas de processamento de óleo vegetal, indústria de laticínios, solos contaminados com óleo, óleos de sementes e alimentos em decomposição (SHARMA *et al*., 2001).

A produção industrial de lipases é feita em sua maioria por fermentação submersa (FS), onde os meios de cultivo são líquidos e contêm diversos nutrientes solubilizados (KADEMI *et al*., 2005) . Outro tipo de fermentação utilizada para produção de lipases é a fermentação em estado sólido (FES), que envolve o crescimento dos micro-organismos utilizando substratos insolúveis com baixo percentual de água em sua composição, atuando como fonte de nutrientes e suporte fisiológico (KADEMI *et al.*, 2005; MESSIAS *et al*.,2011).

A vantagem da utilização da FS está na homogeneidade do sistema possibilitando a transferência de calor de maneira eficiente, somado a isso, a facilidade de controlar parâmetros operacionais importantes ao processo como pH, temperatura e oxigenação. Já na FES, o meio de cultivo não é homogêneo, o que dificulta a transferência de massa. Além disso, o monitoramento dos parâmetros operacionais é mais difícil. Por outro lado, o processo de FES é mais barato, uma vez que podem ser empregados substratos de baixo custo como resíduos agroindustriais, por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar, possibilitando assim seu emprego em escala industrial (MESSIAS et al., 2011).

As propriedades físico-químicas das lipases podem variar em função das características do micro-organismo produtor e de diferenças cinéticas entre duas ou

mais isoenzimas produzidas pela mesma espécie. Existem duas categorias principais de lipases, as lipases extracelulares, que são produzidas e secretadas pelo microrganismo vivo e as lipases intracelulares, que permanecem aderidas na parede das células produtoras ou em seu citoplasma (MEDINA *et al*.,2009).

2.2.2 *Yarrowia lipolytica*

Inicialmente conhecida como *Candida lipolytica*, a levedura *Yarrowia lipolytica* é um micro-organismo aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetes, subclasse Hemiascomicetes, quando comparada a leveduras mais conhecidas como *Saccharomyces cerevisiae*, apresenta diferenças em sua fisiologia, genética e biologia molecular por isso foi classificada como levedura "não-convencional". Geralmente é encontrada em ambientes que contenham fontes de carbono lipídicas, como é o caso de ambientes poluídos, laticínios, flora de queijos picantes e produtos avícolas crus (AMARAL, 2007).

É considerada um micro-organismo não patogênico e seu emprego é classificado como seguro segundo as normas da *Food and Drug Administration* (FDA, USA); é industrialmente utilizada para a produção de ácido cítrico e aroma de pêssego (COELHO *et al*., 2010 e BRAGA, 2009).

Yarrowia lipolytica é uma das leveduras "não convencionais" mais estudadas, apresenta uma importante característica estrutural, o dimorfismo, que é a capacidade de alternar reversivelmente entre duas formas morfológicas a de hifas e a ovóide. Acredita-se que o dimorfismo em leveduras está associado ao mecanismo de defesa a condições adversas, como temperatura e mudanças na disponibilidade de nutrientes do meio (COELHO *et al*., 2010 ; BATH *et al.*, 1997).

Sua particular habilidade em degradar substratos hidrofóbicos de maneira eficiente faz desta levedura um modelo de produção de óleo microbiano (BEOPOULOS *et al*.,2009).

O grande interesse na utilização desta espécie em escala industrial se deve a sua capacidade em utilizar uma ampla gama de substratos como fonte de carbono, dentre eles a glucose, álcoois, acetato e substratos hidrofóbicos (BATH *et al.*, 1997) e a sua capacidade de excretar vários metabólitos de interesse, entre eles se destacam ácido cítrico, proteases, lipases, estearases, fosfatases, RNases e as lactonas. Apresenta capacidade surfactante e sua habilidade em degradar compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos é acompanhada pela produção desses surfactantes (BATH *et al*., 1997; AMARAL, 2007; COELHO et *al*.,2010; BRIGIDA, 2010).

Dentre os metabólitos excretados por *Yarrowia lipolytica* estão uma grande variedade de ácidos orgânicos como ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido α-cetoglutárico e ácido pirúvico, sendo as fontes de carbono utilizadas para este processo n-alcanos, óleos vegetais, etanol e as fontes de nitrogênio tiamina, fosfato e compostos minerais como fósforo, magnésio e enxofre (COELHO *et al*., 2010 ; BATH *et al*., 1997).

Por ser estritamente aeróbio, seu crescimento, sua capacidade de excretar metabólitos e de acumulação de lipídios podem ser afetados dependendo da disponibilidade de oxigênio e do substrato utilizado no meio de cultura (AMARAL, 2007 e BRAGA, 2009; KATRE *et al*., 2012).

Devido a sua capacidade em hidrolisar gorduras, muitos trabalhos têm sido realizados visando a produção de lipases de *Yarrowia lipolytica,* (DOMINGUEZ *et al*., 2003 ; OTA *et al*., 1982; CORZO *et al*., 1999 ; PEREIRA *et al*., 2000; DESTAIN *et al*., 1997; AMARAL, 2007), que podem ser extracelulares ou intracelulares, sendo a concentração das lipases dependente da fase de crescimento em que o micro-organismo se encontra (BRIGIDA, 2010). Pereira *et al*. (2000) verificaram que nas primeiras 24 horas de reação não havia produção de lipase extracelular, apresentando um máximo no final da fase estacionária.

Dependendo das condições do meio de cultura, esta levedura pode utilizar ou acumular ácidos graxos como triacilgliceróis, sendo capaz de acumular significativas quantidades (mais de 20% de sua biomassa) e, desta forma, é considerada uma *single cell oil* (COELHO *et al*., 2010).

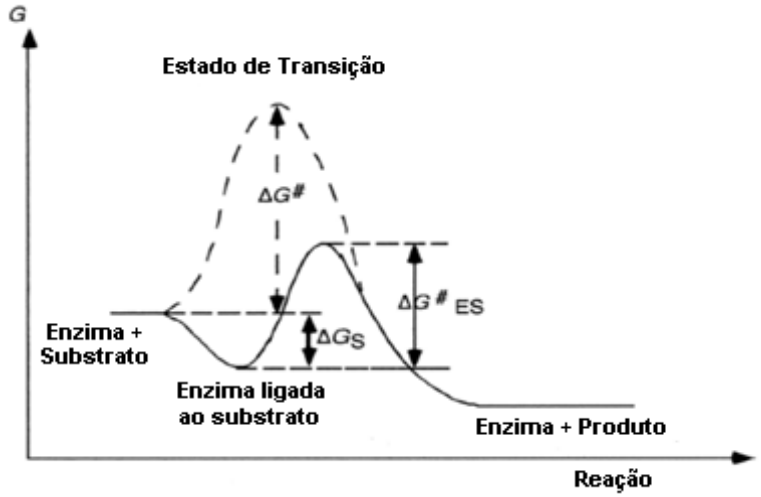
As lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica* são consideradas lipases com elevada atividade quando utilizadas em reações de hidrólise, esterificação e transesterificaçao. São classificadas como glicoproteínas 1,3 específicas, com massa molecular variando entre 38,5 e 44kDa, cuja faixa de pH no qual se observa atividade hidrolítica situa-se entre 6 a 10. A temperatura ótima de reação varia entre 28 e 55°C (HOU, 1997; GUIEYSSE *et al*., 2004; BRIGIDA, 2010; ALOUALOU *et al*., 2007). Os valores ótimos de pH e temperatura estão diretamente relacionados às condições reacionais, portanto, podem variar de um estudo para outro dificultando a comparação entre as lipases obtidas.

2.2.3. Catálise e Atividade Enzimática

Assim como os catalisadores químicos, as enzimas aceleram a velocidade da reação por meio da redução da energia livre de ativação envolvida na conversão de substrato a produto. A velocidade da reação é inversamente proporcional ao valor da energia de ativação, ou seja, quanto maior a energia de ativação menor a velocidade da reação (BUCHHOLZ *et al*., 2005). Os catalisadores não afetam o equilíbrio da reação (LEHNINGER *et al*., 2002; VOET *et al*., 2008 ; BUCHHOLZ *et al*., 2005).

As reações químicas biocatalisadas ocorrem entre o substrato e os grupos funcionais presentes nas cadeias laterais de aminoácidos que constituem o sítio ativo das enzimas, as interações entre eles são altamente específicas e levam a formação de uma ligação covalente transitória. Para que ocorra a catálise, as moléculas dos substratos presentes no meio reacional devem colidir com quantidade de energia suficiente e orientação favorável, podendo haver formação de cargas instáveis, rearranjos de ligações e outras transformações necessárias para formação de um complexo ativado (enzima-substrato) conhecido como estado de transição, a barreira energética que separa a energia dos substratos deste complexo ativado é denominada energia de ativação (Figura 8) (BUCHHOLZ *et al*., 2005 ; TAIPA *et al*., 2003).

Figura 8- Diagrama de energia livre.



Legenda: Reações não catalisadas (--) e de reações catalisadas (—). A energia de ativação ($\Delta G^{\#}_{ES}$-ΔG_S) para reação catalisada é menor que a energia de ativação ($\Delta G^{\#}$) para reações não catalisadas
Fonte: LEHNINGER *et al.*, 2002.

A totalidade das ligações estabelecidas entre a enzima e o substrato configura o estado de transição. A formação de cada interação fraca no complexo enzima-substrato é acompanhada por uma pequena liberação de energia livre (energia de ligação) que garante estabilidade para a interação e supre parcialmente a energia necessária para atingir o estado de transição. A maior parte do poder catalítico das enzimas se deve a liberação desta energia livre (LEHNINGER *et al.*, 2002; BUCHHOLZ *et al.*, 2005).

Após a formação do estado de transição, as ligações entre a enzima e o substrato são rearranjadas, algumas são quebradas e outras são formadas, o substrato é então transformado em produto que será liberado juntamente com a enzima regenerada.

A capacidade da enzima em catalisar uma reação sob determinadas condições é denominada atividade enzimática e pode ser medida seguindo ao longo do tempo o aparecimento de produtos ou o desaparecimento de substratos. Por convenção é expressa em unidade de atividade (U), que corresponde a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de produto por minuto ou consumo de 1 µmol de substrato por minuto (MENOCIN *et al.*, 2009 ; TORRES, 2001).

A determinação da atividade das lipases tem sido feita através da quantificação dos ácidos graxos liberados durante reações de hidrólise empregando a enzima. A quantificação do consumo de substrato pode ser feita utilizando a nefelometria e a turbidimetria, a tensiometria interfacial, a microscopia de força atômica e a espectroscopia de infravermelho. Já a formação de produtos pode ser quantificada através de ensaios indiretos da liberação de prótons (indicadores coloridos e titulometria), análise de ácidos graxos liberados a partir de ésteres carboxílicos derivados do glicerol (ensaios colorimétricos, fluorimétricos, cromatográficos, enzimáticos, microscopia eletrônica por detecção *in situ*) e análise de ácidos graxos liberados a partir de ésteres carboxílicos sintéticos (ensaios radioativos, colorimétricos, fluorimétricos) e métodos imunológicos, entre outros (MESSIAS *et al*., 2011).

Os substratos geralmente empregados em reações de hidrólise visando a determinação da atividade enzimática são: trioleína, óleo de oliva, p-nitrofenol palmitato, butirato ou laurato (BRIGIDA, 2010).

A titulação de ácidos graxos liberados pela hidrólise de triglicerídeo do ácido butírico, ou de óleos insaturados de cadeia longa como o óleo de oliva, é a metodologia mais utilizada atualmente (BRIGIDA, 2010). Nesta, o substrato é preparado por uma emulsão do óleo de oliva com goma arábica. Os catalisadores enzimáticos utilizados devem ser previamente incubados a temperatura de 37°C e a reação é interrompida adicionando-se solução de acetona e etanol 1:1. Os ácidos graxos liberados são titulados com KOH. Para este procedimento, uma unidade de atividade (expressa em µmol/mg.min) é definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio, sendo que mg refere-se à massa de sólido para a lipase livre ou a massa de suporte seco para a lipase imobilizada.

Outra metodologia muito usada para a determinação da atividade hidrolítica de lipases é a reação de hidrólise do p-nitrofenil laurato, que se baseia na formação do produto cromóforo p-nitrofenol. O meio reacional é constituído por uma solução de p-nitrofenil laurato em tampão de fosfato de sódio (pH 7,0), a 37°C. O acompanhamento da reação é feito a partir de leituras da absorvância em intervalos

de 1 minuto utilizando um espectrofotômetro a 410 nm (AMARAL, 2007). A atividade em U/mL (para soluções enzimáticas) ou U/mg (para enzimas liofilizadas) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1,0 µmol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio.

A capacidade catalítica das lipases pode variar de acordo com as condições do meio reacional como pH, temperatura, pressão, presença de inibidores. Esses parâmetros podem afetar a estrutura e a forma do sito ativo da enzima, portanto, devem ser estudados caso a caso, para se otimizar o potencial desse catalisadores (CORZO *et al*., 1999; BUCHHOLZ *et al*., 2005; ABRIL, 2012; TAIPA *et al*., 2003 ; TORRES, 2001; ARAUJO, 2009).

Conforme dito anteriormente, as cadeias laterais das enzimas são constituídas por aminoácidos que possuem grupos químicos ionizáveis que podem fazer parte do sítio ativo sendo importantes na manutenção da estrutura da molécula, a alteração do pH pode causar alterações conformacionais na molécula do biocatalisador. Dependendo do pH do meio reacional esses grupos podem se apresentar de forma protonada ou desprotonada. Existe um valor ótimo de pH no qual a formação do complexo enzima-substrato é favorecida e o valor da atividade enzimática é máximo, este é chamado pH ótimo e leva a molécula da enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico (BUCHHOLZ *et al*., 2005; TAIPA *et al*., 2003 ; TORRES, 2001; ARAUJO, 2009).

A atividade ótima da maioria das lipases ocorre em pH entre 6,0 e 8,0, nessa faixa, elas se mostram também mais estáveis, porém algumas lipases apresentam atividade ótima em pH ácido e outras em pH alcalino (FREIRE *et al*., 1997).

Em geral, o aumento da temperatura leva a um aumento na velocidade da reação, o que pode ser explicado pela maior quantidade de choques efetivos entre as moléculas com a conseqüente elevação da energia cinética do sistema reacional. Porém, no caso de catalisadores enzimáticos, temperaturas muito elevadas podem levar à desnaturação da enzima devido ao rompimento das ligações de hidrogênio, que são termolábeis e sucessivas alterações estruturais, desta forma, a enzima perde sua estrutura nativa catalítica e é dita desnaturada (ARAUJO, 2009; TAIPA, *et al*., 2003 ; TORRES, 2001; GOMES *et al*., 2009).

A maior parte das lipases apresenta temperatura ótima de atuação na faixa de 30 a 40°C, exceto lipases provenientes de fungos termófilos, que são estáveis a temperaturas maiores que 55°C (FREIRE *et al.*, 1997).

2.2.4. Ativação interfacial

Através das informações estruturais obtidas utilizando métodos de purificação, seqüenciamento, expressão genética, clonagem, cristalização e cristalografia de raio-x, foi possível determinar o sítio ativo catalítico das lipases e compreender a ativação interfacial, fenômeno com um importante papel nas reações catalisadas por lipases, uma vez que ocorrem na interface água/lipídio, tanto a qualidade quanto a área interfacial têm papel importante na atividade catalítica dessas enzimas (SARDA *et al*., 1958; BALCÃO *et al*., 1996; PAIVA *et al*., 2000).

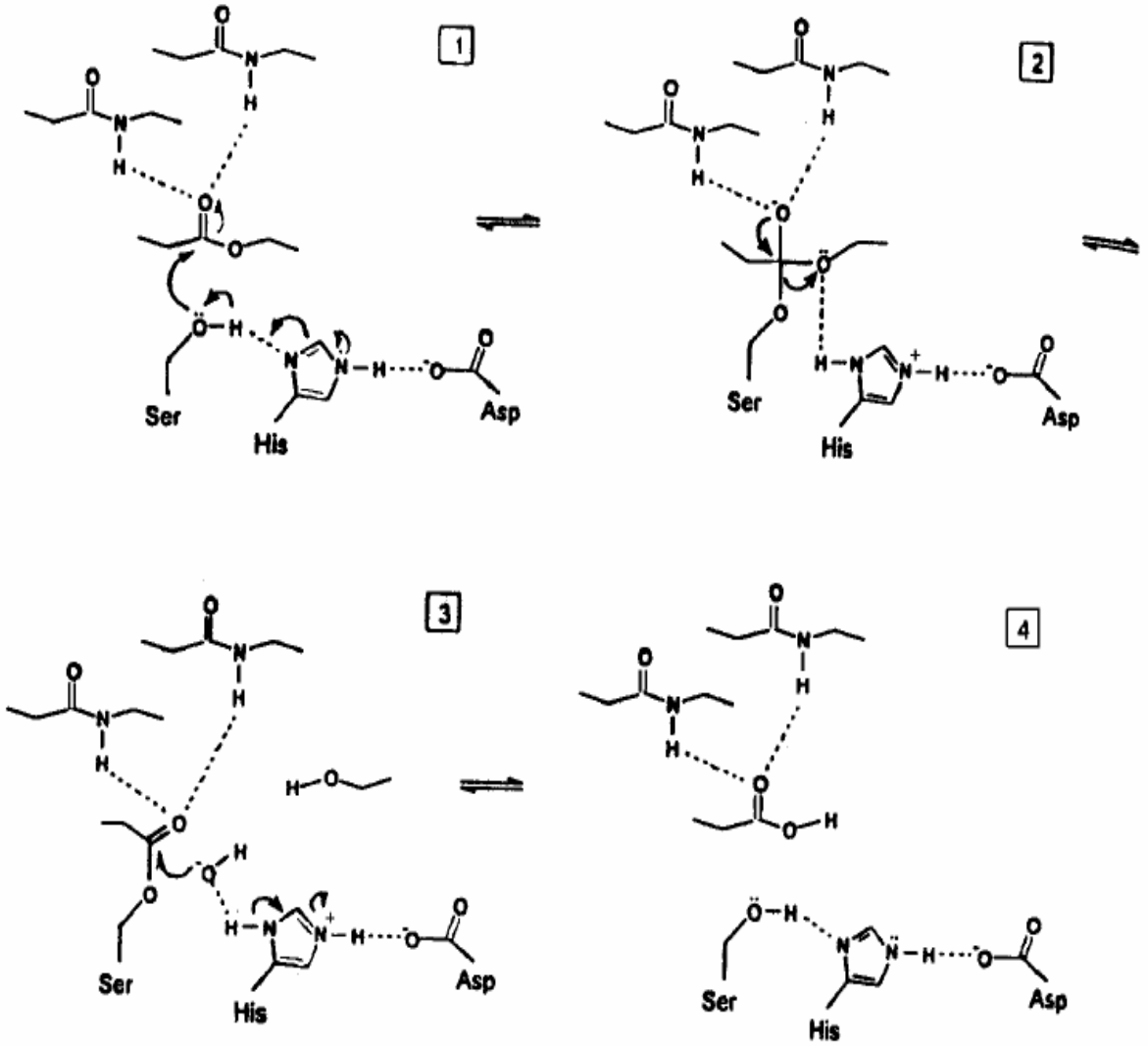
A ativação interfacial relaciona o aumento da atividade da lipase com a quantidade de substratos insolúveis presentes no meio em forma de emulsão, este fenômeno foi proposto em 1958 por Sarda e Desnuelle após verificarem a que as enzimas apresentavam comportamento cinético diferentes. Eles observaram que a atividade das esterases era função da concentração do substrato e seguia o modelo cinético de Michaelis e Menten, onde a atividade máxima da reação ocorre antes do limite de solubilidade do substrato ser atingido, diferentemente do que ocorria com a atividade das lipases, que era mantida constante até a concentração micelar crítica (CMC) do substrato ser atingida e aumentando a partir esse ponto. Os pesquisadores concluíram então, que as lipases não seguiam o mesmo modelo cinético das esterases (JAEGER *et al*., 1998 ; BRIGIDA, 2010; ALOUALOU *et al*., 2006).

A cinética das reações biocatalisadas está diretamente relacionada ao modo em que os substratos lipídicos estão organizados, dependendo das condições, podem aparecer em estruturas interfaciais como bicamadas, monocamadas, micelas, vesículas ou emulsões. Geralmente os substratos lipolíticos formam um

equilíbrio entre os estados monoméricos, micelar e emulsificado e existe uma relação entre a atividade da enzima e a presença de substratos insolúveis que formam emulsão, resultando na necessidade de um modelo de sistema adequado ao estudo da cinética da lipase, uma vez que em alguns casos a cinética reacional não segue o modelo de Michaelis-Menten que é válido para reações em fase homogênea (JAEGER *et al*., 2002; SHARMA *et al*., 2001 ; VOET *et al*., 2008; TAIPA *et al*., 2003).

A ação das lipases é descrita pelo mecanismo cinético Ping Pong Bibi (Figura 9) que ocorre em duas etapas, na primeira ocorre um ataque nucleofilico na ligação éster do substrato pelo oxigênio presente no resíduo serina, dando origem a um complexo enzimático acilado e liberação de um álcool do substrato, este complexo vai sofrer hidrólise na segunda etapa do mecanismo resultando na regeneração da enzima (JAEGER *et al*., 1999; PAIVA *et al*., 2000; VOET *et al*., 2008; TAIPA *et al*., 2003).

Figura 9- Mecanismo de atuação das lipases.



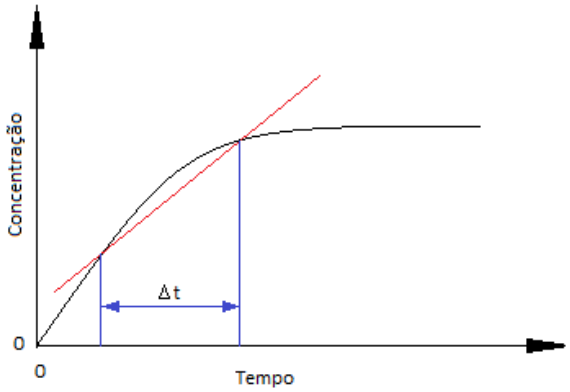
Legenda: [1] Ligação do lipídio do resíduo serina pelo vizinho histidina seguida pelo ataque nucleofílico do carbono do grupo carbonil do substrato pelo O^- da serina; [2] Formação do intermediário tetraédrico com O- estabilizado pela interação com dois grupos NH de peptídeos. A hsitidina doa um próton para o componente álcool que deixa o substrato; [3] Intermediário covalente no qual o componente ácido do substrato encontra-se esterificado com o resíduo seina da enzima. A molécula de água que se aproxima é ativada pelo resíduo histidina e o íon hidroxil resultante promove a taque nucleofílico no átomo de carbono carbonil do intermediário covalente; [4] O resíduo histidina doa um próton para o átomo de oxigênio do resíduo serina ativo, a ligação éster entre a serina e o componente acil é quebrada e o produto liberado.
Fonte: JAEGER *et al*., 1999.

2.2.5. Cinética Reacional

O estudo da cinética das reações enzimáticas é a avaliação quantitativa dos fatores que influenciam na atividade da enzima. Neste, o aumento ou redução da taxa (velocidade) da reação é avaliado através da variação dos parâmetros reacionais. Sendo a atividade enzimática influenciada por fatores como: a concentração da enzima, pH , temperatura do meio reacional e presença de inibidores.

A concentração de substrato presente no meio reacional é um fator determinante na velocidade da reação catalisada por enzimas, porém essa concentração varia ao longo da reação dificultando o estudo desta influência, no instante inicial da reação, pode-se considerar que a concentração do substrato não varia consideravelmente e que concentração da enzima é desprezível e verifica-se que as concentrações das espécies intermediárias (complexo enzima-substrato) aumentam até valores que tomam o estado estacionário, neste ponto a velocidade da reação varia mais lentamente ao longo do tempo (Figura 10).

Figura 10- Curva de progressão de uma reação enzimática



Fonte: Adaptado de TAIPA *et al.*, 2003.

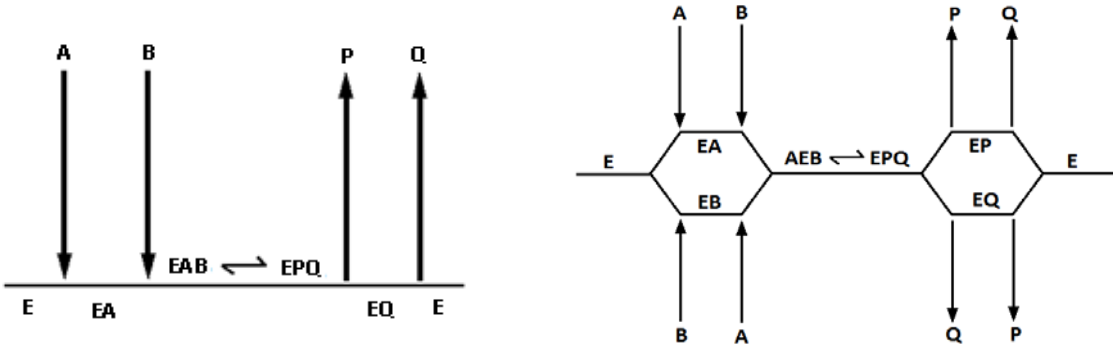
A velocidade inicial da reação é igual ao coeficiente angular da tangente á curva no ponto t=0. Nos instantes iniciais, não é necessário considerar a concentração de produto formado, uma vez que a concentração do substrato é praticamente igual à concentração inicial e a concentração de produto é próxima de zero (TAIPA, *et al*. 2003).

As reações de esterificação catalisadas por lipases ocorrem na interface água/lipídio e envolvem a utilização de dois ou mais substratos podendo dar origem a múltiplos produtos. As reações que envolvem dois substratos e produzem dois produtos representam cerca de 60% das reações biocatalisadas e em sua maioria ocorrem com a transferência de grupo funcional de um dos substratos para o outro ou como reações de oxi-redução, nas quais grupos redutores são transferidos entre dois substratos. O mecanismo dessas reações vai ser determinado pela ordem com que a lipase irá se ligar ao substrato (MOSIER *et al*., 2009 ; VOET *et al*., 2008), sendo os mais observados aqueles nos quais ocorrem as reações ditas seqüenciais onde todos os substratos devem se ligar a enzima antes que a reação ocorra e os produtos sejam liberados e as reações de Ping Pong que envolvem transferência de grupos nas quais um ou mais produtos são liberados antes que todos os substratos sejam adicionados a enzima (VOET *et al*., 2008 ; BUCHHOLZ *et al*., 2005).

As reações sequenciais são subclassificadas em ordenadas, na qual a ligação do primeiro substrato é necessária para que a enzima adquira um sito de ligação para se ligar ao segundo substrato (Figura 11 a) e aleatória na qual a enzima livre apresenta dois sítios de ligação, permitindo a ligação dos substratos sem ordem definida (Figura 11 b).

As reações de esterificação catalisadas por lipases seguem o mecanismo Ping Pong BiBi (Figura 12) que consiste em reações de substituição dupla onde um grupo funcional ligado ao primeiro substrato é removido pela enzima para produzir o primeiro produto e uma forma estável da enzima que permanece ligada ao grupo funcional proveniente do primeiro substrato. No segundo estágio da reação o grupo funcional ligado a enzima é retirado pelo segundo substrato para formar o segundo produto, regenerando a forma original da enzima (VOET *et al*., 2008 ; BUCHHOLZ *et al*., 2005).

Figura 11- Notação de Cleland para os mecanismos de reações seqüenciais.

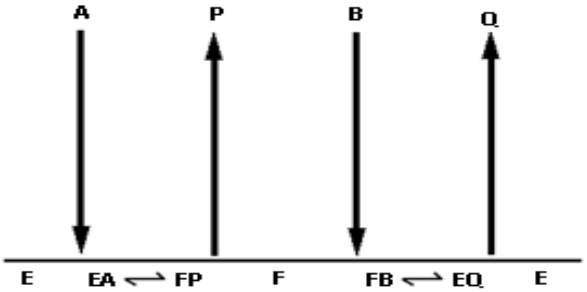


a) Mecanismo ordenado. b) Mecanismo aleatório.

Legenda: Os substratos são representados por A e B na ordem em que irão se ligar a enzima representada por E, as adições sucessivas dos substratos e as formações de produtos P e Q são representadas pelas setas verticais.

Fonte: VOET *et al*., 2008.

Figura 12.Notação de Cleland para o mecanismo de reações Ping Pong BiBi.



Legenda: Um grupo funcional X do primeiro substrato A é removido pela enzima E para produzir o primeiro produto P e uma forma estável da enzima F na qual X está ligado. No segundo estágio X é retirado da enzima por um segundo substrato B para produzir um segundo produto Q, regenerando a forma original da enzima, E.

Fonte: VOET *et al*., 2008.

2.2.6. Catálise em meios não convencionais

Reações catalisadas por enzimas, em geral, utilizam água como solvente, a atividade catalítica e as propriedades do biocatalisador são muito influenciadas pela quantidade de água ligada a enzima. A água é necessária no meio reacional mesmo quando ele é composto apenas por solvente orgânico e substratos, uma vez que suas moléculas são essenciais para promover interações que permitem o dobramento da proteína em sua estrutura tridimensional nativa, cataliticamente ativa (MA *et al*., 2002 ; GAYOT *et al*., 2003; ADLERCREUTZ, 2008).

No entanto, é muito difícil quantificar a quantidade de água que permanece ligada à enzima, mesmo após esta ser submetida a um intenso processo de secagem. A enzima é muito influenciada pela atividade termodinâmica da água, que pode ser medida por sensores ou soluções saturadas de sais. A atividade da água é definida como a razão entre a pressão de vapor na amostra (p_w) e a pressão de vapor na água pura (p_w^0), sua determinação é o método mais aceito para quantificar a quantidade de água presente em meios reacionais não aquosos e é expressa em termos de atividade (a_w), valor situado entre 0 e 1, sendo que na a_w= 1 já existe uma fase aquosa distinta e pura (KVITTINGEN *et al*., 1992; ADLERCREUTZ, 2008).

Diferentes enzimas requerem diferentes valores de atividades de água, para a maioria das lipases os melhores resultados são obtidos com valores de a_w entre 0,25 e 0,45, desta forma, o controle da hidratação da enzima é a chave para se conseguir uma boa conversão em reações em meio orgânico biocatalisadas (VILLENEUVE, 2007; ADLERCREUTZ, 2008).

O uso exclusivo da água como solvente limita a produtividade em processos que envolvem substratos hidrofóbicos. As enzimas podem operar *in vivo* em ambientes ricos em lipídios hidrofóbicos o que torna os meios não convencionais adequados ao estudo da atividade catalítica enzimática (AIRES-BARROS *et al*., 2003).

Os meios não convencionais têm como característica uma menor quantidade de água disponível e compreendem solventes diversos como solventes orgânicos,

fluidos supercríticos, fases gasosas ou sólidas e líquidos iônicos (AIRES-BARROS *et al*., 2003).

O solvente é um dos fatores que mais influenciam a atividade das lipases em meio orgânico, sendo assim, a escolha de um solvente adequado é muito importante (VILLENUEVE, 2007). Os principais critérios a serem utilizados na seleção de um solvente incluem fatores físico-químicos como o coeficiente de partição (capacidade de extração), capacidade em solubilizar os substratos e/ou produtos, densidade e ponto de ebulição, que vão determinar a facilidade de separação das fases e a transferência de massas e fatores de segurança, o solvente não deve apresentar toxicidade ambiental nem ser prejudicial a saúde e não deve ser inflamável, também não deve ser tóxico ao biocatalisador, somado a isso, deve ser de fácil obtenção e de baixo custo (AIRES-BARROS *et al*., 2003).

Em suma, deve-se selecionar um solvente inerte no qual os substratos sejam solúveis e a enzima seja ativa e não seja rapidamente desativada. Os solventes mais utilizados são os que apresentam valores de log de P (coeficiente de partição) altos como o n-hexano e o n-heptano, no entanto, em reações envolvendo dois substratos de polaridades muito diferentes os solventes de polaridade média são mais adequados (VILLENUEVE, 2007).

Os solventes orgânicos hidrofóbicos protegem as enzimas da desnaturação por altas concentrações de álcoois como metanol e etanol, quando esses são substratos da reação. Já os solventes orgânicos hidrofílicos interagem fortemente com a camada essencial de água que envolve a enzima, desnaturando-a (ANTCZAK *et al*., 2009), mas podem levar a altas conversões por se misturar ao álcool quando esse é um dos substratos, reduzindo sua concentração ao redor da enzima e evitando a desnaturação (FU *et al*., 2009).

Dentre as principais vantagens na utilização dos meios não convencionais estão: a maior solubilidade de substratos e/ou produtos hidrofóbicos, permitindo o desenvolvimento de processos com produtividade volumétrica elevada; redução de efeitos inibitórios causados por substratos e /ou produtos com a seleção do solvente de modo que ele funcione como diluente reduzindo a concentração interfacial e na fase aquosa de substratos e produtos; a fácil recuperação dos substratos e produtos

devido ao baixo ponto de ebulição da maioria dos solventes; o deslocamento do equilíbrio termodinâmico favorecendo reações de síntese através do controle da atividade da água, principalmente quando são utilizadas hidrolases, que em meio aquoso catalisam reações de hidrólise; aumento de sua estabilidade térmica da enzima (a desnaturação requer água); a redução ou eliminação de reações laterais causada pela água, melhorando a seletividade da enzima; facilidade na recuperação do biocatalisador entre outras (AIRES-BARROS *et al*., 2003; KRIEGER *et al*., 2004; BARON *et al*., 2005).

Por outro lado a utilização de meios não convencionais apresenta algumas desvantagens como: a toxicidade de alguns solventes; aumento das limitações difusionais à transferência de massa de substratos e produtos, uma vez que se introduz uma fase (orgânica) além da fase aquosa e da fase sólida (biocatalisador imobilizado); possibilidade de formação de emulsões estáveis devido aos efeitos interfaciais; problemas na etapa de recuperação do produto devido a presença de muitas áreas interfaciais entre outros (AIRES-BARROS *et al*., 2003).

Outro tipo de catálise em meio não convencional é a que ocorre em um meio reacional constituído apenas pelos substratos da reação e o biocatalisador livre, sendo isento de cossolvente. A vantagem desse sistema está na maximização da concentração dos substratos, evitando o custo do solvente inerte e da sua remoção no final da reação, o que torna esse processo mais vantajoso economicamente e menos impactante ao meio ambiente (ZNIDARSIC, 2009). Este tipo tem sido empregado com bons rendimentos (acima de 92%) para reações de esterificação (CHANG *et al*., 2007 ; GIRALDO *et al*., 2007 ; ABDULLAH *et al*., 2009) e reações de esterificação para produção de biodiesel (ISSO *et al*., 2001; SALIS *et al*., 2005 ; HAJAR *et al*., 2009, CORREA *et al*., 2011).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os extratos enzimáticos líquido e o liofilizado contendo a lipase de *Yarrowia lipolytica* utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Laboratório Engenharia de Sistemas Biológicos da UFRJ. Estes extratos foram obtidos por fermentação submersa de *Y. lipolytica* em meio contendo extrato de lêvedo (1% m/v), peptona (0,64% m/v), glicose (2% m/v) e agar-agar (3% m/v), com concentração inicial de células de 1,0 g/L, temperatura de cultivo de 28°C e vazão de oxigênio de 1,5L/min.

O extrato liofilizado, foi preparado à partir do extrato enzimático líquido, que permaneceu cerca de 48 horas em liofilizador, foi condicionado em tubos falcon e, posteriormente transferido para um dessecador.

O Preparado Enzimático Sólido (PES), fornecido pelo mesmo laboratório, foi preparado em reatores tipo bandeja, contendo 10g de rejeito de torta de soja formando um leito de aproximadamente 1 cm de altura, com umidade de 58% m/m e 4% m/m de borra de soja no meio produtivo. Os reatores autoclavados a 121°C por 20 minutos. Após essa etapa, foram inoculadas na torta de soja 6,7 mg/mL de células de *Yarrowia lipolytica* crescidas em meio YDP por 70 horas. Os reatores foram incubados em estufa com temperatura controlada de 28°C e sob umidade saturada (99%), visando manter a umidade do meio. O PES foi liofilizado e mantido sob refrigeração até o momento da utilização.

As lipases comerciais utilizadas neste trabalho foram: Novozym 435, CALB e Lipozyme RM IM, todas fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda.

A Novozym 435 é uma lipase de *Candida antarctica B* produzida por fermentação do micro-organismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado e adsorvida em resina acrílica macroporosa. As partículas da enzima imobilizada possuem de 0,3 a 0,9 mm de diâmetro e 1 a 2 % (m/m) de água. Em relação à especificidade da lipase imobilizada. A Novozym 435 apresenta especificidade para

as posições 1 e 3, mas também atua como uma lipase não específica (Oils e Fats / 2001-06950-03, ProductSheet, Novozymes).

A CALB da Novozymes Latin América Ltda é uma lipase de *Candida antactica* produzida por fermentação submersa do micro-organismo *Aspergillus niger* geneticamente modificado. A enzima apresenta densidade de aproximadamente 1,2 g/mL. A composição do produto definida como enzima concentrada (base matéria seca) é de 44% (m/m) de água, 25% (m/m) de glicerol, 25% (m/m) de sorbitol, 6% (m/m) de lipase, 0,20% (m/m) de benzoato de sódio e 0,1% (m/m) de sorbato de potássio. Esta lipase é independente de Ca+ e apresenta estabilidade térmica em temperaturas entre 50-60°C (Product Sheet, Novozymes).

Lipozyme RM IM é uma lipase de *Rhizomucor miehei* produzida por fermentação submersa do micro-organismo *Aspergillus oryzae* e imobilizada em resina macroporosa de troca iônica. As partículas da enzima imobilizada possuem de 0,2 a 0,6 mm de diâmetro e 2 a 3 % (m/m) de água. Em relação à especificidade da lipase imobilizada. A Lipozyme RM IM apresenta especifidade para as posições 1 e 3 (Oils e Fats / 2000-10503-04, ProductSheet, Novozymes).

Os demais reagentes utilizados foram o ácido oleico extra puro, metanol P.A., etanol P.A., n-propanol P.A., n-butanol P.A., hidróxido de sódio P.A., acetona P.A. obtidos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil).

3.2. **Reações de Esterificação**

As reações foram conduzidas, em duplicata, em reator batelada fechado com capacidade de 15mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático (Figura 13).

Figura 13- Sistema reacional utilizado.

3.2.1. Reação de esterificação utilizando extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica*.

3.2.1.1 Avaliação do efeito da temperatura.

Os efeitos da temperatura, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 50°C e 60°C, nas reações de esterificação do ácido oleico com metanol, etanol, n-propanol e n-butanol, foram avaliados inicialmente empregando o extrato enzimático líquido obtido por *Yarrowia lipolytica* na concentração de 20% v/v.

As reações de esterificação foram conduzidas conforme descrito anteriormente, a razão estequiométrica dos reagentes empregada foi de 1:1 (0,015 mols de ácido oleico e 0,015 mols de álcool). Cada temperatura avaliada foi mantida constante durante a reação.

3.2.1.2 Avaliação da concentração do extrato enzimático líquido empregado.

O efeito da concentração do extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica* também foi avaliado. Para tal foram conduzidas reações de esterificação do ácido oleico com os álcoois, metanol, etanol, n-propanol e n-butanol na razão estequiométrica de 1:1 (0,015 mols de ácido oleico e 0,015 mols de álcool) a temperatura de 30°C, que foi a melhor temperatura encontrada, empregando as concentrações de 5%, 10%, 20%, 30% e 40% v/v do extrato enzimático líquido.

3.2.2. Reações de esterificação utilizando extrato enzimático líquido liofilizado e Preparado Enzimático Sólido (PES) de *Yarrowia lipolytica.*

Foram conduzidas reações de esterificação do ácido oleico com n-butanol empregando a razão estequiométrica de 1:1 (0,015 mols de ácido oleico e 0,015 mols de n-butanol) a temperatura de 30°C, empregando 5% m/v do extrato enzimático líquido liofilizado de *Yarrowia lipolytica* e 5% m/v do PES.

3.2.3. Reação de esterificação utilizando lipases comerciais.

As reações de esterificação entre o ácido oleico e o n-butanol empregando lipases comerciais também foram realizadas a 30°C, empregando 5% v/v da CALB e 3% m/v das lipases Novozym 435 e Lipozyme RM IM.

3.3. Volumetria de neutralização

O progresso das reações de esterificação foi acompanhado a partir da quantificação do ácido oleico livre presente no meio reacional. Alíquotas de 50 µL do meio reacional, em duplicata, foram dissolvidas em 40 mL de acetona/etanol 1:1 e tituladas contra uma solução de NaOH a 0,02 $mol.L^{-1}$, empregando titulador automático Mettler modelo T50 (Figura 14).

Figura 16- Titulador automático Mettler usado no acompanhamento das reações.

A titulação foi realizada por ponto de equivalência até pH 11, a conversão dos substrato a produto foi calculada de acordo com a variação do número de mols de ácido oleico no meio reacional com o tempo de reação segundo a Equação 1.

$$\text{Conversão (\%)} = 100 - \left[\frac{(\text{nµmol de ácido oleico no meio})_{T0} \times 100}{(\text{nµmol de ácido oleico no meio})_{Tt}}\right] \qquad \text{(Equação 1)}$$

3.4. **Velocidade inicial da reação**

A velocidade ou taxa inicial de reação é calculada no instante inicial no qual a concentração de produto formado pode ser desprezada e relaciona da variação do número de mols de ácido oleico com o tempo de reação segundo a Equação 2.

$$V_0 = \frac{(\text{nμmol de ácido oleico})_{T0} - (\text{nμmol de ácido oleico})_{Tt}}{t} \quad (\text{Equação 2})$$

4. RESULTADOS

4.1. Reações de Esterificação utilizando extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica*.

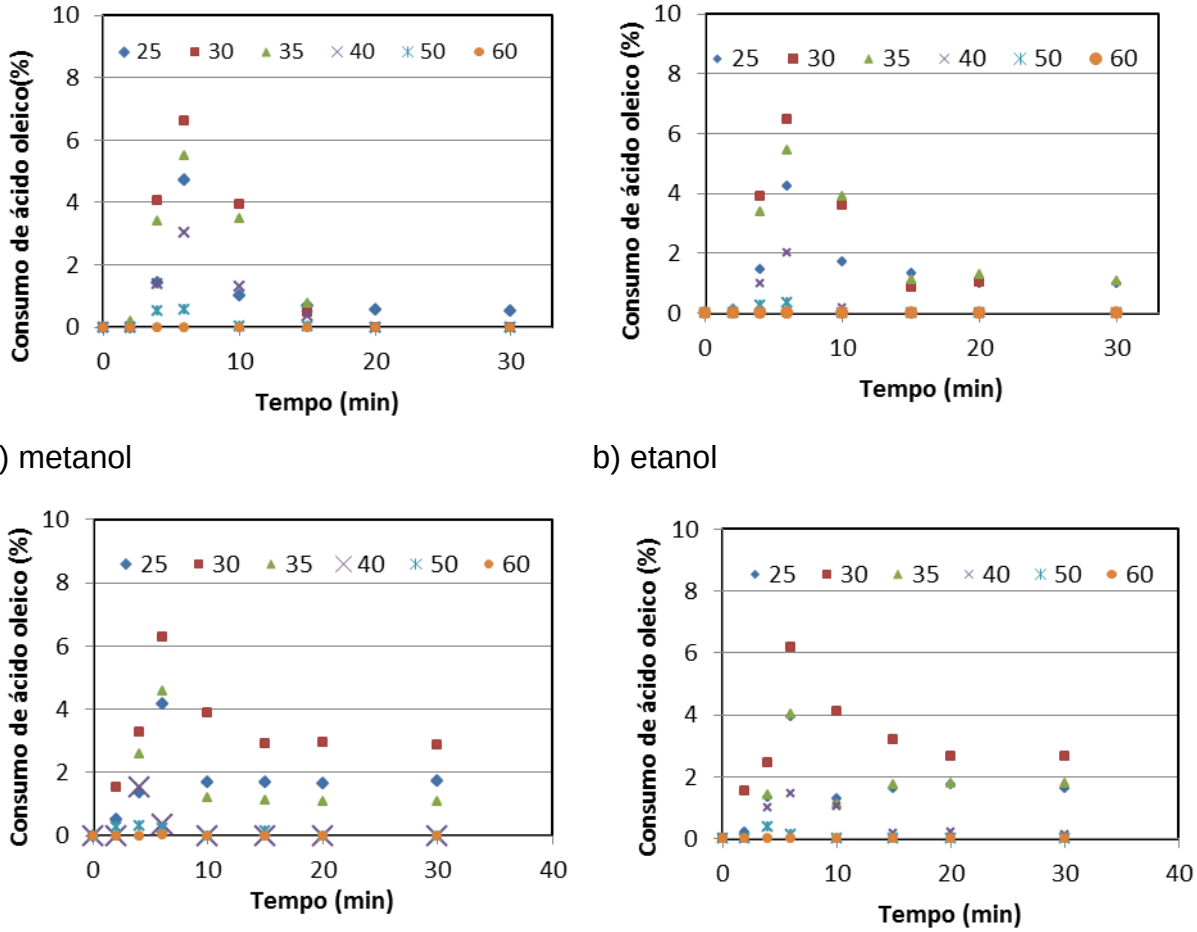
Os efeitos da temperatura, do tipo de álcool e da concentração do extrato enzimático de *Yarrowia lipolytica* foram avaliados, inicialmente, na reação de esterificação do ácido oleico com álcoois de cadeia curta (metanol, etanol, n-propanol e n-butanol). Esta reação foi escolhida, pois o ácido oleico é um dos ácidos graxos predominantes nos óleos vegetais empregados para síntese de biodiesel (óleo de soja, óleo de palma etc) e, é líquido à temperatura ambiente, o que permite a utilização de baixas temperaturas de reação.

4.1.1. Avaliação do efeito da temperatura

Os efeitos da temperatura 25, 30, 35, 40, 50 e 60°C nas reações de esterificação do ácido oleico com metanol, etanol, n-propanol e n-butanol, foram avaliados inicialmente empregando o extrato enzimático produzido por *Yarrowia lipolytica* na concentração de 20% v/v. As reações foram feitas em duplicata, a Figura 15 apresenta a média obtida para a variação do consumo de ácido oleico em percentual ao longo das reações empregando metanol, etanol, n-propanol e n-butanol.

De acordo com os resultados obtidos é possível observar que o consumo máximo de ácido oleico ocorreu em 6 minutos para todas as reações. Observa-se também uma menor conversão do ácido em temperaturas mais altas, 40°C, 50°C e 60°C, o que pode ter sido decorrente da inativação térmica da enzima.

Figura 15- Efeito da temperatura na reação de esterificação entre o ácido oleico e o a) metanol, b) etanol, c) n-propanol e d) n-butanol empregando a razão molar ácido oleico/álcool =1 e 20% v/v de extrato enzimático produzido por *Yarrowia lipolytica*.

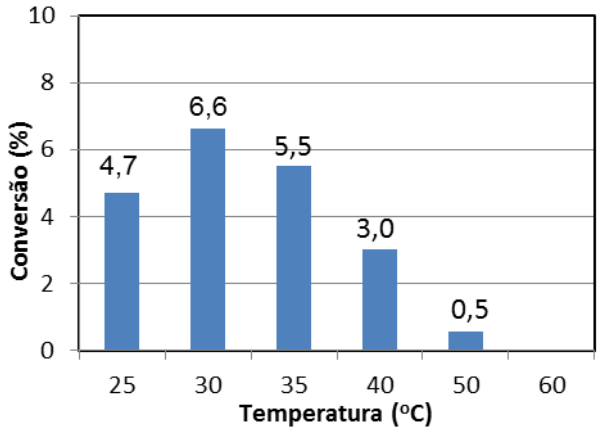


a) metanol b) etanol

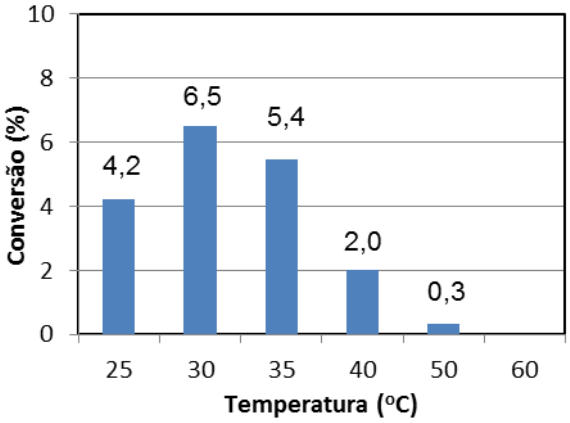
c) n-propanol d) n-butanol

Na Figura 16 estão apresentadas as conversões obtidas para cada uma destas reações em 6 minutos.

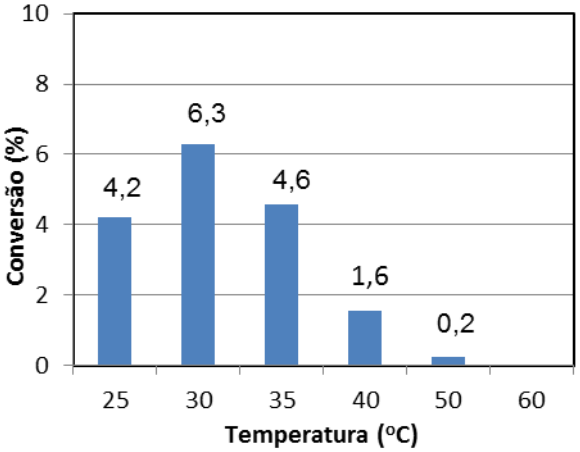
Figura 16- Influencia da temperatura na conversão dos substratos nas reações de esterificação do ácido oleico com a) metanol, b) etanol, c) n-propanol e d) n-butanol em 6 minutos de reação, empregando a razão molar ácido oleico/álcool =1 e 20% v/v de extrato enzimático produzido por *Yarrowia lipolytica*.



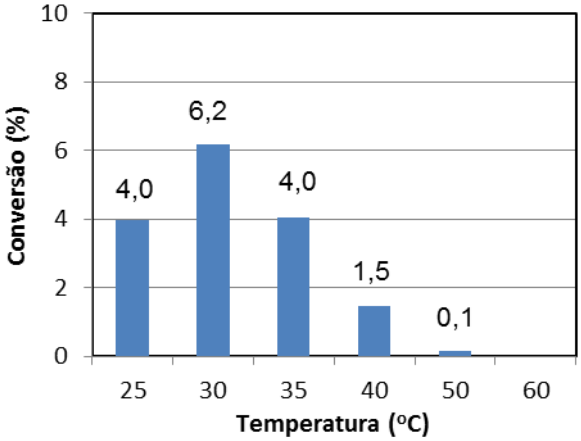
a) metanol



b) etanol



c) n-propanol



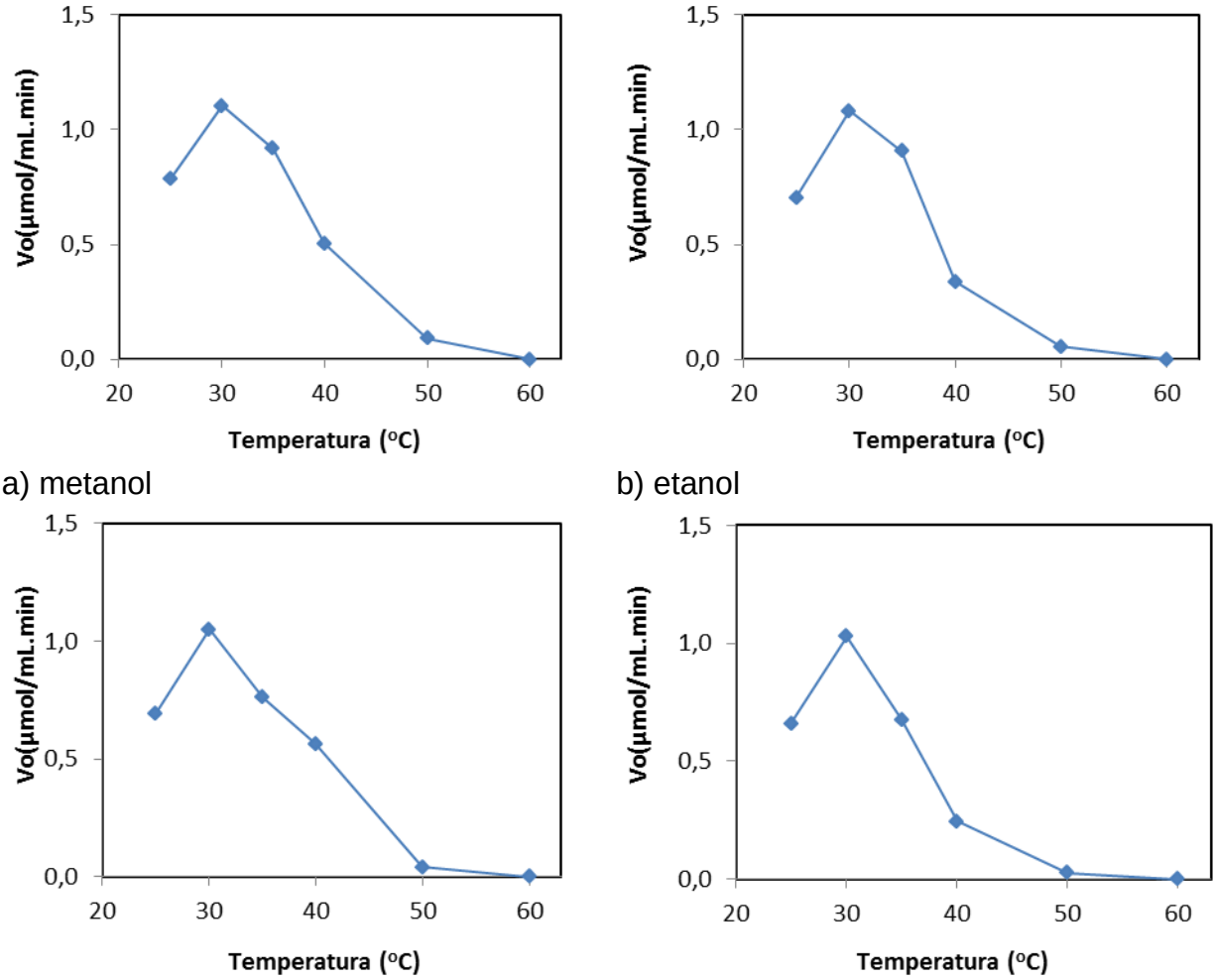
d) n-butanol

A partir da análise dos gráficos apresentados na Figura 16 é possível verificar que a 30ºC ocorreu a maior conversão da reação para todos os álcoois utilizados. Observa-se um menor consumo de ácido oleico nas temperaturas de 35ºC, 40ºC e 50ºC, e conversão próxima a zero para todos os álcoois testados na temperatura de 60ºC.

A fim de avaliar a taxa inicial das reações, foram utilizados os gráficos de velocidade inicial em função da temperatura, que é representado pela variação da concentração de substrato em função do tempo de reação para cada um dos álcoois

utilizados nas condições mencionadas. Os gráficos obtidos estão apresentados na Figura 17.

Figura 17. Gráfico de velocidade inicial de reações de esterificação do ácido oleico com os álcoois a) metanol, b) etanol, c) n-propanol e d) n-butanol empregando o teor enzimático de 20% v/v e variando a temperatura.



a) metanol b) etanol

c) n-propanol d) n-butanol

A partir dos gráficos de velocidade inicial foi possível concluir que a maior taxa (velocidade) inicial da reação de esterificação do ácido oleico com os álcoois metanol, etanol, n-propanol e n-butanol empregando a preparação enzimática líquida produzida por *Yarrowia lipolytica* ocorreu a 30°C.

Reações empregando catalisadores químicos ou enzimáticos geralmente têm a velocidade aumentada com o incremento da temperatura, isso ocorre devido ao aumento da energia cinética ocasionando maior número de colisões por unidade de tempo. Segundo a teoria da cinética química, representada pela equação de Arrhenius, a velocidade de uma reação química é aumentada com o aumento da temperatura, até um ponto em que um fator oposto (no caso de catalisadores enzimáticos o fator oposto é a desnaturação térmica), torna-se mais influente, ocasionando uma redução na velocidade da reação (ARAUJO, 2009; TAIPA *et al*., 2003 ; TORRES, 2001; GOMES *et al*., 2006).

Para manter sua atividade catalítica, a lipase precisa que a sua estrutura terciária seja preservada, se a molécula absorve excesso de energia, essa estrutura se rompe e a enzima desnatura perdendo sua atividade catalítica. A faixa de temperatura na qual ocorre a desnaturação depende do tipo de lipase e do meio reacional e deve ser estudada para cada caso (TAIPA *et al*., 2003 ; TORRES, 2001). Portanto, era de ser esperar uma redução na atividade da lipase em estudo, que é uma lipase instável e está susceptível a desativação térmica.

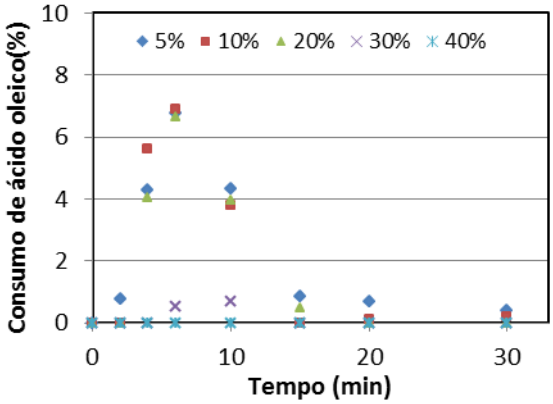
Brígida (2010) avaliou a temperatura ótima para as lipases presentes no extrato enzimático produzido por *Yarrowia lipolytica*, produzido nas mesmas condições do extrato empregado neste estudo, em reações de hidrólise do p-nitrofenil laurato e obteve maior atividade a 37°C. A diferença entre os resultados obtidos pela autora e os resultados obtidos neste trabalho pode estar relacionada aos diferentes substratos utilizados.

Destain *et al*. (1997) encontraram valores próximos de temperatura ótima em reações de hidrólise do óleo de oliva empregando lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica* geneticamente modificadas, tendo reportado como temperatura ótima para o gene YILIP2, 37°C e para o gene purificado YILIp2, 40°C.

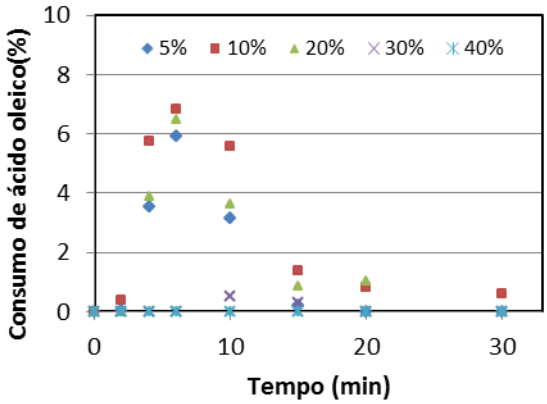
4.1.2. Avaliação da concentração do extrato enzimático líquido empregado.

Reações de esterificação entre o ácido oleico e os álcoois metanol, etanol, n-propanol e n-butanol foram estudadas na temperatura de 30°C, que foi a melhor temperatura encontrada, empregando as concentrações de 5%, 10%, 20%, 30% e 40% v/v do extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica*. As reações foram feitas em duplica, a Figura 18 apresenta as médias obtidas da variação do consumo de ácido oleico com o tempo nos experimentos.

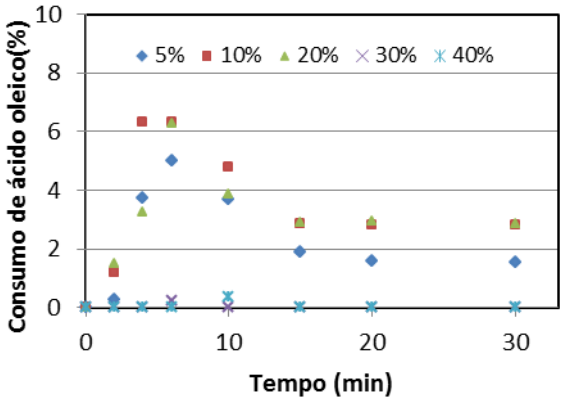
Figura 18- Efeito da concentração enzimática na reação de esterificação entre o ácido oleico com a) metanol, b) etanol, c) n-propanol e d) n-butanol, empregando a razão molar ácido oleico/álcool =1 e temperatura de 30°C.



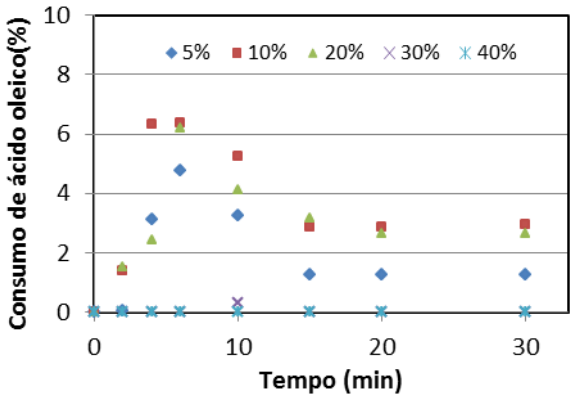
a) metanol



b) etanol



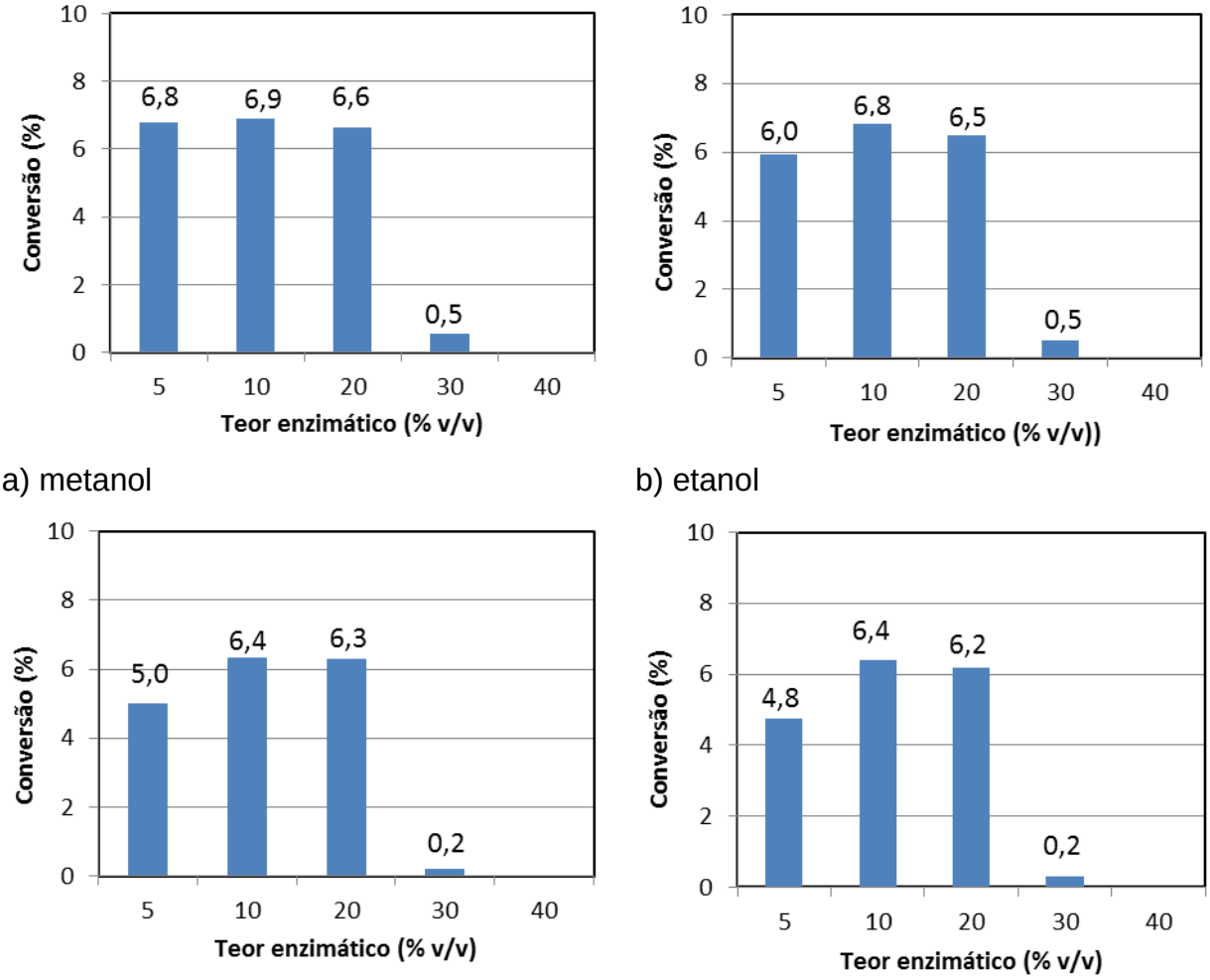
c) n-propanol



d) n-butanol

Nestas reações também foi possível observar que o consumo máximo de ácido oleico ocorreu em torno de 6 minutos. A Figura 19 apresenta as conversões obtidas nestas reações utilizando os álcoois metanol, etanol, n-propanol e n-butanol em cada um dos teores estudados, em 6 minutos de reação.

Figura 19- Efeito da concentração enzimática na conversão dos substratos nas reações de esterificação do ácido oleico com a) metanol, b) etanol, c) n-propanol e d) n-butanol em 6 minutos de reação, empregando a razão molar ácido oleico/álcool =1 e temperatura de 30°C.



a) metanol b) etanol

c) n-propanol d) n-butanol

De acordo com os resultados obtidos observa-se que houve aumento da atividade da lipase em estudo quando a concentração enzimática foi aumentada de

5% v/v para 10% v/v, onde é possível observar maior consumo de ácido oleico para todos os álcoois estudados. Verificou-se também uma redução do consumo de ácido oleico a partir da concentração de 20% v/v.

A velocidade da reação enzimática, medida no instante inicial, quando a concentração de substrato é conhecida é proporcional à concentração de enzima disponível no meio reacional. A quantidade de enzima disponível afeta diretamente a velocidade máxima de uma reação que aumenta proporcionalmente com a introdução de mais enzima ao sistema até o ponto em que o aumento na concentração de enzima não leva a um incremento da velocidade. O gráfico das velocidades iniciais em função do teor de extrato enzimático para os álcoois estudados está apresentado na Figura 20.

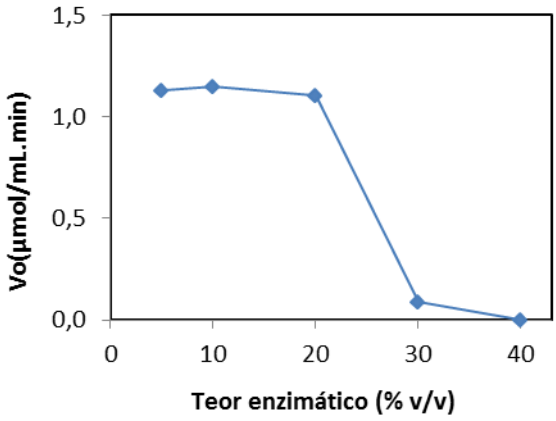
A partir dos gráficos de velocidade inicial, foi possível concluir que a melhor concentração enzimática empregada para reações de esterificação do ácido oleico com metanol, etanol, n-propanol e n-butanol foi de 10% v/v.

Era de se esperar um aumento no valor da velocidade inicial com o aumento da concentração de enzima até ser alcançado um platô, que evidenciaria que o sistema já não estaria em condição de saturação de substrato. No entanto, o observado foi uma diminuição da velocidade inicial da reação, provavelmente porque com o aumento do teor de extrato enzimático, evidentemente, também aumentou o conteúdo de água no meio reacional, que promoveu a reversibilidade da reação.

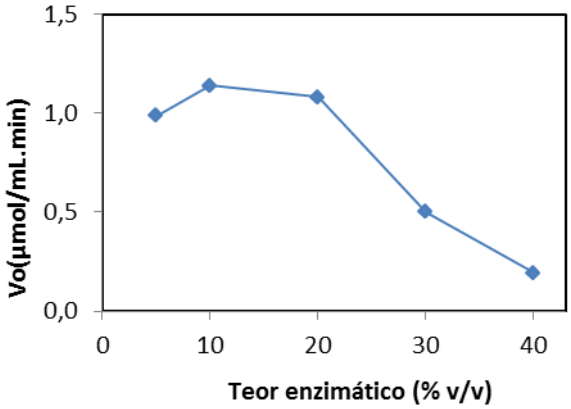
Além de influenciar a posição de equilíbrio da reação, o conteúdo de água também afeta a atividade enzimática. O efeito da água em reações catalisadas por lipases é um fator importante a ser analisado, sendo quantidade total de água na reação representada pelo somatório da quantidade de água ligada à enzima e da quantidade de água presente no meio reacional. As moléculas de água que circundam a enzima contribuem com as principais forças que estabilizam (interações *van der Waals*, pontes salinas e ligações de hidrogênio) e ativam este catalisador. Já a água presente no meio reacional pode afetar o equilíbrio termodinâmico destas reações, o aumento da quantidade de água no meio reacional favorece a reação reversa, no sentido da hidrólise, levando à redução da conversão de substratos (MA *et al*., 2002 ; GAYOT *et al*., 2003; ADLERCREUTZ, 2008; VILLENUEVE,2007).

Em geral, o aumento da quantidade total de água disponível provoca o aumento da atividade enzimática até que a quantidade ótima seja alcançada, a partir desse ponto ótimo ocorre decréscimo da atividade enzimática. A quantidade ótima de água varia entre as lipases (VILLENUEVE, 2007).

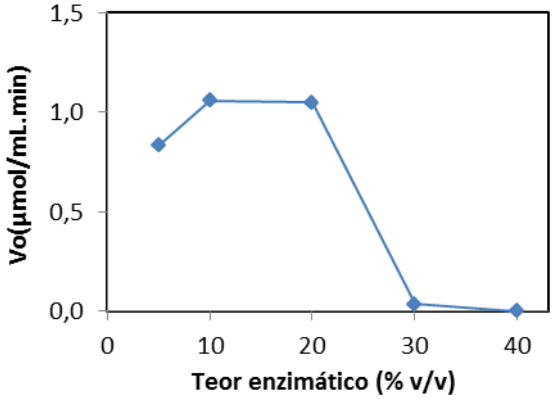
Figura 20- Gráfico de velocidade inicial de reações de esterificação do ácido oleico com os alcoóis a) metanol, b) etanol, c) n-propanol e d) n-butanol a temperatura de 30°C e variando a concentração enzimática.



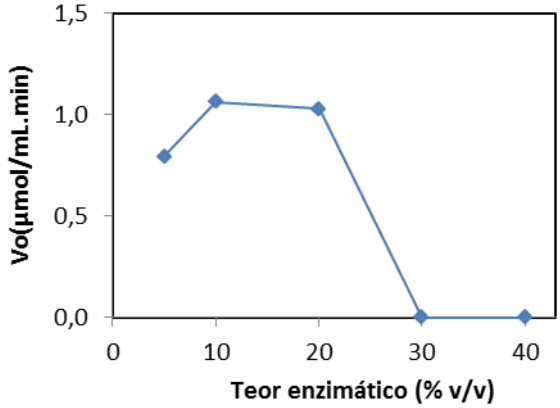
a) metanol



b) etanol



c) n-propanol

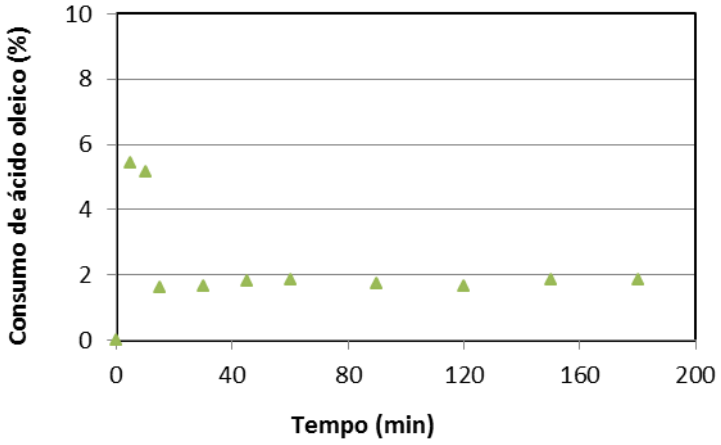


d) n-butanol

Em geral, as reações de esterificação utilizando lipases produzidas em laboratório alcançam altas conversões após muitas horas de reação, desta forma, para avaliar o efeito do tempo na reação catalisada pelas lipases de *Yarrowia*

lipolytica presentes no extrato enzimático líquido foram conduzidas reações de esterificação do ácido oleico com o n-butanol por 3 horas, empregando a concentração enzimática de 10% v/v e temperatura de 30°C , a reação foi feita em duplicata, a Figura 21 apresenta a médias dos valores obtidos para o consumo de ácido oleico.

Figura 21- Consumo de ácido oleico (%) em 3 horas de reações de esterificação com butanol empregando a razão molar ácido oleico/butanol =1, concentração enzimática de 10% v/v e temperatura de 30°C.

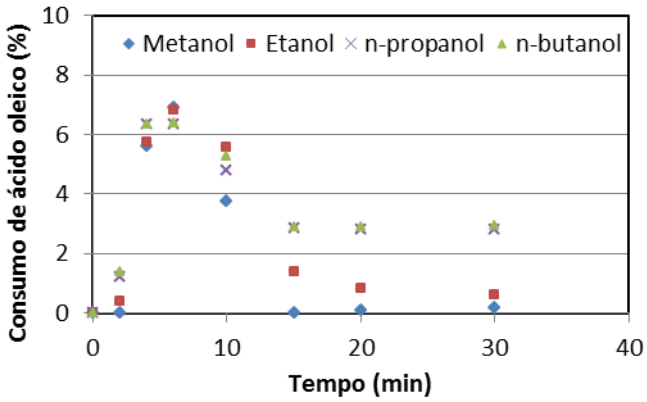


A partir da Figura 21 é possível observar que o consumo máximo de ácido oléico ocorreu em 5 minutos de reação. Após esse tempo observa-se uma redução do consumo do substrato, que pode ser causada pela inativação da lipase (pelo conteúdo de água, polaridade do álcool, temperatura) e reversibilidade da reação. O que nos leva a concluir que devido a inativação, a atividade máxima da lipase em estudo ocorre em tempos muitos curtos de reação, levando a baixas conversões mesmo em reações conduzidas por longos períodos.

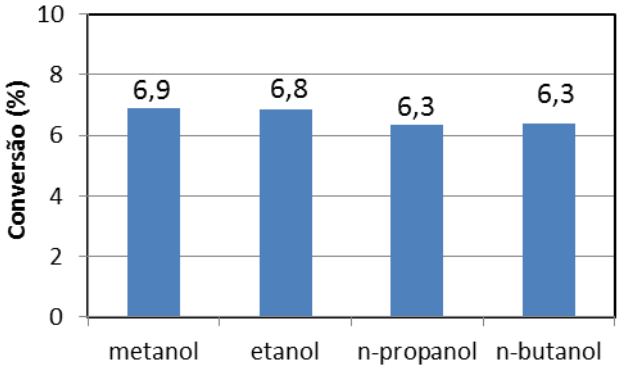
4.1.3. Seletividade em relação ao álcool

O efeito do tipo de álcool (metanol, etanol, propanol e butanol) nas reações de esterificação com o ácido oleico foi, então, avaliado utilizando a temperatura de 30°C e empregando 10% (v/v) do extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica*, que foram as melhores condições encontradas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 22

Figura 22- Seletividade em relação ao álcool da lipase de *Yarrowia lipolytica* presente no extrato enzimático liquido na reação de esterificação entre o ácido oleico com metanol, etanol, n-propanol e n-butanol empregando 10% v/v de enzima e temperatura de 30°C.



a) Progresso da reação com o tempo.



b) Conversão após 6 minutos de reação.

As reações do ácido oleico com os álcoois testados, catalisadas pela lipase de *Yarrowia lipolytica,* apresentaram um perfil cinético semelhante. Por exemplo, em 6 minutos de reação, a conversão do ácido oleico utilizando metanol, propanol e butanol foi de 6,9%, 6,8%, 6,3% e 6,3% respectivamente.

Portanto pode-se concluir as lipases presentes no extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica* apresentam atividade de esterificação frente a todos os álcoois utilizados no estudo. Sendo, conforme o esperado, um pouco mais seletivas para os álcoois de cadeia mais curta (metanol e etanol), nos quais foi possível observar uma conversão ligeiramente maior em 6 minutos de reação. Este resultado reforça a possibilidade de utilização das lipases de *Yarrowia lipolytica* na síntese de biodiesel a partir da reação de esterificação de ácidos graxos com os álcoois estudados.

No entanto a lipase se mostrou mais instável frente ao metanol e ao etanol, nas reações com estes álcoois observou-se uma redução no consumo de ácido oléico após 6 minutos, que chegou a zero após 30 minutos, caracterizando a inativação da lipase, já nas reações com propanol e butanol, apesar da redução do consumo de ácido oleico, a lipase permanece ativa após 6 minutos de reação.

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, Tamalanpudi *et al.* (2008) estudaram a seletividade das lipases Novozym 435 e da lipase de *Ryzophus oryzae* em relação aos mesmos álcoois (metanol, etanol, n-propanol e n-butanol) em reações de produção de ésteres de ácidos graxos a partir do óleo de pinhão manso. Os resultados encontrados pelos autores mostram que para ambas as lipases houve maior conversão com a redução da cadeia do álcool. De acordo com os autores, a baixa massa molar do metanol e sua alta polaridade facilitam a difusão e o acesso ao sítio catalítico da enzima, resultando numa maior taxa inicial de reação.

Porém os álcoois de menor cadeia e mais hidrofílicos interagem com as moléculas de água que circundam e auxiliam na manutenção da estrutura nativa da enzima o que pode levar a alterações na estrutura catalítica da enzima causando a perda da atividade. Muitos trabalhos na literatura reportam uma maior inativação da lipase na presença de álcoois de cadeia curta (TAN *et al*. 2010; AL-ZUHAIR *et al*.,

2007; AGUIERAS *et al*. 2013). Quanto menor o número de átomos de carbono da cadeia do álcool, maior a polaridade do álcool e maior é a inativação da enzima. Este efeito foi observado principalmente nas reações com metanol e etanol (Figuras 22 a e 22b).

Segundo Laane *et al*. (1987), dentre os parâmetros que podem ser utilizados como medida da hidrofobicidade de solventes (constante dielétrica, momento dipolar, log P etc) o log P (coeficiente de partição) apresenta a melhor correlação com a atividade enzimática, sendo definido como o logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico padrão octanol/água e introduzido como medida quantitativa da polaridade do solvente. Em geral a atividade enzimática é baixa em solventes hidrofílicos log ($P < 2$) e alta em solventes apolares (log $P > 4$). Todos os álcoois utilizados, metanol, etanol, n-propanol e n-butanol, são considerados hidrofílicos sendo os valores de log P -0,76; -0,24; 0,28 e 0,80 respectivamente. A partir destes valores pode-se concluir que os mais hidrofílicos e desnaturantes são, o metanol e o etanol.

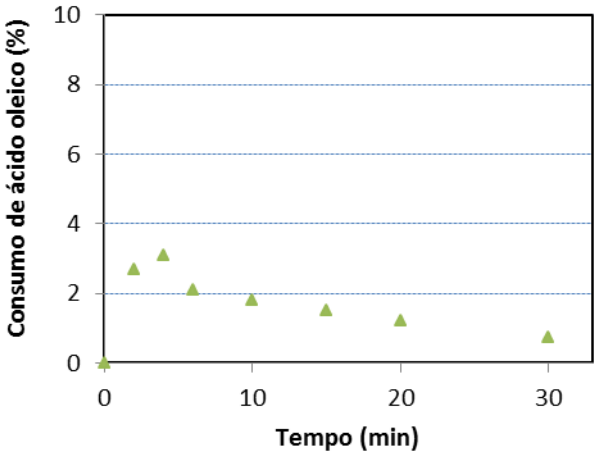
4.2. **Reações de Esterificação utilizando extrato enzimático líquido liofilizado e Preparado Enzimático Sólido (PES) produzidos por *Yarrowia lipolytica.***

Foram conduzidas também reações de esterificação do ácido oleico com n-butanol a 30°C empregando a concentração enzimática de 5% m/v do extrato enzimático liquido liofilizado produzido *Yarrowia lipolytica* (Figura 23) e 5% m/v do PES (Figura 24), descritos anteriormente no item 3.1. As reações foram feitas em duplicata, os resultados apresentados correspondem a média dos valores obtidos.

O n-butanol foi escolhido por ser o álcool empregado na determinação da atividade de esterificação de lipases, descrito no item 3.2.4, visto que os solventes mais prejudiciais às enzimas são geralmente aqueles altamente polares e mais hidrofílicos, como o metanol e o etanol.

A liofilização é uma técnica muito empregada na preparação de enzimas para serem utilizadas como biocatalisadores em meio orgânico. Na primeira etapa vai haver o congelamento da preparação enzimática, interrompendo reações químicas e atividade biológica. Em seguida, duas etapas de secagem, onde o material previamente congelado é desidratado por sublimação seguida pela dessorção, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas (MURGATROYD *et al*., 1997).

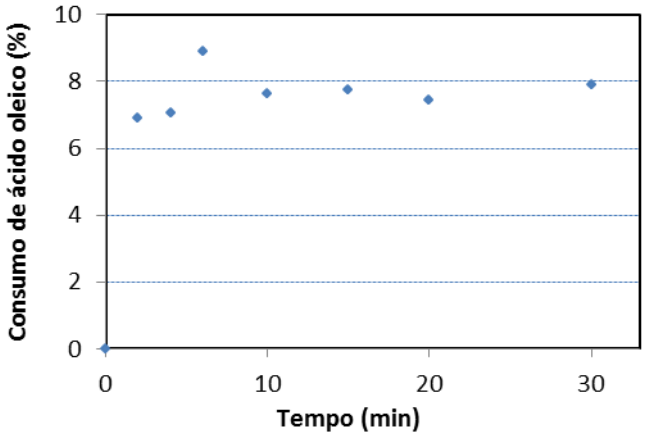
Figura 23- Consumo de ácido oleico (%) com o tempo na reação de esterificação do ácido oleico com n-butanol a 30°C e empregando 5% m/v do extrato liquido liofilizado de *Yarrowia lipolytica*.



De acordo com o resultado apresentado na Figura 23, é possível observar que para a reação empregando o extrato enzimático liofilizado, houve perda da atividade catalítica após 4 minutos de reação. Sendo a conversão máxima neste tempo de 3,1 %. A menor conversão obtida nesta reação pode ser explicada pela remoção da água ligada a enzima levando a alterações da sua estrutura nativa e conseqüentemente a redução da atividade (ADLERCREUTZ, 2008). Essas mudanças conformacionais causadas pela remoção da água podem ser prevenidas com a adição de lioprotetores durante o processo de liofilização, que irão atuar como substitutos das moléculas de água através da formação de ligações de hidrogênio

com as proteínas presentes na estrutura das lipases (DABULIS *et al*., 1993; SECUNDO *et a*l., 2002). Alguns exemplos de lioprotetores são açúcares (sacarose, lactose e maltose), polióis (sorbitol e manitol), aminoácidos (glicina, glutamina, histidina) e polímeros (polietilienoglicol) (DABULIS *et al*., 1993; SECUNDO *et a*l., 2002).

Figura 24- Consumo de ácido oleico (%) com o tempo em reações de esterificação do ácido oleico com n-butanol a 30°C e empregando 5% m/v do PES de *Yarrowia lipolytica*.

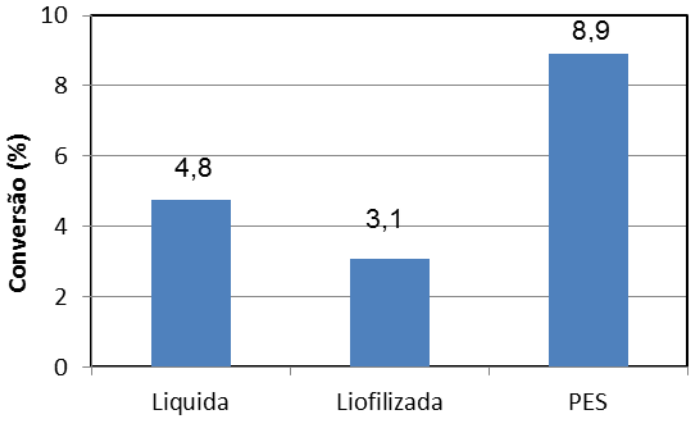


Na reação de esterificação empregando o PES (Figura 24), observa-se que o consumo de ácido oleico foi mais alto do que nas reações anteriores e praticamente constante após 6 minutos de reação, ao contrário do que aconteceu nas reações conduzidas com o extrato enzimático líquido e liofilizado, a maior conversão obtida nesta reação se deve ao fato da torta de soja usada na fermentação em estado sólido ter servido como suporte de imobilização para as lipases extracelulares, minimizando a sua desnaturação durante a reação**,** segundo Perez *et al*. (2014), a imobilização, além de aumentar a estabilidade das enzimas, reduz a agregação entre elas, fatores que podem levar a uma perda de atividade.

Além disso, o emprego desse biocatalisador não promove um aumento do conteúdo de água no meio reacional, que conforme já discutido, pode diminuir o consumo de ácido oleico.

A Figura 25 apresenta a comparação entre as conversões obtidas após 6 minutos nas reações de esterificação do ácido oleico com n-butanol a 30°C e empregando 5% (v/v) do extrato enzimático líquido, 5% (m/v) do extrato enzimático liofilizado e 5% (m/v) do PES.

Figura 25- Consumo de ácido oleico (%) após 6 minutos de reação de esterificação do ácido oleico com n-butanol a 30°C e empregando o extrato enzimático liquido, o extrato liofilizado e o PES de *Yarrowia lipolytica*.



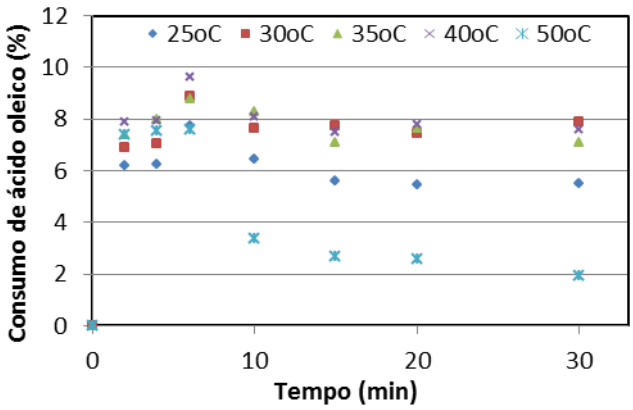
As conversões obtidas após 6 minutos de reação empregando o extrato enzimático líquido, liofilizado e o PES foram, 4,8%, 3,1% e 8,9% respectivamente e após 30 minutos de reação foram 1,3%, 0,7% e 7,9% respectivamente.

Sendo assim, o PES produzido por *Yarrowia lipolytica* apresentou maior capacidade catalítica nas reações de esterificação do ácido oléico com n-butanol, além disso, não houve um decréscimo significativo do consumo de ácido oléico ao longo do tempo.

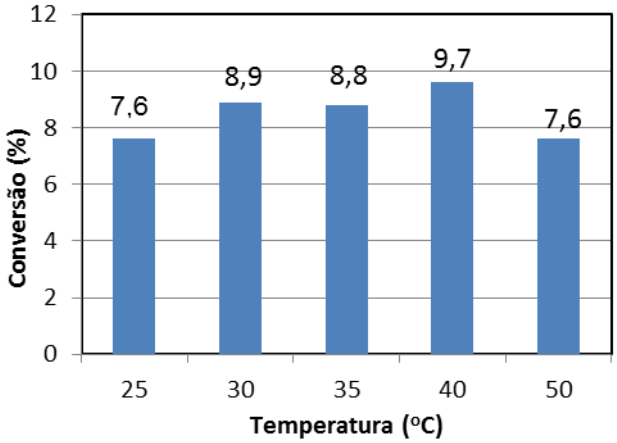
Desta forma, o PES produzido por *Yarrowia lipolytica* pode representar um biocatalisador de baixo custo, que não envolve etapas de purificação, concentração e imobilização das lipases, com atividade de esterificação.

O efeito da temperatura também foi estudado empregando PES na reação de esterificação do ácido oleico com n-butanol. As reações foram conduzidas nas temperaturas de 25, 30, 35, 40 e 50°C e 5% m/v de PES e estão apresentados na Figura 26.

Figura 26. Efeito da temperatura na reação de esterificação entre o ácido oleico e o n-butanol, empregando a razão molar ácido oleico/n-butanol =1 e 5% m/v de PES de *Yarrowia lipolytica*.



a) Progresso da reação com o tempo.



b) Conversão após 6 minutos de reação.

A partir dos gráficos apresentados na figura 26, é possível observar que o maior consumo de ácido oleico foi ocorreu a 40°C sendo a conversão nesta temperatura de 9,7% após 6 minutos de reação, além disso a lipase se mostrou ativa até o final

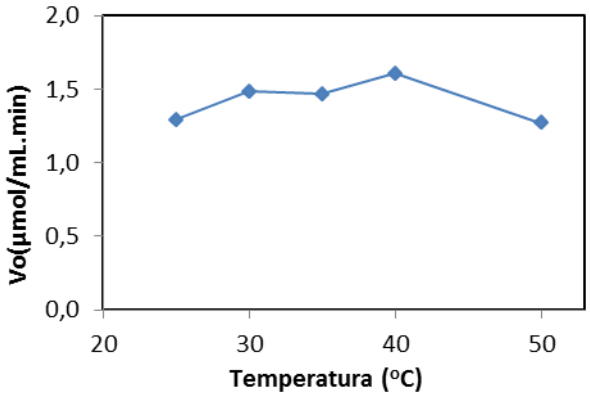
da reação (30 minutos) para todas as temperaturas estudadas, reiterando a maior estabilidade desse biocatalisador em relação ao extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica* a partir da fermentação submersa.

Conforme mencionado anteriormente, a torta de soja utilizada pode ter servido como suporte para a imobilização das lipases extracelulares, o que fez desta preparação mais estável ao incremento da temperatura e a presença do álcool.

Alguns trabalhos relatam a maior estabilidade durante a reação de lipases imobilizadas, Palomo et al. (2002), por exemplo, quando utilizou uma lipase de Candida rugosa imobilizada em um suporte hidrofóbico (Octadecyl Sepabeads), observou que a atividade manteve-se inalterada após 10 h a 45°C, enquanto a enzima livre foi totalmente inativada em 2 h nas mesmas condições. Uma lipase de C. rugosa imobilizada em polipropileno não apresentou desativação a 75°C após 2 h, enquanto a lipase livre apresentou uma atividade 50% menor nestas condições (FORESTI; ERRAZU; FERREIRA, 2005).

A partir do gráfico de velocidade inicial (Figura 27) é possível concluir que que a maior taxa inicial de reação empregando o PES ocorreu a 40°C.

Figura 27- Gráfico de velocidade inicial de reações de esterificação do ácido oleico com n-butanol empregando 5% m/v de PES de *Yarrowia lipolyitica.*



4.3. Reações de Esterificação utilizando lipases comerciais

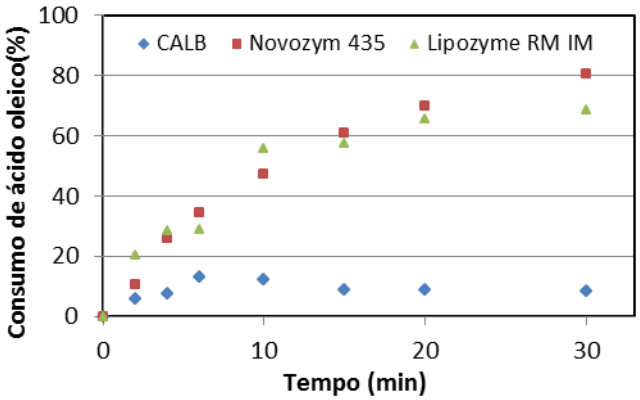
Reações entre o ácido oleico e o n-butanol empregando lipases comerciais também foram conduzidas a 30°C, empregando 10% v/v da CALB e 5% m/v das lipases Novozym 435 e Lipozyme RM IM para comparação com as lipases de *Yarrowia lipolytica*. Os resultados estão apresentados na Figura 28 As reações foram feitas em duplicata, os valores apresentados são a média dos resultados obtidos.

As conversões obtidas para CALB, Novozym 435 e Lipozyme RM IM após 30 minutos de reação foram 8,3%; 80,6% e 68,4% respectivamente. De acordo com os resultados ilustrados na Figura 28, observa-se que a reação conduzida na presença da lipase comercial líquida CALB também apresentou menores conversões que a obtida com sua a equivalente lipase imobilizada Novozym 435, corroborando as vantagens do emprego de preparados sólidos, visto que a água é um sub-produto da reação, na reação de esterificação proposta.

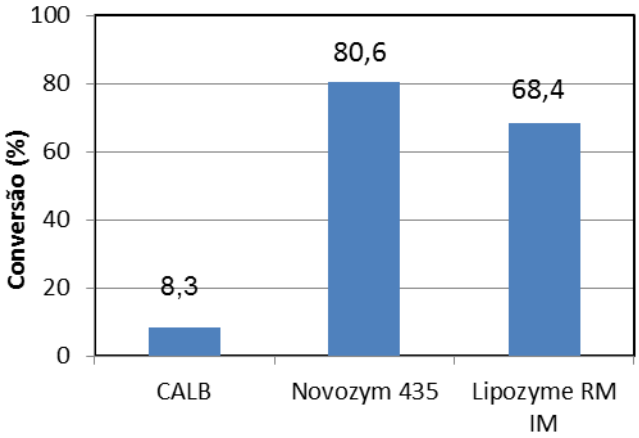
Além de apresentar menor capacidade catalítica que a sua equivalente imobilizada, a CALB demonstrou queda em sua atividade catalítica após 6 minutos de reação, assim como o observado nas reações conduzidas empregando o extrato enzimático líquido produzido por *Yarrowia lipolytica*.

Conforme o esperado, as lipases comerciais imobilizadas apresentaram maior atividade de esterificação, de acordo com a literatura, a imobilização aumenta a capacidade catalítica das lipases, Persson et al. (2002) por exemplo, verificou uma maior atividade (400 vezes) comparada à enzima livre, quando imobilizou a lipase de *Humicola lanuginosa* em Accurel EP-100, atribuindo o resultado ao espalhamento da enzima pela ampla área superficial do suporte, prevenindo a agregação das moléculas, facilitando o acesso aos substratos.

Figura 28- Reações de esterificação do ácido oleico com butanol empregando lipases comerciais, CALB, Novozym 435 e Lipozyme RM IM conduzidas a 30°C.



a) Progresso da reação com o tempo.



b) Conversão após 30 minutos de reação.

A Tabela 4 apresenta a comparação entre as conversões obtidas após 30 minutos de reação de esterificação do ácido oleico com n-butanol empregando as lipases de *Yarrowa lipolytica* (extrato líquido, liofilizado e PES) e as lipases comerciais (Novozym 435, Lipozyme RM IM e CALB).

Tabela 4- Conversões obtidas após 30 minutos de esterificação do ácido oleico com n-butanol a 30°C, empregando 10% v/v das lipase líquidas (CALB e Yarrowia lipolytica) e 5% m/v das lipases da lipase liolifizada e do PES produzidos por *Yarrowia lipolytica* e 5% m/v das lipases comercias imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.

Enzima	Conversão (%) após 30 minutos de reação
Extrato líquido produzido por *Y.lipolytica*	3,0
Extrato liofilizado produzido por *Y.lipolytica*	0,7
PES produzido por *Y.lipolytica*	7,9
CALB	8,3
Novozym 435	80,6
Lipozyme RM IM	68,4

Conforme o esperado as lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435 e Lipozyme RM IM) além de apresentar maior capacidade catalítica, permaneceram estáveis e com a atividade crescente ao longo dos 30 minutos de reação o que levou a maiores conversões. Diante disto, uma possível maneira de aumentar a conversão das reações empregando lipases de *Yarrowia lipolyitica* seria a imobilização das mesmas, visto que, uma das vantagens da imobilização é o aumento da estabilidade das lipases.

A maior estabilidade das lipases imobilizadas deve-se a ligações efetivas da mesma com o suporte, essas ligações irão impedir o desdobramento da estrutura terciária da enzima e a conseqüente alteração em sua estrutura nativa cataliticamente ativa.

CONCLUSÕES

Os estudos das reações de esterificação entre o ácido oleico e álcool (metanol, etanol, n-propanol e n-butanol) empregando o extrato enzimático líquido de *Yarrowia lipolytica* revelaram que a lipase em questão apresenta atividade de esterificação frente a todos os alcoóis testados.

Para todos os alcoóis estudados, a maior taxa inicial de reação ocorreu a 30°C e empregando 10% v/v de concentração enzimática, sendo que o consumo máximo de substratos nesta reação ocorreu em 6 minutos, após esse tempo houve uma queda na atividade da lipase.

A lipase líquida de Yarrowia lipolytica se mostrou mais instável para as reações conduzidas empregando o metanol e o etanol, apresentando perda considerável em sua capacidade catalítica ao longo das reações.

A partir das reações de esterificação do ácido oléico com n-butanol conduzidas a 30ºC e empregando 5% m/v do extrato líquido liofilizado e do PES produzidos por *Yarrowia lipolyitica*, observou-se que o PES apresenta a maior atividade de esterificação e também mostrou maior estabilidade frente ao aumento de temperatura, tendo maior taxa de reação e maior consumo de substratos a 40°C, a maior estabilidade apresentada pelo PES pode ser explicada pela formação de ligações entre as lipases e a torta de soja, que neste caso, pode ter servido como suporte para a lipase.

Conforme o esperado o consumo de ácido oléico nas reações com butanol foi empregando as lipases comerciais CALB, Novozym 435 e Lipozyme RM IM foi maior que o consumo de ácido oléico nas mesmas reações empregando as diferentes formas das lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica,* sendo o maior potencial catalítico apresentados pelas lipases comerciais imobilizadas atribuído a ligação entre a enzima e o suporte que confere maior estabilidade a mesma impedindo a perda de sua estrutura nativa com a conseqüente inativação.

Desta forma, apesar das baixas conversões obtidas no estudo, foi possível concluir que as lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica* podem ser empregadas como catalisadores em reações de esterificação do ácido oleico com alcoóis de cadeia curta visando à obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel), uma vez que observou-se o consumo do substrato (ácido oleico) em tempos curtos de reação. Para alcançar maiores conversões é necessário impedir a inativação dessas lipases causada pelos alcoóis hidrofóbicos e/ou pelo aumento da temperatura. Uma das maneiras de aumentar a estabilidade de lipases é a imobilização.

SUGESTÕES PARA OS TRABALHOS FUTUROS

- Adição de lioprotetores durante o processo de liofilização, visando evitar alterações na estrutura nativa da enzima causadas pela remoção das moléculas água que a circundam;
- Condução da reação com maiores quantidades de PES visto que, maiores concentrações de enzima podem levar a um incremento da taxa inicial de reação e conseqüentemente a maiores conversões;
- Adição do álcool de forma escalonada, os álcoois hidrofílicos podem interagir com as moléculas de água que circundam a enzima e auxiliam na manutenção de sua estrutura nativa, desta forma quando adicionados em altas concentrações o álcool pode levar a perda da integridade estrutural inativando a mesma. A adição em pequenas proporções é possível minimizar os efeitos da desnaturação da enzima pelo álcool;
- Remoção da água formada. Por ser um subproduto das reações de esterificação, a presença de água no meio reacional pode deslocar o equilíbrio da reação para o sentido inverso (hidrólise), levando a uma menor conversão. Uma forma de remover essa água é com a utilização de peneira molecular, quando no meio reacional a peneira irá reter a água formada removendo a mesma do meio. Com a remoção da água formada é possível evitar o deslocamento do equilíbrio no sentido da hidrólise dos ésteres formados;
- Imobilização da lipase de maneira que a mesma apresente maior estabilidade e atinja maiores conversões para este tipo de reação. A comparação do desempenho catalítico de enzimas livres e imobilizadas demonstra que as enzimas imobilizadas, em geral, apresentam maior potencial catalítico além de serem mais estáveis a temperatura, presença de solventes e ao tempo de reação, isso acontece porque a imobilização em suportes hidrofóbicos favorece a catálise em função das interação entre o suporte e a enzima, a qual mantém a “tampa” hidrofóbica presente sobre seu sítio ativo aberta

facilitando a interação com o substrato, além disso a imobilização promove a desagregação da enzima aumentando o número de moléculas disponíveis para a catálise.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH,A.Z.; SULAIMAN,N.S.; KAMARUDDIN, A.H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15. Biochemical Engeneering Journal, v.44, p.263-270, 2009.

ABRIL, P.A.S.. Transesterificação enzimática de óleo de soja por lipase presente no concentrado bruto do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: Uma abordagem alternativa ao uso de lipases comerciais. 2012. Dissertação de Mestrado (Química Orgânica) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

ADLERCREUTZ, P. Fundamentals of Biocatalysis in nest organic solvents. Organic Synthesis with Enzymes in non-aqueous media. Ed. Wiley-VCH, 2008.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (2014). Boletim mensal do biodiesel. Superintenência de refino, processamento de gás natural e produção de biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?id=60484> Acesso em: 02 jun 2014.

AGUIEIRAS, E.C.G; SOUZA S,L.; LANGONE, M.A.P. Estudo do comportamento da lípase comercial Lipozyme RM IM em reações de esterificação para obtenção de Biodiesel; Química Nova, v. 15, p. 1-5, 2013.

AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M. Biocatálise em meios não-convencionais. Engenharia enzimática. Lidel, 2003.

AKOH, C.C.; CHANG, S.; LEE, G.; Shaw, J. Enzymatic approach to biodiesel production. Jounal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, p. 8995-9005, 2007.

ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J.A.; FERNANDEZ, S.; OOSTERHOUT, D.; PUCCINELLI,D. ; CARRIÈRE, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. Biochimica et Biophysica Acta , v. 1761, p. 995–1013, 2006.

AL-ZURAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges; Biofuels Bioproducts and Biorefining, v. 1, p. 57-66, 2007.

AMARAL, P. F.F. Produção de lipase de Yarrowia lipolytica em reator multifásico. 2007. Dissertação de Doutorado (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

AMARAL, P.F.F.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P.; COELHO, M.A.Z. Improving lipase production usin a perfluorocarbon as oxygen

carrier, Journal of Chemical Techonology and Biotechnology, v.81, p.1368-1374, 2006.

AMERICAN SOCIETY OF TESTING AND MATERIALS. (2008). Standart specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels. Disponível em: <http://www.astm.org/Standards/D6751.htm> Acesso em 14/07/2014.

ANTCZAK,M.S.;KUBIAK,A.;ANTCZAK,T.;BIELECKI,S. Enzymatic biodiesel synthesis- Key factors affecting efficiency of the process. Renewable Energy, v.34, p.1185-1194, 2009.

ARAUJO, L.T.C. Aplicações das lipases. Monografia de Pós Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; PRABHAT, N.J.; RAJESH, M. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.62, p.9-14, (2010).

BALAT, M.B. A critical review of biodiesel as a vehicular fuel. Energy Conversion and Management v. 49, p.2727-2741, 2008.

BALCÃO,V.M., PAIVA, A.L., MALCATA, F.X. Biorreactors with immobilized lipases. Enzyme and Microbial Technology, v. 18, p.392-416, 1996.

BANKOVIC-ILIC, I.B.; STARNENKOVIC, O.S.; VELJKOVIC, V.B. Biodiesel production from non-endible plants oils. Renewable & Sustainable Energy Reviews, v. 16, p. 3621-3647, 2012.

BASTOS, A.C.P. Estudo da Seletividade de lipases para obtenção de ésteres de ácidos graxos. Dissertação de Doutorado da Universidade Federal do Ceará, 2013.

BARON,A.M.; SARQUIS,M.I.M.; BAIGORI,M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillum coryophilum* in water-restricted environments. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, v.34, p. 25-32, 2005.

BATH, G.; GAILLARDIN, C. Phisiology and Genetic of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews v.19:219-237, 1997.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE,R.; URIBELLEREA, J.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD J.M. *Y.lipolytica* as a model for bio-oil production. Progress in Lipid Research, v. 48, p.375-387, 2009.

BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.12, p.542-552, 2008.

BRAGA, A.C. Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica*. Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica – Universidade do Minho, 2009.

BRÍGIDA, A.I.S. Imobilização de lipases utilizando fibras de casca de coco verde como suporte para aplicações industriais; Dissertação de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Escola de Química- Universidade Federal Fluminense, 2010.

BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R.J. Hydrolases in organic synthesis. Ed. Willey, 2006.

BORZANI, W. Biotecnologia Industrial- Fundamentos, Ed. Edgard Blucher, v.1, 2001.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE,V.; BORNCHEUER, U.T. Biocatalysts and Enzyme Technology. Ed. Wileyvch, 2005.

CASTANHA, F. R. Utilização de soro de leite para a produção de lipídeos por leveduras oleaginosas. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, 2012.

CASTRO, H.F., MENDES, A.A., SANTOS, J.C., AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Química Nova, v. 27, p.146-156, 2004.

CAVALCANTI, O. E.D.; SILVA, P.R.; RAMOS,A.P.; ARANDA,D.A.G.;FREIRE,D.M.G. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by Thermomyces lanuginosus lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. Enzyme Research, v. 2011, p.1-8, 2010.

CERVERÓ, J.M.; COCA, J.; LUQUE, S.Production of biodiesel from vegetable oils; Grasas y Aceites, v.59, p.76-83, 2008.

CHANG,C.S.; WU, P.L. Synthesis of triglycerides of phenylalkanoic acids by lipase-catalysed esterification in solvent-free system. Journal of Biotechnology, v. 127, p.694-702, 2007.

CHEN, Y.M.; XIAO,B.; CHANG;J.; FU,Y.; LV,P.M.;WANG,X.W. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. Energy Conversion and Manegement, v.50, p.668-673, 2009.

COELHO, M.A.Z.; AMARAL P.F.F.; BELO, I. Yarrowia lipolytica: na industrial workhorse. Current Research, Technology and EDUCATION Topics in Applied Microbiology and MicrobialBiotechnology. p. 930-944, 2010.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from Yarrowia lipolytica 681. Bioresource Technology v. 70, p.173-180, 1999.

CYGLER, M.; SCHRAG,J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. Methods in Enzymology v.284, p. 3-27, 1997.

DABULIS, K.; KLIBANOV.A.M. Dramatic enhancement of enzymatic-activity in organic-solvents by lyoprotectants. Biotechnology and Bioengineering, v. 41, p. 566-571, 1993.

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

DESTAIN, J.; ROBLAIN, D.; THONART, P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica* . Biotechnology Letters, v. 19, p.105-107, 1997.

DOMINGUES, A.; COSTAS,A.; LONGO, M.A.; SANROMÁN,A. A novel application of solid state culture: Production of lipases *by Yarrowia lipolytica*. Biotecnology Letters v.25, p.1225-1229, 2003.

ENCARNAÇÃO, A.P.G. Geração de Biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação – uma avaliação econômica. Dissertação de Mestrado – Escola de Química- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. Ed. Sringer-Verlag, 1997.

FARIA, M. M. Influência das propriedades físico-químicas das misturas diesel/biodiesel na etapa de atomização de combustível em motores diesel de injeção direta. Dissertação de Mestrado - Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

FELTES, M.M.C; OLIVEIRA, D.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, J. V. An overview of enzyme-catalyzed reactions and alternative feedstock for biodiesel production. Alternative Fuel, Croácia: InTechopen, cap. 2, p.21-46, 2011. Disponível em: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/17584.pdf> Acesso em: 05/11/2013.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN K.V.; NORDDAHL,B. A Review of Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. Biotechnology and Bioengineering, v.102, p.1298-1315, 2009.

FORESTI, M. L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M. L. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using Candida rugosa lipase immobilised on polypropylene. Biochemical Engineering Journal, v. 25, p.69-77, 2005.

FREIRE, D.M.G.; CASTILHO L.R. Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado, p. 367-383, 2008.

FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BON, E.P.S; SANT'ANNA JR.; G.L. Lipase production by a new promising strain of Penicillium restrictum. Revista de Microbiologia, v. 28, p. 6-12, 1997.

FREITAS, L.; SANTOS, J.C.; BARCZA, M.V.; CASTRO, H.F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: síntese enzimática de monolaurina por esterificação. Química Nova, v.32, p. 2277-2281, 2009.

FU, B.Y.; VASUDEVAN,P.T. Effect of organic solvents on enzyme-catalyzed synthesis of biodiesel. Energy & Fuels, v.23, p.4105-4111, 2009.

GAYOT, S.; SANTARELLI,X.;COULON,D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. Journal of Biotechnology, v.101, p. 29-36, 2003.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure-enriched compounds. Tetrahidron, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GERIS, R.; SANTOS, N.A.C.; AMARAL,B.A.; MAIA, I.S.; CASTRO V.D.; CARVALHO, J.R.M. Biodiesel de Soja- Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica, Química Nova, v.30, p.1369-1373, 2007.

GIRALDO, L.J.L.; LAGUERRE,M.;LECOMTE,M.;LECOMTE,J.ÇFIGUEROA,E.M.C.; BAROUH,N.;BAREA,B.;VILLENEUVE,P.Lipase-catalyzed syntesis of clorogenate fatty esters in solvent-free médium. Enzyme and Microbial Technology, v.41, p. 721-726, 2007.

GOMES, M.M.R. Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo residual de peixe, Dissertação de Mestrado - Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

GUIEYSSE,D.; SANDOVAL,G.; FAURE,L.; NICAUD,J.M.; MONSAN,P.; MARTY,A. New efficient lipase from Yarrowia lipolytica for resolution of 2-bromo-arylacetic esters. Tetrahedron: Assymmetry, v.15, p. 3539-3543, 2004.

GUI, M.M.; LEE,K.T.; BHATIA,S. Feasiability of endible oil vs. non-endible oil vs. waste endible oil as biodiesel feedstock. Energy, v. 33, p. 1646-1653, 2008.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH,S.; VAHABZADEH,F.; MONAZZAMI,A. A solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. Enzyme and Microbial Technology, v.45, p.188-194, 2009.

HOU, C. Characterization of new yest lipases. Journal of American oil Chemistrys' Society, v.74, p. 1391-1394, 1997.

ILLANES, A. (2008). Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. Ed. Springer, 2008.

ISO, M.;CHEN,B.X.;EGUCHI,M.;KUDO,T.;SHRESTHA,S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, v.16, p. 53-58, 2001.

JAEGER, K. E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJKSTRA, B. W.; SCHIMOSSEK K.; ZONTA, A.; REETZ, M. T. Bacterial lipases for biotechnological applications. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Amsterdam, v. 3, p.3-12, 1997.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T.T. Lipases for biotechnology.Current Opinion in Biotechnology, v.13, p.390-397, 2002.

JAEGER, K.E.; EGGERT, M.T. Micorbial lipases from versatile tools for biotechnology. Trends in Biotechnology, v.16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications on lipases, Annual Review of Microbiology, v.53, p. 315-351, 1999.

JO - JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPÉIA. Directiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do conselho, 2003. Disponível em: <http://www.ebb-eu.org/legis/OJ%20promotion%20POR.pdf > Acesso em: 14/07/2014.

KADEMI, A.; LEBLANC,D.; HOUDE,A. Lipases. Enzyme Technology, Ed. Springer Verlag, 2005.

KATRE, G.; JOSHI, C.; KHOT, M.; ZINJARDE, S.; RAVIKUMAR,A. Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast Yarrowia lipolytica NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. AMB Express v. 2, p. 36, 2012.

KRIEGER,N.; BHATNAGAR,T.; BARATTI,J.C.;BARON,A.M.; LIMA,V.M.;MITCHELL,D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. Food Technology and Biotechnology, v.42, p. 279-286, 2004.

KUMARI, A.; SHAH,S.; GUPTA,M.N. Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. Energy and Fuels, v. 21, p.368-371, 2007.

KVITTINGEN, L.; SJURSNES,B.; ANTHONSEN,T.; HALLING,P. (1992). Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalyzed synthesis in organic media-a practical procedure for organic chemists. Tetrahedron, v. 48, p. 2793-2802, 1992.

LAANE, C.; BOEREN,S.; HILHOERST,R.; VEEGER,C.Biocatalysis in Organic Media. Ed Elsevier, 1987.

LEHNINGER, N. D.; COX, M.M. Enzimas – Princípios de Bioquímica. 3ed. Ed.Sarvier, 2002.

LI. Q.; DU W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology v.80, p. 749–756, 2008.

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C.; CRUZ, R.S. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. Química Nova v. 32, p.1596-1608, 2009.

LOTERO, E.; LIU,Y.J.; LOPES,D.E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D.A.; GOODWIN, J.G. Synthesis of biodiesel via acid catalysis, Industrial & Engineering Chemistry Research, v.44, p. 5353-5363, 2005.

LUKOVIC, N., JOGOVIC, K.Z.; BERBRADICA, D. Biodiesel fuel production by enzymatic transesterification of oils: Recent trents, challenges and future perspectives, alternative fuels, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/alternative-fuel/biodiesel-fuel-production-by-enzymatic-transesterification-of-oils-recent-trends-challenges-and-futu> Acesso em 15/03/2014.

MA, F.R.; HANNA, M. A. Biodiesel production: A review. Bioresource Technology, v. 70, p.1-15, 1999.

MA, L.; PERSON, M.; ADLERCREUTZ, P. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p.1024-1029, 2002.

MACHADO, C.G., CHAVES, J.B.P.; ANTONIASSI,R. Composição de ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco e babaçu. Revista Ceres v. 58, p.463-470, 2006.

MPV 647 - MEDIDA PROVISÓRIA 647. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Mpv/mpv647.htm Acesso em 01/06/2014.

MEDINA, R.A.; MORENO, G.P.A.; CERDAN, E.L.; GRIMA, M.E. (2009). Biocatalysis: Towards ever grenner biodiesel production. Biotechonology Advances, v.27, p.398-408, 2009.

MAGALHÃES, S.P. Estudo de modelos cinéticos para reação de transesterificação enzimática de óleos vegetais. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

MEHER, L. C., SAGAR, D. V., NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification- a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 10, p. 248-264, 2006.

MENG X.; YANG, J; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy, v.34, p. 1-5, 2009.

MENG, Y.; WANG, G.; YANG N.; ZHOU, Z.; LI, Y.; LIANG, X.; CHEN, J.; LI, Y.; LI, J. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by Yarrowia lipolytica lipase. Biotechnology for Biofuels, v. 4, p. 6, 2011 Disponível em: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/4/1/6> Acesso em 02/02/14.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.M.; FREIRE, D.M.G.; OLIVEIRA, J.V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. (2009). Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.29, p.440-443, 2009.

MESSIAS, J.M., Costa, B.Z., Lima, V.M.G., Giese, E.C., Dekker, R.F.H., Barbosa, A.M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semana: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v.32, p. 213-234, 2011.

MOSIER, N.S.; LADISH, M.R. Modern biotechnology: connecting innovations in microbiology and biochemistry to engineering Fundamentals. Ed. Willey, 2009.

MURGATROYD, K.; BUTLER, L. D.; KINNARNEY, K.;MONGER, P. Good pharmaceutical freeze-drying practice. Ed. Peter Cameron, 1997.

NELSON, L.A.; FOGLIA T.A.; MARMER, W.N. Lipase-catalysed production of biodiesel. Journal of the American Oil Chemists Society, v.73, p. 1191-1195, 1996.

NEVES, A. A. Avaliação do aproveitamento de óleos alimentares usados para produção de biodiesel na área metropolitana do Porto. Dissertação de Mestrado - Universidade do Porto, 2008.

OLIVEIRA, L.G.; MANTOVANI, S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. Química Nova, v. 32, p. 742-756, 2009.

OTA, Y.; GOMI, K.; KATO,S.; SUGIURA,T.; MINODA,Y. Purification and some properties of cell-boun lipase from Saccharomycopsis lipolytica. Agricultural and Biological Chemistry, v. 46, p. 2885-2893, 1982.

PAIVA, A L., BALCÃO,V.M., MALCATA, F.X. Kinetics and mechanics of reactions catalysed by immobilized lipases. Enzyme and Microbial Technology, v. 27, p. 187-204, 2000.

PALOMO, J. M.; MUNOZ, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. Journal of a Molecular Catalysis B-Enzymatic, v. 19, p. 279-286, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU,M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS,G. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. Eletronic Journal of Biotechnology, v. 10, p. 425-435, 2007.

PISSARELLO, M.L.; DALLA COSTA, B.; MENDOW, G.; QUERINI, C.A. Esterification with ethanol to produce biodiesel from high acidity raw materials. Kinetic studies and analysis of secondary reactions. Fuel Processing Technology v.91, p. 1005-1014, 2010.

PENHA, M. da N.C.; SILVA, M.D.P.; MENDONÇA, K.K.M.; BRANDÃO, K.S.R.; MACIEL, A.P.; SILVA, F.C.Caracterização físico-química da semente e óleo de pinhão manso (Jatropha curcas) cultivado no Maranhão. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, Brasília, 2007.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. Enzyme and Microbial Technology, v. 31,p. 833-841, 2002.

PEREIRA, M.F.V.; ROCHA,L.M.H.M.; SANT`ANNA J.G.L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. Biotechnology Letters, v.22, p. 71-75, 2000.

PORTAL BIODIESELBR.COM. Processo de produção do biodiesel. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/processo-producao/biodiesel-processo-producao.htm> Acesso em 02/05/2014.

RAMOS, M.J.; FERNÁNDEZ C.M.; CASAS, A.; RODRIGUES, L.; PEREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. Bioresource Technology, v. 86, p.1439-1448, 2009.

RAMOS, L.P.; SILVA, F.R. ; MANGRICH, A.S.; CORDEIRO, C.S. (2011). Tecnologias de Produção de Biodiesel. Revista Virtual de Química, v.3, p. 385-405, 2011.

RATLEDGE, C.; WYNN, J.P.The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Advances in Applied Microbiology, v.51, p. 1-51, 2002.

ROSSETI, I.G. Produção de biodiesel empregando biocatalise via reações de esterificação e transesterificação. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Carlos, 2011.

SALIS, A.; PINNA,M.; MONDUZZI, M.; SOLINA,V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. Journal of Biotechnology, v.119, p. 291-299, 2005.

SARDA, L., DESNUELE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion, Biochimica et Biophysica Acta, v. 58, p. 513-521, 1958.

SAXENA, R. K., GHOSH, P. K. e GUPTA, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. Current Science, v. 77, p. 101-115, 1999.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases: Research review paper. Biotechnology Advances, v.19, p. 627-662, 2001.

SECUNDO, F.; CARREA,G. Lipase activity and conformation in neat organic solvents" Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.19-20, p. 93-102, 2002.

SILVERMAN, R. B. The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions. Ed. Elsevier Science, 2000.

SOARES, D. Desenvolvimento do processo de esterificação etílica enzimática de ácidos graxos em reator de leito fixo. Dissertação de Doutorado- Universidade Federal do Paraná, 2014.

SOUZA, A.D.V; FÁVARO, S.P., ÍTALO,L.C.;ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. Pesquisa Agopecuária Brasileira, v.44, p.1328-1335, 2009.

SRINIVAS, D.; SATYARTHI, J.K.. Biodiesel production from vegetable oils and animal fat over solid acid double-metal cyanide catalysis. Catalysis Surveys v.15, p.145-160, 2011.

SUAREZ, P.A.Z.; MENEGHETTI, S.M.P.; MENEGHETTI, M.R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: Algumas aplicações da catálise na oleoquímica. Quimica Nova, v.30, p. 667-676, 2007.

TAIPA, M.A.; GAMA,M. Engenharia Enzimática. Ed. Lidel- Edições técnicas Ltda, 2003.

TAN, K.T.; LEE, K.T.; MOHAMED,A.R. A glycerol-free to produce biodiesel by supercritical methyl acetate techonology: An optimization study via response surface methodology. Bioresource Technology v. 101, p. 965-969, 2010.

THE MERCK INDEX. 14ª ed. Whitehouse Station, 2006.

TONGBORIBON,K., CHEIRSILP,P., KITTIKUN, H.A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. Journal of Molecular Catalysis v.67, p. 52–59, 2010.

TORRES, B.B. Elementos de enzimologia. Biotecnologia Industrial, Ed. Edgard Blucher v.1, 2001.

VIANNI, R.; BHATTACHARYA,R. Ácidos naturais: importância e ocorrência em alimentos. Química Nova, v.19, p. 400-407, 1995.

VIEIRA, S.S. Produção de biodiesel via esterificação de ácidos graxos livres utilizando catalisadores heterogêneos ácidos. Dissetação de Mestrado da Universidade Federal de Lavras, 2011.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. Biotechnology Advances, v.25, p. 515-536, 2007.

VOET, D.; VOET, J.G. BIOQUÍMICA 3ª Edição. Ed. Artmed, 2008.

YAO, C. KOELLER, W. Diversity os cutinases from plant pathogenic fungi: Cloning and sequence analysis of a cutinase gene from Alternaria brassicicola. Phisiological and molecular plant pathology, v.44, p. 81-92, 1994.

YOO, H.Y.; SIMKHADA, J.R.; CHO, S.S.; PARK, D.H.; KIM, S.W.; SEONG, C.N. YOO,J.C. A novel alkaline lipase from Ralstonia with potencial application in biodiesel production; Bioressource Technology v.102, p.6104-6111, 2011.

ZANG, Y.; DUBE, M.A.; MCLEAN, D.D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil. Process desing and technological assessement. Bioresource Technology, v.89, p.1-16, 2003.

ZNIDARSIC. P.P.; PLAZL, I. Modelling and experimental studies on lipase-catalysed isoamyl acetate synthesis in a microreactor. Process Biochemistry, v.44, p. 1115-1121, 2009.