



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**  
Campus de São José do Rio Preto

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**THIAGO HIDEYUKI KOBE OHE**

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL ETÍLICO COM USO DE LIPASES  
EXTRACELULARES DE FUNGOS TERMOFÍLICOS**

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

**2011**

**THIAGO HIDEYUKI KOBE OHE**

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL ETÍLICO COM USO DE LIPASES  
EXTRACELULARES DE FUNGOS TERMOFÍLICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química Ambiental junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Roberto da Silva

Co-Orientador: Maurício Boscolo

**São José do Rio Preto**

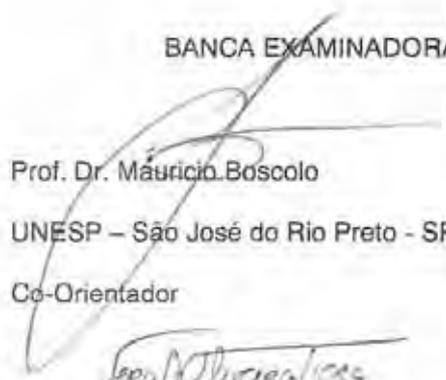
**2011**

**THIAGO HIDEYUKI KOBE OHE**

**PRODUÇÃO DE BODIESEL ETÍLICO COM USO DE LIPASES  
EXTRACELULARES DE FUNGOS TERMOFÍLICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química Ambiental junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

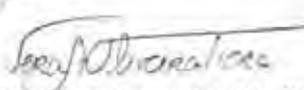
**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Maurício Boscolo

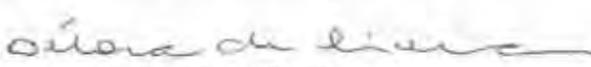
UNESP – São José do Rio Preto - SP

Co-Orientador



Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira

UNESP – São José do Rio Preto - SP



Profa. Dra. Débora de Oliveira

UFSC – Florianópolis - SC

São José do Rio Preto

2011.

“A tarefa é, não tanto para ver o que ninguém viu ainda, mas pensar o que ninguém ainda pensou, sobre o que todo mundo vê.” (Erwin Schrödinger)

Dedico esta conquista aos meus pais e minha família, que sempre me deram muito mais do que precisei.

## **Agradecimentos**

Seria impossível citar todos os nomes a quem devo gratidão. No entanto, não posso deixar de agradecer a presença de algumas pessoas em minha vida:

Aos meus pais Ana Lúcia e Mário, que sacrificaram seus sonhos para que os meus fossem realizados e me deram muito mais do que sempre precisei. E à minha querida irmã Thaís que amo tanto.

À minha companheira Marcela, pelo seu amor, carinho, amizade, compreensão, paciência e por compartilhar comigo todos os momentos.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Roberto da Silva e Prof. Dr. Mauricio Boscolo, pela valiosa orientação e amizade. Aprendi muito com vocês.

À Profa. Dra. Eleni Gomes e Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, pela ajuda, colaboração e valiosas sugestões.

Aos Professores Débora de Oliveira, José Vladimir de Oliveira, Helen Treichel e Marco Di Luccio e suas alunas Marcella e Sheila, que dividiram suas experiências, me acolheram e ajudaram em momentos difíceis.

Aos amigos de laboratório pela importantíssima amizade e ajuda no desenvolvimento deste trabalho, Ana Lúcia Ferrarezi, Janaina Pires Borges, Ticiane da Silva Magalhães, Barbara Garcia São José, Pedro H. Vendramini, Rafaela Rodrigues de Brito, Marco Recchi de Siqueira, Jéssica F. Alves e Diego Monteiro.

Ao CNPq pelo imprescindível apoio financeiro.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

<b>Índice de figuras</b> .....	x
<b>Índice de tabelas</b> .....	xiii
<b>Resumo</b> .....	xiv
<b>Abstract</b> .....	xvi
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	3
<b>2.1. Reações de biotransesterificação e produção de biodiesel</b> .....	3
<b>2.2. Lipases</b> .....	4
<b>2.3. Imobilização de lipases</b> .....	6
<b>2.4. Principais fatores que afetam o rendimento de biodiesel</b> .....	10
<b>2.4.1. Seleção e preparação das lipases</b> .....	10
<b>2.4.2. Seleção do álcool e razão molar de álcool em relação ao óleo</b> .....	10
<b>2.4.3. Seleção da temperatura e do tempo de reação</b> .....	13
<b>2.4.4. Seleção do solvente orgânico e sua função</b> .....	13
<b>2.4.5. Influência da presença de água na reação</b> .....	14
<b>2.5. Otimização da catálise enzimática</b> .....	14
<b>3. Objetivo</b> .....	16
<b>4. Material e métodos</b> .....	17
<b>4.1. Obtenção das lipases empregadas no projeto</b> .....	17
<b>4.2. Meios de cultura</b> .....	17

4.3. Meios de manutenção.....	17
4.4. Testes da atividade lipolítica (zimograma).....	17
4.5. Fermentação em estado sólido (FES).....	18
4.6. Imobilização de hifas para a síntese de biodiesel.....	18
4.7. Precipitação de proteínas.....	18
4.8. Quantificação de proteína total.....	19
4.9. Concentração do extrato enzimático bruto.....	19
4.10. Imobilização da lipase em quitosana.....	19
4.11. Determinação de atividade enzimática.....	20
4.11.1. Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de substrato cromogênico.....	20
4.11.2. Quantificação da atividade de lipase hidrolítica por titulometria.....	21
4.11.3. Ensaios para a quantificação da atividade de esterificação.....	22
4.12. Ensaios para determinação da transesterificação.....	23
4.13. Síntese de biodiesel.....	23
4.14. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	24
4.15. Síntese de biodiesel com irradiação de ultrassom.....	24
4.16. Produção de biodiesel etílico em fluxo contínuo.....	26
4.17. Quantificação dos ésteres etílicos.....	27
<b>5. Resultados e discussão.....</b>	<b>29</b>
5.1. Teste de atividade lipolítica (Zimograma) e determinação da atividade de hidrólise pelo método espectrofotométrico.....	29

<b>5.2.</b> Produção de lipase pelo <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 e <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 em função do tempo.....	33
<b>5.3.</b> Precipitação e concentração de proteínas.....	34
<b>5.4.</b> Determinação da atividade hidrolítica das hifas imobilizadas dos Microrganismos <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 e <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05.....	38
<b>5.5.</b> Resultados obtidos na quantificação da atividade de lipase hidrolítica por titulometria utilizando as hifas e lipases imobilizadas dos microrganismos <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 e <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05.....	40
<b>5.6.</b> Resultados obtidos com os ensaios da atividade de esterificação utilizando as hifas e lipases imobilizadas dos microrganismos <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 e <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05.....	41
<b>5.7.</b> Resultados obtidos com os ensaios de transesterificação utilizando as hifas e lipases imobilizadas dos microrganismos <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 e <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05.....	42
<b>5.8.</b> Resultado obtido na produção de biodiesel etílico em fluxo contínuo.....	45
<b>5.9.</b> Resultados obtidos com o Delineamento composto central rotacional (DCCR) na síntese de biodiesel.....	45
<b>5.10.</b> Resultados obtidos utilizando enzima comercial do microrganismo <i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL).....	51
<b>5.11.</b> Efeito da temperatura na produção de biodiesel.....	52
<b>5.12.</b> Efeito da variação da razão molar óleo:álcool na produção de biodiesel.....	53
<b>5.13.</b> Efeito da quantidade de enzima na produção de biodiesel.....	54
<b>5.14.</b> Efeito do tipo de óleo na produção de biodiesel.....	55

5.15. Efeito do tipo de álcool na produção de biodiesel.....	56
5.16. Efeito da irradiação de ultrassom na produção de biodiesel.....	58
6. Conclusões.....	60
7. Sugestões para trabalhos futuros.....	61
8. Referências bibliográficas.....	62

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b>	Reação de transesterificação de triglicerídeo.....	3
<b>Figura 2</b>	Estrutura de uma lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (fonte: Protein Data Bank; 1gt6).....	5
<b>Figura 3</b>	Estrutura da quitosana, quitina e celulose.....	9
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática da reação de hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil palmitato catalisada por lipase.....	20
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática para a hidrólise de triglicerídeos catalisada por lipase.....	21
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática da reação de esterificação.....	22
<b>Figura 7</b>	Esquema de reator para síntese de biodiesel etílico com irradiação de ultrassom utilizando sonda ultrassônica. (1) Agitador magnético, (2) reator de vidro, (3) banho térmico, (4) fonte de ultrassom e (5) sonda ultrassônica.....	25
<b>Figura 8</b>	Esquema de reator para síntese de biodiesel etílico com irradiação de ultrassom utilizando banho ultrassônico. (1) Banho ultrassônico, (2) agitador mecânico e (3) banho térmico.....	26
<b>Figura 9</b>	Fluxograma do processo de produção de biodiesel etílico em fluxo contínuo. (1) Reator de vidro, (2) banho de água termostaticado, (3) bomba peristáltica, (4) forno, (5) coluna de aço inox e (6) reservatório de coleta.....	27
<b>Figura 10</b>	Exemplos da detecção de atividade lipolítica com a exibição do halo luminoso em torna das colônias, visualizados por luz UV a 350 nm. a) F5.10, F2.1.2, T3.1.1 e T6.2; b) M8.1, M6.4, T3.1.2 e T1.3; c) F5.9 e d) F2.1.3.....	29
<b>Figura 11</b>	Atividade de hidrólise obtida nos ensaios para determinação de pH ótimo da lipase produzida pelo microrganismo <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 por FES, medida pelo método espectrofotométrico.....	32
<b>Figura 12</b>	Atividade de hidrólise obtida nos ensaios para determinação de temperatura ótima da lipase produzida pelo microrganismo <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 por FES, medida pelo método espectrofotométrico.....	32
<b>Figura 13</b>	Produção de lipase pelo <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 e <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 em função do tempo através da fermentação em estado sólido com bagaço de cana de açúcar. A atividade foi medida pelo método espectrofotométrico utilizando o <i>p</i> -NPP como substrato.....	34

<b>Figura 14</b>	Atividade lipolítica de hidrólise, determinada por espectrofotometria, em relação aos diferentes métodos de concentração dos extratos enzimáticos brutos produzidos pelos microrganismos F2.1.3 e TO-05. (1) Extrato bruto, (2) extrato concentrado, (3) precipitado do extrato bruto e (4) precipitado do extrato concentrado.....	37
<b>Figura 15</b>	Atividade hidrolítica determinada pelo método espectrofotométrico das hifas fúngica imobilizadas obtidas com a fermentação dos microrganismos <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 e <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 utilizando como suporte a (1) bucha vegetal, (2) bagaço de cana de açúcar e (3) farelo de soja.....	38
<b>Figura 16</b>	Hifas imobilizadas dos microrganismos (a) <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 e (b) <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 em bucha vegetal.....	39
<b>Figura 17</b>	Placa de Petri com meio Sabouraud contendo material fermentado do fungo <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 em farelo de soja.....	39
<b>Figura 18</b>	Esferas de quitosanas após a imobilização das lipases dos microrganismos (a) <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 e (b) <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3.....	40
<b>Figura 19</b>	Curva de calibração obtida com os padrões de palmitato de etila, oleato de etila, linoleato de etila e linolenato de etila utilizando octanol como padrão interno.....	44
<b>Figura 20</b>	Cromatograma obtido com a injeção de uma das soluções padrão preparada para construção da curva de calibração.....	44
<b>Figura 21</b>	Sobreposição de cromatogramas obtidos de uma solução padrão e biodiesel etílico produzido com enzima comercial (LTL) e hifa imobilizada em farelo de soja do microrganismo <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05.....	46
<b>Figura 22</b>	Curvas de contorno para o rendimento da síntese de biodiesel utilizando a enzima comercial LTL em função da (a) quantidade de enzima e razão molar e (b) quantidade de enzima e temperatura.....	49
<b>Figura 23</b>	Curvas de contorno para o rendimento da síntese de biodiesel utilizando as hifas imobilizadas do fungo <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 em função da (a) temperatura e quantidade de enzima e (b) solvente e quantidade de enzima.....	51

<b>Figura 24</b>	Efeito da temperatura na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:3 (óleo de soja:etanol anidro), 5% da LTL a 150 rpm. A variou-se a temperatura de 35 a 60°C. (■) 12 h de reação; (○) 24 h de reação.....	52
<b>Figura 25</b>	Efeito da variação da razão molar óleo:álcool na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, óleo de soja, etanol anidro, 5% da LTL a 35°C e 150 rpm. Variou-se a razão molar de óleo:etanol anidro de 3 a 12. (■) 12 h de reação; (○) 24 h de reação.....	54
<b>Figura 26</b>	Efeito da quantidade de enzima na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:3 (óleo de soja:etanol anidro) a 35°C e 150 rpm. A quantidade de enzimas foi variada de 1 a 7,5% (m/m). (1) 1% de enzima, (2) 2,5% de enzima, (3) 5% de enzima; (4) 7,5% de enzima.....	55
<b>Figura 27</b>	Efeito do tipo de óleo na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:3 (óleo:etanol anidro), 5% de LTL a 35°C e 150 rpm. Os óleos usados foram algodão, canola, soja, girassol e oliva.....	56
<b>Figura 28</b>	Efeito do tipo de álcool na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:3 (óleo:álcool anidro), 5% da LTL a 35°C e 150 rpm. Os álcoois utilizados foram metanol, etanol isopropílico e butanol.....	57
<b>Figura 29</b>	Efeito da irradiação de ultrassom na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:4 (óleo:etanol anidro), 5% da LTL a 35°C, sob irradiação ultrassônica de 10 segundos a cada 15 minutos durante 12 h. Variou-se a potência do ultrassom de 10 a 90%.....	58

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b>	Biodiesel produzido por várias lipases imobilizadas.....	8
<b>Tabela 2</b>	Transesterificação catalisada por lipases com diferentes alcoóis.....	12
<b>Tabela 3</b>	Valores utilizados no DCCR para a produção de biodiesel.....	24
<b>Tabela 4</b>	Relação das linhagens fúngicas termofílicas testadas para detecção de atividade lipolítica em placa de Petri.....	30
<b>Tabela 5</b>	Atividade hidrolítica das linhagens fúngicas termofílicas selecionadas determinadas pelo método espectrofotométrico.....	31
<b>Tabela 6</b>	Precipitação com etanol dos extratos brutos das lipases produzidas pelos microrganismos <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 e <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 por FES.....	36
<b>Tabela 7</b>	Atividade de hidrólise das hifas imobilizadas dos microrganismos <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 e <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 determinadas pelo método titulométrico.....	41
<b>Tabela 8</b>	Atividade de esterificação das hifas e lipases imobilizadas dos microrganismos <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 e <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05 determinadas pelo método titulométrico.....	42
<b>Tabela 9</b>	Rendimentos obtidos nas reações de transesterificação com os materiais fermentados e enzimas imobilizadas em quitosana dos microrganismos <i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3 e <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05.....	43
<b>Tabela 10</b>	Matriz do planejamento experimental completo (valores codificados) com os rendimentos das reações de transesterificação com a enzima comercial LTL em 24 horas.....	47
<b>Tabela 11</b>	Matriz do planejamento experimental completo (valores codificados) com os rendimentos das reações de transesterificação com a hifa imobilizada em farelo de soja do microrganismo TO-05 em 96 horas.....	48

## Resumo

### PRODUÇÃO DE BIODIESEL ETÍLICO COM USO DE LIPASES EXTRACELULARES DE FUNGOS TERMOFÍLICOS

Thiago Hideyuki Kobe Ohe

Outubro de 2011

Orientador: Roberto da Silva

Co-Orientador: Maurício Boscolo

A produção de biodiesel por catálise enzimática tem sido uma área de grande investigação, vários pesquisadores vem tentando otimizar diferentes parâmetros da reação de transesterificação, o tipo e a concentração da enzima utilizada, a razão molar álcool:óleo:água, temperatura, pH, tipo de solvente e ácidos graxos livres são alguns fatores importantes que influenciam esse tipo de reação. O presente trabalho tem como objetivo principal a produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais com etanol anidro e hidratado utilizando cepas fúngicas termofílicas e lipase comercial em diferentes condições estequiométricas, tempo, teor de água, temperatura, agitação, superfície de contato e irradiação de ultrassom. As linhagens fúngicas *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 foram selecionadas através da detecção de atividade lipolítica em placas de Petri com ágar e Rodamina B. Os extratos enzimáticos foram obtidos por fermentação em estado sólido para determinação das atividades de hidrólise e esterificação. E as imobilizações das hifas dos fungos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 foram realizadas em bucha vegetal, bagaço de cana de açúcar e farelo de soja e as imobilizações de lipases em quitosana. Os microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 apresentaram maiores atividades de hidrólise com as hifas imobilizadas em bagaço de cana de açúcar, 12 e 6 U/g, respectivamente. Nos ensaios para determinação da atividade de

esterificação a hifa imobilizada em bagaço de cana de açúcar do *Thermomyces lanuginosus* TO-05 apresentou atividade de 107 U/g. A produção de biodiesel etílico foi realizada utilizando-se a enzima comercial LTL e as hifas imobilizadas em farelo de soja do fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05, que apresentaram maior rendimento nos ensaios de transesterificação. Rendimentos acima de 10% foram obtidos com as hifas imobilizadas em farelo de soja do fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 nas sínteses de biodiesel. A temperatura de 35 °C, razão molar de 1:3 e 5% de enzima foram condições ótimas obtidas para a catálise com a LTL. Quando se testou o tipo de óleo e álcool, os maiores valores de conversão foram observados com o óleo de oliva e soja, e o etanol. Com a irradiação de ultrassom (10%) foi possível atingir uma da conversão de ésteres etílicos de 99%, mostrando um efeito positivo sobre a produção de biodiesel pela enzima LTL.

**Palavras-chave:** Biodiesel etílico. Ultrassom. Fermentação em estado sólido. *Thermomyces lanuginosus* TO-05. Imobilização de lipases.

## Abstract

### ETHYL BIODIESEL PRODUCTION WITH THE USE OF LIPASES FROM THERMOPHILIC FUNGI

Thiago Hideyuki Kobe Ohe

October 2011

Advisor: Roberto da Silva

Co-Advisor: Mauricio Boscolo

Biodiesel production by enzymatic catalysis have been widely area of research, several researchers have been trying to optimize different parameters of the transesterification reaction, source and concentration of enzyme, molar ratio of alcohol:oil:water, temperature, pH, type of solvent and free fatty acids are some important factor that influence this type of reaction. The main goal of the present work is the production of biodiesel by transesterification of vegetable oils with ethanol anhydrous and hydrated using thermophilic fungal strains and commercial lipase in different stoichiometric conditions, time, water content, temperature, stirring, surface contact and ultrasound irradiation. Strains of *Myceliophthora* sp F2.1.3 and *Thermomyces lanuginosus* TO-05 were screened by detection of lipolytic activity in Petri dishes with agar and Rhodamine B. Lipases were obtained by solid state fermentation and their hydrolysis and esterification activities was determined. The hyphae immobilization of *Myceliophthora* sp F2.1.3 and *Thermomyces lanuginosus* TO-05 was performed in loofah vegetable, sugar cane bagasse and soybean bran and lipase immobilization on chitosan. Microorganisms *Myceliophthora* sp F2.1.3 and *Thermomyces lanuginosus* TO-05 showed higher hydrolysis activities with the hyphae immobilized in sugarcane bagasse, 12 and 6 U/g, respectively. The hyphae immobilized in sugar cane bagasse from *Thermomyces lanuginosus* TO-05 showed esterification activity of 107 U/g. The production of ethylic biodiesel was performed using commercial enzyme LTL and immobilized hyphae in soybean bran from *Thermomyces lanuginosus* TO-05, wich showed higher transesterification yield. Yields above 10% were obtained with immobilized hyphae in soybean bran from *Thermomyces lanuginosus* TO-05 in biodiesel synthesis. Temperature of 35°C, molar ratio of 1:3 and 5% enzyme were the best conditions for catalysis with *Thermomyces*

*lanuginosus*. When the type of oil and alcohol were tested, the highest conversion values were observed with olive and soybean oil, and with ethanol. The ultrasonic irradiation (10%) allowed 99% of ethylic esters conversion, showing a positive effect on biodiesel production by the commercial lipase LTL.

**Keywords:** Ethylic biodiesel. Ultrasound. Solid state fermentation. *Thermomyces lanuginosus* TO-05. Immobilization of lipases.

## 1. Introdução

Devido ao esgotamento das reservas mundiais de petróleo, do aumento das preocupações ambientais e da grande demanda por fontes alternativas de combustíveis, esforços tem sido direcionado para a produção de biodiesel, um combustível limpo e renovável, que é considerado como um dos principais substitutos do diesel de origem fóssil.

Quimicamente, o biodiesel é constituído de uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa. É biodegradável e de baixa toxicidade e pode ser obtido a partir de fontes biológicas como óleos vegetais e gorduras animais.

O biodiesel é produzido por reação de esterificação de ácidos graxos ou por reação de transesterificação de óleos vegetais e/ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta na presença de um catalisador. A síntese é classificada como produção química ou enzimática de acordo com os catalisadores utilizados no processo.

Em muitos países, o metanol é o álcool mais empregado para a produção de biodiesel, devido ao seu menor custo em comparação com outros álcoois, ser comercializado com alto teor de pureza e não ser higroscópico. Entretanto, é extremamente tóxico e de origem petroquímica.

Considerando a dimensão do território brasileiro, a possibilidade da diversidade no cultivo de oleaginosas e do forte setor alcooleiro, a produção de biodiesel etílico é potencialmente vantajosa. O maior obstáculo para produção do biodiesel etílico está no fato que a presença de água no etanol hidratado favorece a formação de sabão durante a reação de transesterificação por catálise alcalina, o que provoca a emulsificação do glicerol resultante e dificulta consideravelmente sua separação dos ésteres alquílicos produzidos. Além disso, devido às etapas extras de purificação que devem ser adicionadas ao processo, aumentando os custos de produção para obtenção de produtos que tenham as características comerciais regulamentadas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

Uma das rotas mais promissoras de se processar a transesterificação de glicerídeos com etanol hidratado é a catálise enzimática. Este campo da biotecnologia ainda carece de muitos estudos, mas resultados publicados por diferentes autores vêm demonstrando que é uma tecnologia produtiva muito promissora (CHEN et al., 2008).

O sucesso neste campo de pesquisa terá um impacto imediato em toda a cadeia de produção de biocombustíveis, pois além de reduzir consideravelmente os custos de produção e empregar um insumo químico menos tóxico (etanol), o processo como um todo terá uma base biológica e renovável.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Reações de biotransesterificação e produção de biodiesel.

A principal função biológica das lipases é de hidrolisar ésteres, especialmente glicerídeos de cadeia longa, produzindo ácidos graxos livres e glicerol, porém, também são capazes de catalisar reações de esterificação e de transesterificação (FREITAS et al., 2007; TING et al., 2006; NOUREDDINI et al., 2003; VILLENEUVE et al., 2000). A aplicabilidade da transesterificação não está restrita somente à escala laboratorial, processos industriais como a síntese de fármacos e cosméticos, de produtos derivados do leite, componentes de detergentes e outros também utilizam as lipases (KAZLAUKAS; BORNSCHEUER, 1998).

Ting et al. (2006) demonstraram que essas enzimas apresentam atividades no meio reacional na forma livre ou imobilizadas em algum polímero ou gel, sem a necessidade de altas temperaturas e de altas pressões.

Vários processos industriais relevantes utilizam esta reação para a produção de diferentes compostos. Na transesterificação de óleos vegetais, moléculas de glicerídeos e álcoois são reagidas para produção de ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel).

Todo o processo é uma seqüência de três reações consecutivas reversíveis, com a formação de mono e diglicerídeos como produtos intermediários (SUAREZ et al., 2007; SCHUCHARDT et al., 1998). A Figura 1 representa a reação de transesterificação de triglicerídeo.



Figura 1 – Reação de transesterificação de triglicerídeo.

A produção de biodiesel por catálise enzimática tem sido uma área de pesquisa muito ativa, e vários pesquisadores vem tentando otimizar diferentes parâmetros da reação de transesterificação, escolha de fontes de lipases, suportes

para imobilização do catalisador, fontes de ácidos graxos, receptores e doadores de grupos acila entre outros (BAJAJ et al., 2010).

O tipo e a concentração da enzima utilizada, a razão molar álcool:óleo:água, temperatura, pH, íons metálicos e ácidos graxos livres são fatores importantes que influenciam esse tipo de reação.

As lipases tem sido muito utilizadas neste tipo de processo, pois algumas são tolerantes a solventes orgânicos e temperaturas elevadas, não requerem o uso de coenzimas, além de serem consideradas altamente específicas. Desse modo, é importante estabelecer as condições ótimas de transesterificação tendo em vista as características desejadas do produto obtido para aplicação industrial específica (SUAREZ et al., 2009; SCHUCHARDT et al., 1998).

Os fatores que têm inibido a implementação da biocatálise na produção de biodiesel em escala industrial são o custo elevado das enzimas e número reduzido de fabricantes destes biocatalisadores (DABDOUB; BRONZEL, 2009).

## **2.2. Lipases.**

As enzimas possuem a função de catalisar reações nos sistemas biológicos podendo aumentar a velocidade de uma reação em até  $10^{14}$  vezes. Atualmente, cerca de 4.000 enzimas são conhecidas e destas, 200 apresentam interesse comercial sendo a maioria de origem microbiana (SHARMA et al., 2001).

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres formados a partir do glicerol e ácidos graxos de cadeias longas. Tais enzimas vêm sendo intensamente investigadas para uma série de aplicações, dentre elas na transesterificação de óleos e gorduras para produção de biodiesel (YI-HSU e VALI, 2005; CASTRO et al., 2004; PARK e PIZARRO, 2003; SOUMANOU E BORNSHEUER, 2003; SHIMADA et al., 2002; FUKUDA et al., 2001).

Normalmente as lipases são ativadas por uma interface água-óleo e apresentam quimioseletividade, regioseletividade e estereoseletividade (TREVISAN, 2004; SHARMA et al., 2001).

No campo industrial, as lipases são largamente utilizadas no processamento de óleos e gorduras, como componentes de detergentes, na síntese de fármacos e cosméticos, de produtos derivados do leite e outros (KAZLAUKAS; BORNSCHEUER, 1998). Podem ser usadas também para acelerar a degradação de

resíduos de gordura (MENDES et al., 2005; MASSE et al., 2001) e derivados (SHARMA et al., 2001), sendo aplicadas principalmente em biorreatores, constituindo importante ferramenta em tratamento de resíduos domésticos e industriais (SHARMA et al., 2001; BALCÃO et al., 1996; NYBROE et al., 1992).

Além de catalisarem reações de hidrólise, as lipases catalisam reações de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação e transesterificação (JAEGER e EGGERT, 2002). Como exemplo sabe-se que lipases produzidas por *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* (Figura 2) vêm sendo estudadas na produção de biodiesel (RANGANATHAN et al., 2008).



**Figura 2** – Estrutura de uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* (fonte: Protein Data Bank; 1gt6).

Lipases produzidas por microrganismos termofílicos têm sido cada vez mais utilizadas, pois apresentam termoestabilidade e outras propriedades intrínsecas que conferem a elas estabilidade a agentes desnaturantes e a maiores variações de pH.

Maior resistência à desnaturação por alguns solventes orgânicos também tem sido relatada como uma propriedade das enzimas termoestáveis. Devido a essas características, elas apresentam vantagens de aplicação em alguns processos industriais, o que possibilita a utilização de altas temperaturas e evita contaminações por microrganismos mesofílicos, reduz a viscosidade, aumenta o coeficiente de

difusão dos substratos, aumentando assim o rendimento dos processos (GOMES et al., 2007).

O isolamento de microrganismos termofílicos pode ser feito com sucesso a partir de solos, pilhas de compostagem e fontes termais. Devido à sua alta estabilidade, as lipases termoestáveis podem ser usadas em sua forma de enzima nativa, em membranas de reator, imobilizadas covalentemente ou adsorvidas em resinas de troca iônica, cavidades fibrosas ou ligadas a cristais (ANDERSCH et al., 1997).

Os microrganismos produtores de lipases têm sido encontrados em diversos habitats como: resíduos industriais de óleos vegetais, laticínios, em solos contaminados com óleo, em sementes oleaginosas e alimentos em decomposição (TREVISAN, 2004).

No Brasil existem alguns grupos de pesquisa desenvolvendo excelentes trabalhos nessa área (TREICHEL et al., 2010; CUNHA et al., 2009; MITCHELL et al., 2008; BERNARDES et al., 2007; VIEIRA et al., 2006; CASTRO-OCHOA et al., 2005).

### **2.3. Imobilização de lipases.**

Fundamentos da enzimologia em meio aquo-restrito são recentes e há muito que esclarecer ainda, uma vez que o ambiente natural e biológico das enzimas é o meio aquoso (KRIEGER ET AL., 2004; KLIBANOV, 2001; LIMA E ANGNES, 1999). E devido a sua habilidade catalítica em solventes orgânicos, estereoseletividade e possibilidade de utilização em larga escala de pH e temperatura, a aplicação das lipases em meios aquo-restritos vem sendo intensamente estudadas (PILISSÃO; NASCIMENTO, 2006).

A maior desvantagem da produção do biodiesel pelo processo enzimático é o custo, por isso lipases imobilizadas tem sido muito utilizadas em pesquisas recentes (TAMALAMPUDI et al., 2008). O uso em processo contínuo e o reaproveitamento do material biológico também são vantagens propiciadas pela imobilização (CARVALHO et al., 2006).

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em um suporte com retenção da sua atividade catalítica. Existem vários métodos para a imobilização de lipases, incluindo adsorção, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e cross-linking (TAN et al., 2010). Esses métodos

de imobilização têm sido empregados para melhorar a estabilidade de lipases. A Tabela 1 ilustra alguns exemplos.

Porém, este procedimento pode se tornar caro, pois na maioria das vezes requer a concentração do meio de cultura e sua posterior imobilização, quando não a purificação da enzima. Neste contexto, iniciou-se uma grande busca por inovação de procedimentos de imobilização e de suportes de baixo custo, com a finalidade de reduzir os custos do processo, diminuir o valor do produto final e manter a qualidade do biocatalisador.

Vem sendo amplamente divulgado na literatura os procedimentos de imobilização de lipases com quitosana e de imobilização de hifas fúngicas para aplicação como biocatalisador na produção de biodiesel (MENDES et al., 2011; TAMALAMPUDI et al., 2008).

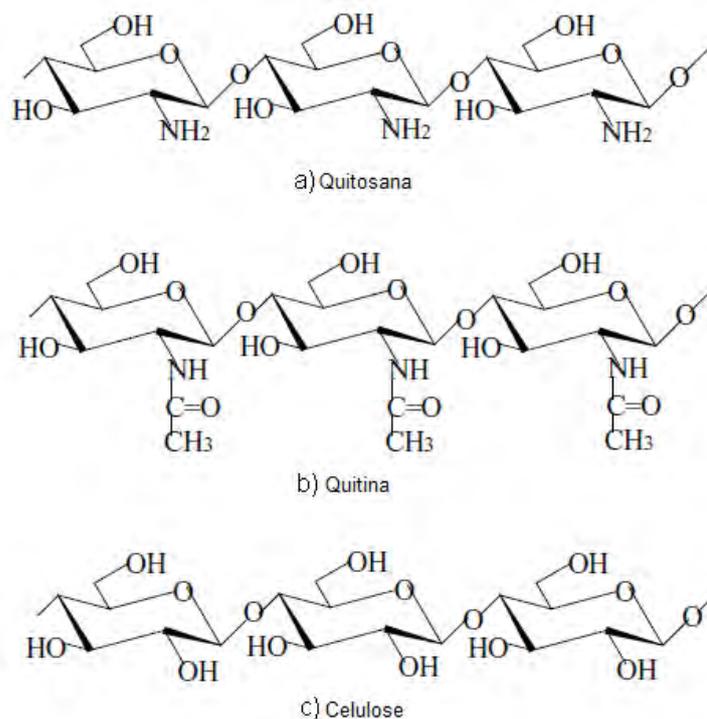
**Tabela 1** – Biodiesel produzido por várias lipases imobilizadas (JEGANNATHAN et al., 2008).

Método de imobilização	Suporte	Origem da lipase	Óleo	Acil receptores	Rendimento (%)
Adsorção	Resina acrílica	<i>Candida antártica</i>	Óleo vegetal, óleo de fritura	Metanol, 1-propanol, acetato de metila	>90
Adsorção	Membrana têtil	<i>Candida</i> sp. 99-125	Banha de porco, óleo de fritura	Metanol	>87
Adsorção	Polipropilento, Toyonite 200-M	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo vegetal	Metanol	>87
Adsorção	Celite, terra diatomácea	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de pinhão manso, óleo vegetal	Etanol, 2-butanol	>98
Adsorção	Resina aniônica, celite 545	Pancreas de porco, <i>Rhizomucor Miehei</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i>	Óleo de girassol, óleo de soja, óleo de pinhão manso	Etanol, metanol	>80
Ligação covalente	Sílica-PVA	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo de babaçu, óleo de canola	Etanol, metanol	>97
Encapsulamento	Suporte hidrofóbico sol-gel	<i>Pseudomonas cepacia</i> , NS44035	Óleo de soja, trioleína	Metanol, etanol	60
Ligação cruzada	Glutaraldeído	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de mahua	Etanol	92

A aplicação de hifas imobilizadas como biocatalisador tem se mostrado eficiente com uma ampla variedade de microrganismos e apresenta várias vantagens sobre outros métodos de imobilização: aditivos químicos não são necessários, não há necessidade de pré-produção de células, manipulação asséptica de partículas é desnecessária, partículas são reutilizáveis e duráveis contra o corte mecânico, o aumento de escala em biorreator é fácil e os custos são baixos em comparação com outros métodos (BAJAJ et al., 2011; FUKUDA et al., 2008, 2001).

A quitosana (Figura 3a) pode ser obtida a partir de carapaças de crustáceos por meio da desacetilação da quitina (Figura 3b), segundo polímero mais abundante na natureza, que é um resíduo abundante e rejeitado pela indústria pesqueira, de baixo custo, renovável e biodegradável. Sua utilização pode vir a ser de grande importância econômica e ambiental.

A quitosana diferencia-se da celulose (Figura 3c) por ser predominantemente formada por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, onde as hidroxilas são substituídas por grupos amino. A solubilidade em meio ácido diluído e a protonação do grupo amino dá à quitosana propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (KRAJEWSKA, 2004).



**Figura 3** – Estrutura química da quitosana, quitina e celulose.

Entre as importantes propriedades conferidas a quitosana protonadas, destaca-se a quelação de íons metálicos interagindo concomitantemente com enzimas e gorduras. Em meio ácido, a quitosana se comporta como um polieletrólito de alta densidade de carga positiva por cada unidade de glicosamina, favorecendo as enzimas que possuam cargas negativas e possibilitando forte interação entre a proteína e o polímero (MENDES et al., 2011).

## **2.4. Principais fatores que afetam o rendimento de biodiesel.**

### **2.4.1. Seleção e preparação das lipases.**

Poucas lipases foram encontradas com capacidade para realizar eficientemente síntese de biodiesel e somente algumas delas são capazes de atuar em ambos os sistemas: em meios com solventes orgânicos e em meios livre de solventes. A maioria desses catalisadores são preparações comerciais de enzimas extracelulares que estão imobilizadas em diferentes suportes (DU et al., 2005; WATANABE et al., 2002; ISO et al., 2001).

A especificidade das lipases pelo substrato consiste na capacidade de distinguir características estruturais das cadeias dos doadores de grupos acila, como o comprimento, o número, posição, ou configuração das duplas ligações, ou a presença de grupos ramificados e também, reconhecer a natureza da fonte do grupo acila, se tem origem de um ácido graxo livre, éster alquílico ou éster de glicerol.

Nas reações de triglicerídeos e álcoois, as lipases distinguem o comprimento e o tipo do ácido graxo contido no triglicerídeo e o comprimento da cadeia do álcool. Por exemplo, a lipase produzida pelo microrganismo *R. oryzae* distingue ácidos graxos com diferentes comprimentos. Em condições ótimas prefere ácidos graxos C<sub>18</sub> e álcoois C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> (GHAMGUI et al., 2004).

Muitos trabalhos publicados evidenciam que a seleção e preparação de lipases são de extrema importância para a produção de biodiesel (DU et al., 2005; BAN et al., 2002, 2001; GOH et al., 1993).

### **2.4.2. Seleção do álcool e razão molar de álcool em relação ao óleo.**

A escolha do álcool para a síntese enzimática de biodiesel está relacionada com a seleção e preparação das lipases.

Os álcoois mais utilizados na produção de biodiesel são: metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol e isobutanol. Quanto maior a massa molecular do álcool, maior será sua densidade e ponto de ebulição. Entre estes álcoois, o metanol e o etanol são os mais baratos e produzidos em maior escala.

No entanto, estes dois álcoois são agentes desnaturantes mais fortes que os demais álcoois alifáticos e inativam as enzimas (NELSON et al., 1996). Além disso, a taxa de reação da transesterificação catalisada pela lipase geralmente aumenta com o comprimento da cadeia do álcool.

O rendimento geral da reação por catálise enzimática depende da interação entre a velocidade da reação e a taxa de desnaturação da enzima. A quantidade admissível de álcool adicionado à mistura de reação de transesterificação depende da resistência da enzima à concentração de álcool e de água.

A presença simultânea de metanol e água pode acelerar a desnaturação da enzima, enquanto que em sistemas contendo etanol, propanol, isopropanol butanol ou isobutanol, a presença de uma pequena quantidade de água é necessária (HAAS et al., 2002). A Tabela 2 apresenta os rendimentos de processos catalisados por lipases com diferentes tipos de álcoois.

Uma das vantagens da transesterificação enzimática consiste na utilização de álcoois contendo uma pequena quantidade de água, que não podem ser empregados em processos onde catalisados com catalisadores químicos. Por exemplo, o etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos ou retificado (95%) pode ser usado como substrato em reações de transesterificação catalisadas por lipases (RANGANATHAN et al., 2008; SOLOMON et al., 2007; SHIMADA et al., 2002).

Além disso, os ésteres etílicos de ácidos graxos provenientes de processos catalisados por enzimas são superiores aos seus homólogos metílicos, obtidos por meio de catálise com produtos químicos devido à menor viscosidade e maior ponto de entupimento de filtro a frio.

Muitos pesquisadores reconheceram que um dos principais fatores que afetam a produção de biodiesel é a razão molar de álcool:triglicerídeo (LEUNG et al., 2010; LEUNG e GUO, 2006; ZHANG et al., 2003).

**Tabela 2** – Transesterificação catalisada por lipases com diferentes alcoóis (ANTCZAK et al., 2009).

Álcool	Triglicerídeo	Lipase	Solvente	Tempo (h)	Rendimento (%)
Metanol	Sebo	<i>Mucor miehei</i>	Sem solvente	5	19
			Hexano	5	73
			Hexano	8	94
	Girassol	<i>P. fluorescens</i>	Sem solvente	24	3
			Éter	24	79
	Algodão	Novozym-435	Sem solvente	7	91
			Terc-butanol	10	90
	Soja	<i>P. cepacia</i>	Sem solvente	48	93
	Palma		8	15	
	Coco		8	traços	
Etanol	Sebo	<i>Mucor miehei</i> IM60	Sem solvente	5	65
			Hexano	5	98
			Sem solvente	5	83
	Girassol	<i>P. fluorescens</i>	Sem solvente	24	82
	Palma	<i>P. cepacia</i>	8	72	
	Coco	8	35		
	Isopropanol	Sebo	<i>C. Antarctica</i>	Sem solvente	16
Hexano				16	51
Palma		<i>P. cepacia</i>	Sem solvente	8	24
Coco		8	16		
Isobutanol		Sebo	<i>Mucor Miehei</i>	Sem solvente	5
	Hexano			5	98
	Palma	<i>P. cepacia</i>	Sem solvente	8	42
	Coco	8	40		
2-butanol	Sebo	<i>C. antarctica</i>	Sem solvente	16	96
			Hexano	16	83
1-butanol	Palma	<i>P. cepacia</i>	Sem solvente	8	42
	Coco	8	40		

### **2.4.3. Seleção da temperatura e do tempo de reação.**

A temperatura influencia claramente a reação e o rendimento da síntese de biodiesel. O aumento da temperatura de reação diminui a viscosidade de óleos e resulta em aumento na taxa de conversão de ésteres bem como a redução do tempo de reação. No entanto, quando a temperatura da reação aumenta além o nível ótimo, o rendimento da síntese de biodiesel diminui devido a aceleração da reação de saponificação dos triglicerídeos e a evaporação do álcool reagente (EEVERA et al., 2009; LEUNG; GUO, 2006). Não se pode perder de vista que a estabilidade do biocatalisador está condicionada a temperatura da reação.

A taxa de conversão de ésteres de ácidos graxos aumenta com o tempo de reação, pois no início a reação é lenta devido à baixa dispersão do álcool no óleo, e com o desenvolvimento da reação a taxa cinética de conversão aumenta rapidamente.

Normalmente, o rendimento atinge um máximo em tempo de reação menor que 12 horas (LEUNG et al., 2010; ANTCZAK et al., 2009). Além disso, tempo de reação em excesso levará a uma redução no rendimento do produto devido a indução da reação de transesterificação para o sentido inverso, resultando em uma perda de ésteres, causada pela produção de ácidos graxos e formação de sabão e também pela inativação da enzima devido a adsorção de glicerol no suporte da enzima, impedindo os substratos de chegarem até o sítio ativo da enzima (LEUNG et al., 2010; ANTCZAK et al., 2009).

### **2.4.4. Seleção do solvente orgânico e sua função.**

O uso de solvente orgânico apolar na síntese de biodiesel por catálise enzimática garante a solubilidade dos substratos e a proteção das enzimas da desnaturação devido às altas concentrações de álcoois. Em alguns casos, o sistema ideal para a reação enzimática consiste em uma mistura de solventes orgânicos (ANTCZAK et al., 2004).

Solventes orgânicos eliminam a necessidade de adição de álcool em porções. Entretanto, a remoção do solvente orgânico do meio reacional após a reação pode ser complicada. Sua inflamabilidade, volatilidade e toxicidade devem ser levadas em consideração (ANTCZAK et al., 2009). Muitos pesquisadores realizaram a síntese de biodiesel com diversos solventes orgânicos, e os rendimentos desses processos

geralmente dependiam da preparação da lipase e composição do triglicerídeo (ROYON et al., 2007; LI et al., 2006; NIE et al., 2006; SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003).

Recentemente, os processos de transesterificação foram também realizados com solventes menos convencionais, como por exemplo gases supercrítico como o butano, propano e o dióxido de carbono que é bem conhecido por sua compatibilidade com as lipases. O uso do CO<sub>2</sub> também é considerado interessante devido à sua baixa toxicidade e não-inflamabilidade (TRENTIN et al., 2011; BRUSAMARELO et al., 2010; KNEZ; HABULIN, 2002; CERNIA et al., 1998).

#### **2.4.5. Influência da presença de água na reação.**

Na produção de biodiesel por catálise enzimática em meio não aquoso, a água desempenha várias funções e tem forte influência sobre a atividade catalítica e a estabilidade da lipase (LU et al. 2009). Um pequeno teor de água é necessário para manter a enzima ativa em solventes orgânicos de baixa polaridade.

Por outro lado, a água pode tomar parte na transesterificação, influenciando o equilíbrio (KAIEDA et al. , 1999). A lipase possui uma característica única, a de atuar na interface entre as fases aquosa e orgânica, por isso a atividade da lipase geralmente depende da área interfacial.

Muitos estudos referentes à determinação e influência do teor de água são encontrados na literatura (LU et al., 2007, 2008, 2009; LV et al., 2008; NIE et al., 2006; TAN et al., 2006). A água facilita o aumento da área interfacial disponível, portanto, ajuda a manter a atividade lipásica. No entanto, o excesso de água pode tornar a lipase mais flexível e levar a algumas reações colaterais indesejadas, como a hidrólise, especialmente no processo de transesterificação. Consequentemente o teor ideal de água necessária para maximizar a atividade enzimática pode ser determinado para a maioria das lipases (LU et al, 2009; JEGANNATHAN et al., 2008).

#### **2.5. Otimização da catálise enzimática.**

Esforços têm sido empregados no desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades superiores e também na elucidação de técnicas que permitam o uso

repetido ou mesmo em processos contínuos (VYAS et al., 2009; CARVALHO et al., 2006).

O emprego de ultrassom também tem se mostrado muito eficaz na catálise enzimática. A irradiação contínua ou intermitente de ondas sonoras de alta frequência favorece a ação de diferentes enzimas em sistemas monofásicos e bifásicos (FIAMETTI et al., 2011; BABICZ et al., 2010; ROKHINA et al., 2009; SHAH e GUPTA, 2008) e também foi investigada neste projeto.

### **3. Objetivo**

O objetivo geral deste trabalho foi a produção de biodiesel por catálise enzimática a partir de cepas fúngicas termofílicas com capacidade de produzir lipases com expressiva atividade de transesterificação entre glicerídeos (vegetais) com o etanol em interface óleo/água.

Como objetivos específicos pode-se citar: o estudo do uso de lipases de cepas fúngicas termofílicas e lipase comercial no processo de produção do biodiesel por transesterificação de óleos vegetais com etanol anidro e hidratado em diferentes condições estequiométricas, tempo, teor de água, temperatura, agitação, superfície de contato e irradiação de ultrassom; e analisar quimicamente os produtos da reação.

## **4. Material e métodos**

### **4.1. Obtenção das lipases empregadas no projeto**

Foram testadas linhagens fúngicas termofílicas isoladas pelos colaboradores do grupo do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto, a partir de resíduos gordurosos, frigoríficos e de áreas de plantação de cana de açúcar (Tabela 3). Também foi testada uma lipase comercial (LTL), produzida pela empresa Sigma-Aldrich obtida do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* com atividade hidrolítica especificada em rótulo de 3.423 U/g, e utilizada como referência nas reações de transesterificação.

### **4.2. Meios de cultura**

Os meios de cultura para seleção e crescimento das linhagens fúngicas utilizado foi o meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) contendo (g/L): 1,0 peptona; 10,0 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 10,0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0 CaCl<sub>2</sub>; 25,0 óleo de soja e 0,8 de emulsificante (Tween 80); 5,0 de solução de elementos traços (22,0 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 11,0 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 5,0 MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 5,0 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,6 CoCl<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O; 1,6 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 1,1 (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O; 50,0 de EDTA) e ajustou-se o pH para 6,0. Aos meios sólidos adicionou-se 30,0 g/L de ágar.

### **4.3. Meios de manutenção.**

Para os repiques periódicos foi utilizado o meio Sabouraud, constituído de (g/L): 10 de peptona, 40 de dextrose e 15 de ágar em tubos de ensaio ou placas de Petri com incubação à 45°C.

### **4.4. Testes da atividade lipolítica (zimograma).**

O meio nutriente descrito em 4.3 foi acrescido de 0,001% de Rodamina B e 0,4% de NaCl. As placas contendo o meio foram demarcadas em quatro partes iguais com caneta heliográfica, sendo inoculadas em cada uma das partes, por meio de picada, uma cultura isolada. A incubação foi realizada a 45°C durante 48 h, e a produção de lipase foi identificada por um halo laranja em torno das colônias e visualizado por luz UV a 350 nm, indicando a presença da atividade lipolítica extracelular (CASTRO-OCHOA et al., 2005).

#### **4.5. Fermentação em estado sólido (FES).**

A FES foi realizada em sacos de polipropileno (26,5 cm x 15 cm) contendo 5 g de bagaço de cana de açúcar. O pré-inóculo foi obtido a partir do cultivo dos fungos por três dias em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL do meio sólido citado no item 4.2. Foram adicionados 50 mL de solução nutriente (2% peptona, 0,2%  $K_2HPO_4$ , 0,05%  $MgSO_4$  e 2% azeite de oliva) à cada Erlenmeyer para a suspensão de esporos e micélios. O volume obtido com a suspensão foi transferido para os sacos de polipropileno garantindo uma umidade de 70% ao substrato. A incubação ocorreu a 45°C com variação do tempo de incubação dependendo da produção de cada fungo. A solução enzimática foi extraída com 50 mL de água destilada, agitação de 100 rpm durante 30 minutos e filtrada. O filtrado foi centrifugado em uma centrífuga Hitachi CR22GIII a 10.000 x g, 5°C por 15 minutos, utilizando-se o sobrenadante como solução enzimática bruta.

#### **4.6. Imobilização de hifas para a síntese de biodiesel.**

A imobilização de hifas foi realizada através da FES descrita no item 4.5 sem a etapa de extração da solução enzimática, utilizando bagaço de cana de açúcar, farelo de soja (triturados e homogeneizados em peneiras com abertura de 1 mm) e pedaços de bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) picadas em cubos de aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup>. Os pedaços de bucha vegetal foram fervidos com água destilada, trocando-se a água por 3 vezes e secos em estufa a 60°C.

Após 96 horas de fermentação a 45°C em uma câmara de fluxo laminar, os sólidos fermentados foram lavados e filtrados sob vácuo inicialmente com n-hexano e em seguida com tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7 com a finalidade de garantir que compostos remanescentes da fermentação (óleo, ácidos graxos e lipídeos) não interferissem em posteriores determinações e reações.

A secagem dos materiais fermentados (substrato utilizado na FES com as hifas fúngicas) foi realizada em um liofilizador Thermo Scientific RVT 4104 durante 48 horas.

#### **4.7. Precipitação de proteínas.**

A solução de proteínas do extrato enzimático bruto foi fracionada com álcool comercial gelado em concentrações de 50, 67, 75 e 80% e deixado em repouso por

24 horas. O precipitado foi separado por centrifugação (10.000 x g por 20 minutos a 5°C) e ressuspenso em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7.

Os testes de atividade de lipase do sobrenadante e do precipitado foram realizados conforme descrito no item 4.11.1 e a quantificação de proteína total conforme descrito no item 4.8.

#### **4.8. Quantificação de proteína total.**

A determinação da concentração de proteínas totais da solução enzimática bruta e da solução fracionada foi realizada através do método de Bradford (1976), usando soroalbumina como padrão.

#### **4.9. Concentração do extrato enzimático bruto.**

A concentração do extrato bruto foi realizada por ultrafiltração usando-se sistema QuixStand™ Benchtop da Amersham Bioscience com uma membrana de corte limite de 10 KDa em massa molecular.

#### **4.10. Imobilização da lipase em quitosana.**

A quitosana (0,18 g; 85% desacetilada obtida da Polymar, Fortaleza - CE) foi solubilizada em 6 mL de ácido acético 1% e em seguida precipitada em solução de NaOH 1 M (12 mL) com auxílio de uma bomba peristáltica. A solução do meio ácido foi gotejada a uma altura de 1,5 cm na solução alcalina e mantida sob agitação suave (90 rpm) em agitador orbital por 24 horas a temperatura ambiente (CHIOU; WU, 2004). As microesferas gelificadas foram lavadas com água destilada e submetidas à ativação com uma solução de 1% de glutaraldeído por 1 hora a 90 rpm.

Depois de ativadas, as esferas foram lavadas com água destilada e adicionadas à 12 mL de solução enzimática. Nesta etapa, com duração de 4 horas a 4°C e agitação de 90 rpm, ocorre a ligação da enzima com o suporte. Em seguida, as esferas foram lavadas com água destilada para remoção de enzimas não imobilizadas e deixadas para secar à temperatura ambiente em dessecador com vácuo até que atingissem massa constante.

O cálculo do rendimento da imobilização foi realizado seguindo a Equação 1:

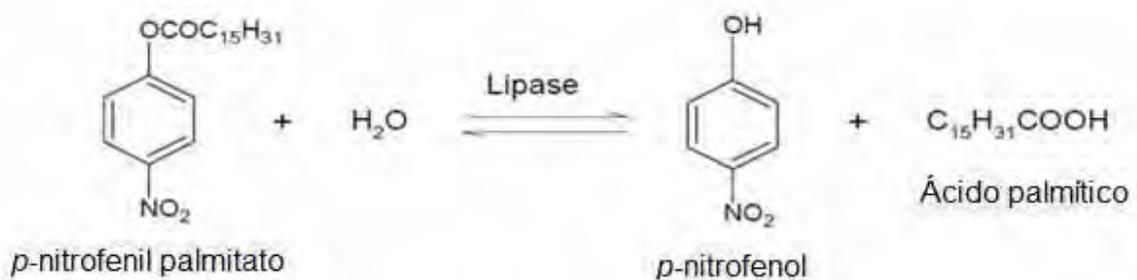
$$\text{Rendimento da imobilização (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, A se refere a atividade do extrato enzimático que foi utilizado para a imobilização; B é a atividade do extrato enzimático após o tempo de imobilização; A – B é a atividade da enzima teoricamente imobilizada (ROMDHANE et al., 2011).

#### 4.11. Determinação de atividade enzimática.

##### 4.11.1. Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de substrato cromogênico.

Este método de hidrólise foi proposto por Winkler e Stukmann (1979) e modificado por Krieger (1995) utilizando-se o *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) como substrato (Figura 4). Foram preparadas duas soluções, onde 1 mL da solução A (*p*-NPP em isopropanol na concentração de 3 mg/mL) foi misturada a 9 mL da solução B (2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L com pH 7,0) lentamente sob contínua agitação. Em seguida a reação foi incubada a 45°C durante 1 minuto, e a absorbância foi lida em um espectrofotômetro UV-VIS Cary 100 Varian em comprimento de onda de 410 nm. Como referência utilizou-se 0,9 mL da solução preparada (A + B) + 0,1 mL de água destilada.



**Figura 4** – Representação esquemática da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato catalisada por lipase.

Os testes foram realizados em tubos de ensaio contendo 0,9 mL da solução preparada (A + B) + 0,1 mL de amostra enzimática. A reação ocorreu em banhos térmicos a 45°C por 1 minuto e o controle foi composto de 0,9 mL de água destilada + 0,1 mL de amostra enzimática.

Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de p-NP (*p*-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de absorvidade molar do p-NP utilizado foi  $8 \times 10^3$  L/mol cm (LIMA et al., 2004). Para o cálculo da atividade de hidrólise lipolítica seguiu-se a seguinte Equação 2:

$$\text{Atividade hidrolítica (U/mL)} = \left\{ \left( \frac{\text{Abs} \times V_t}{\epsilon \times V_{enz} \times t} \right) \times 10^3 \right\} \times D \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

U = Unidade de atividade enzimática que é expressa em U/mL;

Abs = Absorbância da amostra a 410 nm;

$V_t$  = Volume total da reação (mL);

$\epsilon$  = Coeficiente de absorvidade molar (L/mol cm);

$V_{enz}$  = Volume da amostra enzimática (mL);

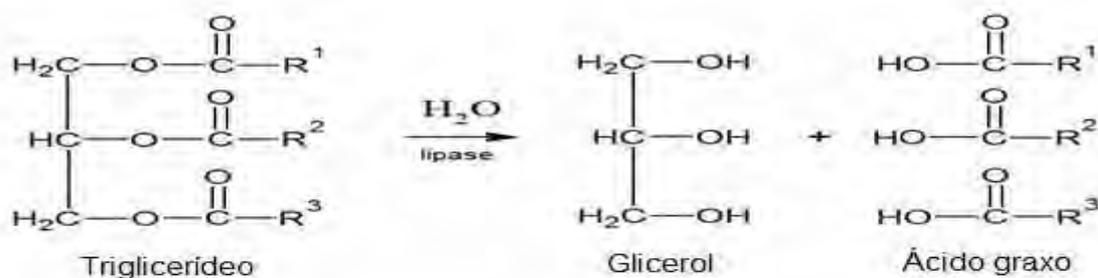
t = Tempo de incubação;

$10^3$  = Fator de correção da unidade de  $\epsilon$ ;

D = Diluição da amostra, se houver.

#### 4.11.2 Quantificação da atividade de lipase hidrolítica por titulometria.

Para a quantificação da atividade por hidrólise de óleos foi utilizada a titulometria. Em Erlenmeyer de 50 mL, foram pesados 0,09 g de goma arábica que foi dissolvida em 3 mL de água destilada, 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7 e 1 mL de óleo de oliva, a mistura reacional mais a amostra enzimática (0,1 g) foram incubadas a 45°C por 30 minutos (Figura 5).



**Figura 5** – Representação esquemática para a hidrólise de triglicerídeos catalisada por lipase.

Após a incubação, a reação foi interrompida com solução 1:1 (v/v) de acetona:álcool etílico anidro e titulada com solução NaOH 0,05 M padronizada até pH 11 (SOARES et al., 1999).

O cálculo para determinar a atividade foi com a seguinte Equação 3:

$$\text{Atividade hidrolítica (U/g)} = \frac{(V_{\text{NaOH amostra}} - V_{\text{NaOH controle}}) \times M \times 1000}{m_{\text{amostra}} \times t}$$

Onde:

$V_{\text{NaOH amostra}}$  = Volume de base titulada na amostra (mL);

$V_{\text{NaOH controle}}$  = volume de base titulada no controle (mL);

M = Molaridade de NaOH usada (0,05 mol/L);

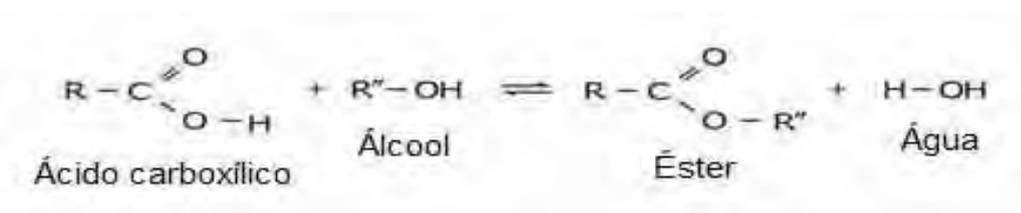
$m_{\text{amostra}}$  = Massa seca da amostra usada na reação (g);

t = Tempo de incubação (30 minutos)

A atividade é expressa em U/g, que é definida como quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto por grama de material fermentado, nas condições do ensaio.

#### 4.11.3. Ensaio para a quantificação da atividade de esterificação.

O ensaio de esterificação foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Smaniotto (2010). Adicionou-se 0,1 g de material imobilizado aos substratos reacionais na proporção molar de 1:2 de ácido oléico:etanol anidro (Figura 6).



**Figura 6** – Representação esquemática da reação de esterificação.

A mistura foi incubada durante 40 minutos a 40°C sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, foram retiradas alíquotas (triplicata) de 500  $\mu\text{L}$  e a reação foi interrompida com adição de 20 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona:etanol

anidro. Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,035 mol/L. As dosagens de atividade lipásica sintética foi definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas, determinada por meio da Equação 4:.

$$\text{Atividade de esterificação (U/mL)} = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_t}{t \times V_{al} \times V_{am}} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

$V_a$  = Volume de NaOH utilizado na titulação da amostra (mL);

$V_b$  = Volume de NaOH utilizado na titulação do branco (mL);

$M$  = Molaridade da solução de NaOH padronizada (0,035 mol/L);

$V_t$  = Volume reacional total (5,6 mL);

$t$  = Tempo de reação (40 minutos);

$V_{al}$  = Volume da alíquota (0,5 mL);

$V_{am}$  = Volume de extrato enzimático (mL) ou massa (g) de amostra enzimática utilizada na reação.

#### **4.12. Ensaio para determinação da transesterificação.**

Para o ensaio padrão de transesterificação foi utilizado óleo de soja e álcool etílico anidro, com razão molar 1:6 de óleo:álcool e 5% de catalisador (enzima livre ou imobilizada) em relação ao meio reacional, totalizando 5 g de meio, sob agitação de 150 rpm e temperatura de reação de 45°C. O solvente utilizado na reação foi o n-hexano. Variou-se o tempo de incubação de 24 a 120 horas, dependendo da velocidade de síntese da enzima. Alíquotas de 500 μL foram retiradas a cada 24 horas e analisadas por Cromatografia Gasosa (CG-FID).

#### **4.13. Síntese de biodiesel.**

As reações de transesterificação para síntese de biodiesel foram realizadas em frascos de 50 mL em uma mini incubadora com agitador orbital.

Foram estudados alguns fatores que interferem no rendimento do biodiesel, como temperatura, razão molar óleo:álcool, quantidade de catalisador, tipo álcool, origem do óleo vegetal, intensidade de agitação e irradiação de ultrassom.

#### 4.14. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Neste trabalho aplicou-se o DCCR na síntese de biodiesel utilizando a enzima comercial produzida pela empresa Sigma-Aldrich (*Thermomyces lanuginosus*) e a biomassa fúngica obtida do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 fermentada em farelo de soja.

O delineamento experimental fatorial, DCCR 2<sup>4</sup> com 8 ensaios axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 28 ensaios, e otimização dos parâmetros temperatura, razão molar óleo:álcool, concentração de enzima e quantidade de solvente foram escolhidos como variáveis independentes e o rendimento na produção de ésteres etílicos como variável dependente. O planejamento fatorial foi criado e analisado pelo software Minitab<sup>®</sup> 16.

A faixa experimental e os níveis das variáveis independentes para a produção de biodiesel são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Valores utilizados no DCCR para a produção de biodiesel.

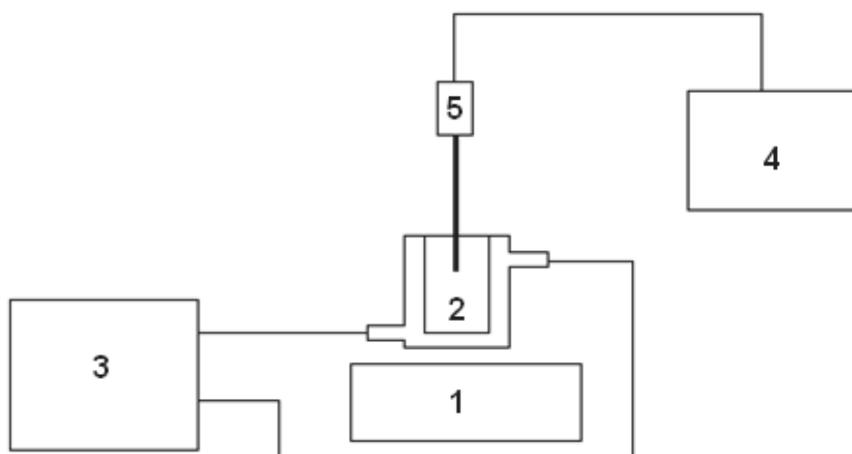
Variáveis Independentes	Faixas e Níveis				
	-2	-1	0	1	2
Temperatura (°C)	30,00	37,50	45,00	52,50	60,00
Razão Molar (óleo:álcool)	1:3	1:4,5	1:6	1:7,5	1:9
Quantidade de enzima (%)	1,00	3,25	5,50	7,75	10,00
Solvente (óleo:hexano)	0	1:0,5	1:1	1:1,5	1:2

#### 4.15. Síntese de biodiesel com irradiação de ultrassom.

O processo de obtenção de biodiesel por catálise enzimática com irradiação de ultrassom foi conduzido em reator de vidro de aproximadamente 45 mL, provido de camisa de circulação de água termostatizada e agitação magnética. A temperatura do reator foi mantida através de um banho térmico controlado eletronicamente.

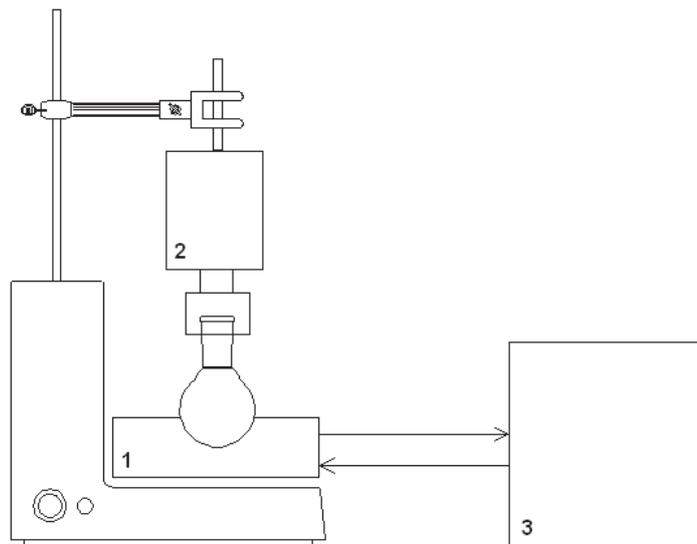
Uma sonda ultrassônica “Sonic Dismembrator 50” (F50, Fisher Scientific com 50 watts de potência e 22 kHz de frequência) foi utilizada como fonte de irradiação de ultrassom. A potência do ultrassom foi ajustada de 10 a 100% e irradiada durante 10 segundos em intervalos de 15 minutos. A Figura 7 representa o esquema utilizado para o experimento.

A mistura reacional foi composta de óleo de soja, extrato enzimático liofilizado ou imobilizado e etanol anidro. Periodicamente foram recolhidas alíquotas do meio reacional e centrifugadas a 10.000 x g para a análise de ésteres etílicos de ácidos graxos.



**Figura 7** – Esquema de reator para síntese de biodiesel etílico com irradiação de ultrassom utilizando sonda ultrassônica. (1) Agitador magnético, (2) reator de vidro, (3) banho térmico, (4) fonte de ultrassom e (5) sonda ultrassônica.

O estudo sobre o efeito da irradiação de ultrassom na síntese de biodiesel também foi avaliado utilizando um banho de ultrassom (Marconi MA 610/3A; 40kHz), onde adaptou-se um banho térmico controlado eletronicamente e um agitador mecânico, conforme Figura 8. A reação ocorreu a 45°C em um frasco com batoque e tampa contendo meio reacional citado no item 4.12 com a hifa imobilizada em farelo de soja do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e irradiação contínua de ultrassom durante 3 horas.



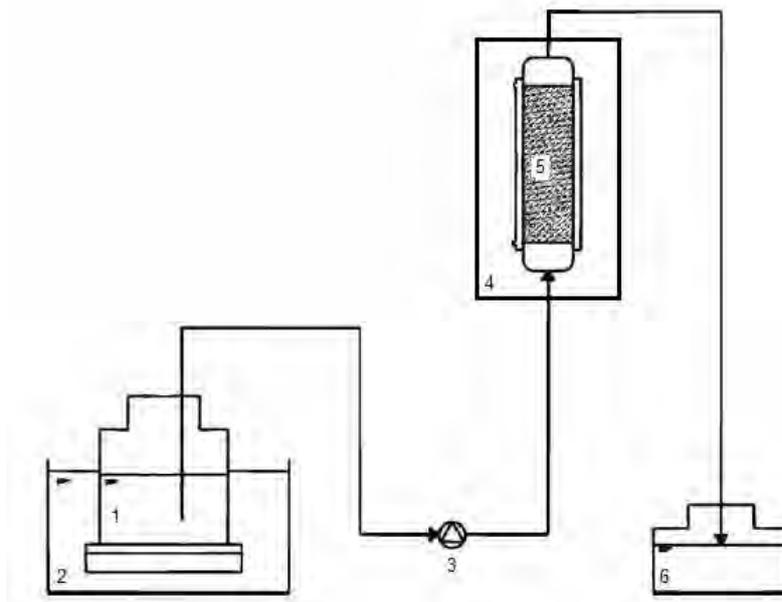
**Figura 8** – Esquema de reator para síntese de biodiesel etílico com irradiação de ultrassom utilizando banho ultrassônico. (1) Banho ultrassônico, (2) agitador mecânico e (3) banho térmico.

#### 4.16. Produção de biodiesel etílico em fluxo contínuo.

O experimento para a produção de biodiesel etílico em fluxo contínuo (Figura 9) por catálise enzimática foi conduzido com o acondicionamento de 2 g de hifas imobilizadas em farelo de soja fermentado pelo microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 de acordo com item 4.6, em uma coluna de aço inox (25 cm de comprimento e 4,6 mm de espessura) mantida à 45°C em forno aquecedor de coluna cromatográfica (BIO-RAD).

A mistura reacional, composta de óleo de soja e etanol anidro com razão molar 1:6 de óleo:álcool, utilizando o hexano como solvente na proporção de 1:1 (v/v) óleo:hexano foi mantida em reator de vidro provido de camisa de circulação de água termostatizada e agitação magnética.

A temperatura do reator foi mantida através de um banho térmico controlado eletronicamente a 45°C e introduzida na coluna por uma bomba peristáltica com vazão de 28  $\mu\text{L}/\text{min}$ . O produto da síntese foi centrifugado a 10.000 x g e analisado por cromatografia gasosa (GC-FID).



**Figura 9** – Fluxograma do processo de produção de biodiesel etílico em fluxo contínuo. (1) Reator de vidro, (2) banho de água termostatizado, (3) bomba peristáltica, (4) forno, (5) coluna de aço inox e (6) reservatório de coleta.

#### 4.17. Quantificação dos ésteres etílicos.

A quantificação dos ésteres etílicos foi realizada por cromatografia gasosa utilizando detector de ionização de chama (GC-FID). 1  $\mu$ L de cada amostra foi injetado em um Cromatógrafo HP 5890 serie II, usando o software Chromeleon. A coluna utilizada foi a SPB-35 (SUPELCO). A temperatura da corrida foi de 160 a 180°C, mantendo uma taxa de aquecimento 4°C por minuto, e de 180 a 235°C a 6°C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C, utilizando-se o gás nitrogênio como carreador (TORRES, et al. 2007; SHAH et al., 2004).

A curva de calibração foi construída utilizando ésteres com pureza acima de 98% (Sigma-Aldrich), como o linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de etila e estearato de etila. O calculou-se o rendimento das reações de sínteses segundo proposto por Urioste et al. (2008).

Para o cálculo do rendimento da síntese de biodiesel foi utilizada a seguinte Equação 5:

$$R (\%) = \frac{M_t}{M_e} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde  $Me$  é a massa teórica esperada,  $Mt$  é a massa obtida dos ésteres, calculada de acordo com a curva de calibração feita com os padrões analíticos.

Para o cálculo do  $Me$  da Equação 5, foi necessário usar a Equação 6:

$$Me = \frac{(Mo \times MMe)}{MMa} \quad (\text{Equação 6})$$

E a Equação 7:

$$Mo = Ca \times Mi \quad (\text{Equação 7})$$

Onde  $Mo$  é a massa inicial dos ácidos graxos presente no óleo,  $MMa$  é a massa molecular de cada ácido graxo,  $MMe$  é a massa molecular de cada éster correspondente,  $Ca$  é a concentração de cada ácido graxo e  $Mi$  é a massa inicial de óleo.

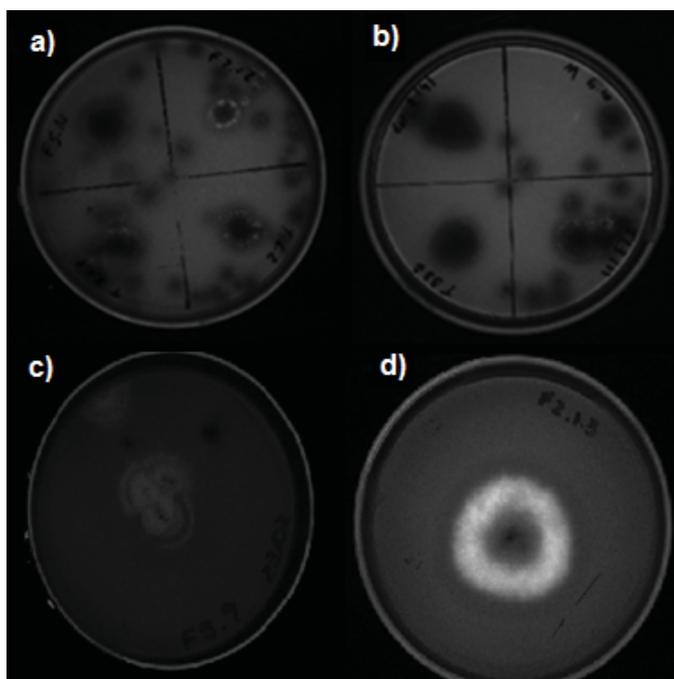
Pelas Equações 6 e 7, o  $Me$  e o  $Mo$  de cada ácido graxo foram calculados e somados para a obtenção da massa teórica esperada do óleo, em seguida aplicada na Equação 5 para o cálculo, em porcentagem, do rendimento da síntese de biodiesel.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Teste de atividade lipolítica (Zimograma) e determinação da atividade de hidrólise pelo método espectrofotométrico.

A Rodamina B ao se complexar com os ácidos graxos produz uma coloração laranja fluorescente observada sob luz UV (MESSIAS et al., 2009). Esses ácidos graxos são liberados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes no óleo utilizado como fonte de carbono no meio de cultura. Este procedimento foi realizado para pré-selecionar linhagens fúngicas com atividade lipolítica. A Tabela 4 descreve a relação das linhagens fúngicas termofílicas testadas com o método descrito no item 4.4.

Foram testadas 52 linhagens fúngicas termofílicas, sendo que 8 delas apresentaram o halo laranja (a Figura 10 exibe alguns exemplos) em torno das colônias, visualizado por luz UV a 350 nm, indicando a presença da atividade lipolítica extracelular.



**Figura 10** – Exemplos da detecção de atividade lipolítica com a exibição do halo luminoso em torno das colônias, visualizados por luz UV a 350 nm. a) F5.10, F2.1.2, T3.1.1 e T6.2; b) M8.1, M6.4, T3.1.2 e T1.3; c) F5.9 e d) F2.1.3.

**Tabela 4** – Relação das linhagens fúngicas termofílicas testadas para detecção de atividade lipolítica em placa de Petri.

Linhagens fúngicas termofílicas	Deteção de lipase	Linhagens fúngicas termofílicas	Deteção de lipase
<i>Myceliophthora</i> sp F2.1.1	X	T1.1.1	-
F2.1.2	X	T1.1.2	-
<i>Myceliophthora</i> sp F2.1.3	X	T1.2	-
<i>Myceliophthora</i> sp F2.1.4	X	T1.3	X
F2.2	-	T1.5	-
F2.2.2	-	T2.1	-
F2.3.1	-	T2.2.1	-
F2.3.2	-	T2.2.2	-
F4.3	-	T3.1.1	-
F4.4	-	T3.1.2	-
F4.5.1	-	T3.3.1	-
F4.8	-	T3.3.2	-
F5.9	-	T4.1.1	-
F5.10	-	T4.1.2	-
F5.21	-	T4.2.1	-
Esterco 1	-	T4.2.2	-
Esterco 2	-	T4.3.1	-
M4.10	-	T4.4.1	-
M6.2	-	T4.5	-
M6.3.1	-	T4.7.2	-
M6.4	-	T5.1.1	-
M6.10	-	T5.2	-
M6.12	-	T5.3	-
M7.7	X	T5.4.2	-
M7.6	-	T6.2	X
M8.1	-	<i>T. lanuginosus</i> TO-05	X

X: Presença do halo luminoso.

As linhagens fúngicas selecionadas foram submetidas à FES com incubação de 96 horas para a produção de extrato enzimático e posterior determinação da atividade hidrolítica pelo método espectrofotométrico (item 4.11.1). A Tabela 5 ilustra as atividades de hidrólise das linhagens fúngicas termofílicas selecionadas.

**Tabela 5** – Atividade hidrolítica das linhagens fúngicas termofílicas selecionadas determinadas pelo método espectrofotométrico.

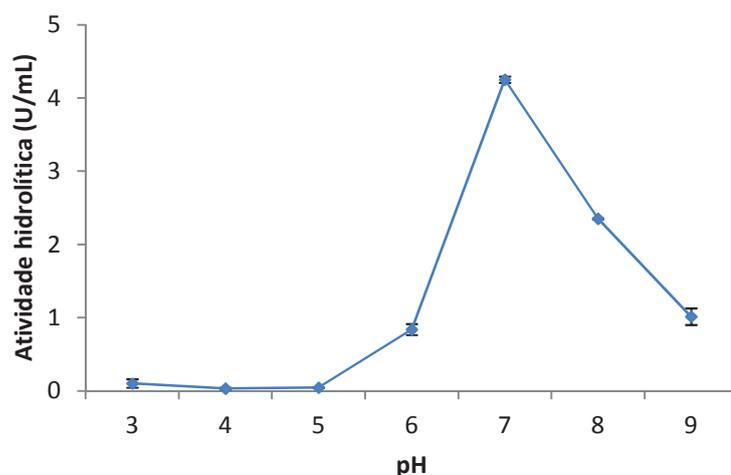
Linhas fúngicas termofílicas	Atividade de hidrólise (U/mL)
F2.1.1	2,45
F2.1.2	0,32
F2.1.3	3,83
F2.1.4	1,56
M7.7	2,72
T1.3	0,25
T6.2	0,15
TO-05	0,09

Baseado nas atividades de hidrólise apresentadas pelas linhagens fúngicas, o microrganismo *Myceliophthora* sp F2.1.3 foi selecionado para as próximas etapas deste trabalho, que incluiu a determinação do pH e temperatura ótimas da lipase.

O microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05, mesmo sem apresentar boa atividade hidrolítica, foi selecionado para este trabalho pelo fato de ser do mesmo gênero e espécie do microrganismo produtor da enzima comercial

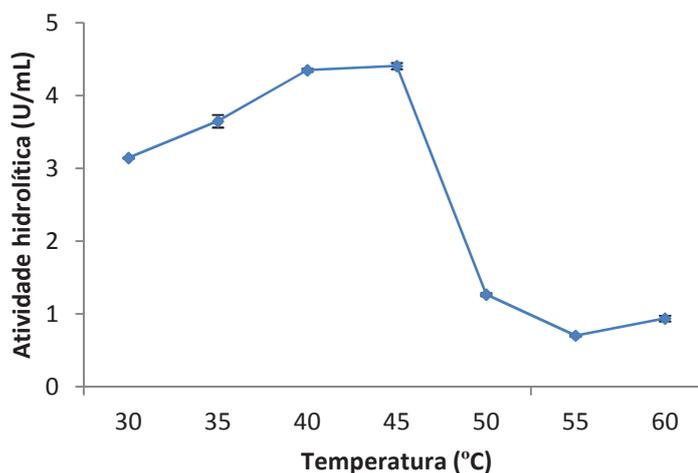
As determinações de pH e temperatura ótimas foram realizadas pelo método espectrofotométrico, onde para as análises de pH ótimo da enzima utilizou-se soluções tampão de acetato de sódio, citrato de sódio e fosfato de sódio no preparo da solução B descrita no item 4.11.1. A Figura 11 apresenta o resultado obtido nos ensaios de determinação de pH ótimo da lipase produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp F2.1.3.

Os experimentos para determinação de pH ótimo da enzima produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp F2.1.3 mostraram maior atividade em pH 7 e mostrou ser sensível em meios ácidos, onde apresentou as menores atividades. Kamini et al. (2000) e Mateos-Diaz et al. (2006) observaram atividades lipolíticas máximas em pH 7,5 para *Cryptococcus* sp e *Rhizopus homotallicus*, respectivamente. Mahadik et al. (2002) relataram lipase com pH ótimo entre 2 e 3 produzida pelo *Aspergillus Níger* por FES. Também é possível encontrar na literatura observações de lipase com pH ótimo em meio alcalino, como o caso da enzima produzida por *Pseudomonas fluorescens* (KULKARNI; GRADE, 2002).



**Figura 11** – Atividade de hidrólise obtida nos ensaios para determinação de pH ótimo da lipase produzida pelo microrganismo *Myceliophthora* sp F2.1.3 por FES, medida pelo método espectrofotométrico.

As atividade hidrolíticas medidas nos ensaios de determinação da temperatura ótima da lipase produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp F2.1.3 estão representadas pela Figura 12.



**Figura 12** – Atividade de hidrólise obtida nos ensaios para determinação de temperatura ótima da lipase produzida pelo microrganismo *Myceliophthora* sp F2.1.3 por FES, medida pelo método espectrofotométrico.

Encontram-se disponíveis na literatura relatos de microrganismos termofílicos capazes de atuar em uma ampla faixa de temperatura (30-70°C) apresentando boa

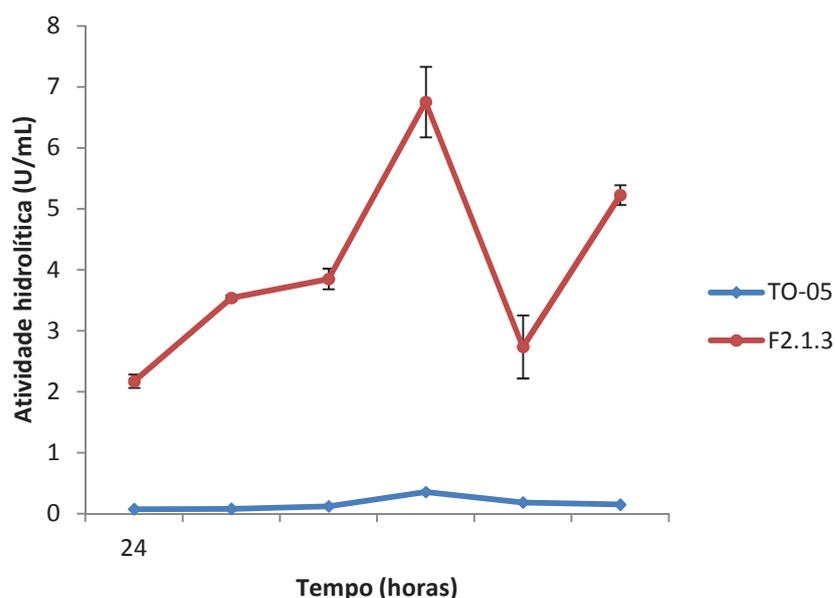
atividade enzimática e estabilidade térmica (SUN; XU, 2009; CASTRO-OCHOA et al, 2005; LIMA et al., 2004).

A enzima produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp F2.1.3 apresentou temperatura ótima de catálise na faixa de 35 a 45°C, onde exibiu maior atividade hidrolítica. Acima de 45°C a atividade lipolítica diminui drasticamente, provavelmente devido à desnaturação da enzima causada pelo aumento da temperatura.

## **5.2. Produção de lipase pelo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e *Myceliophthora* sp F2.1.3 em função do tempo.**

A produção de lipases dos fungos *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e *Myceliophthora* sp F2.1.3 foi realizada pelo método da fermentação em estado sólido, conforme descrito no item 4.5, realizando-se as extrações enzimáticas a cada 24 horas para a determinação do melhor tempo de fermentação para a produção do extrato enzimático.

A Figura 13 mostra a produção de lipase pelo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e *Myceliophthora* sp F2.1.3 em função do tempo utilizando a fermentação em estado sólido (FES). Através dela é possível observar uma grande diferença de atividade hidrolítica entre as lipases produzidas pelos microrganismos, o *Myceliophthora* sp F2.1.3 apresentou pico de produção em 96 horas de fermentação com atividade hidrolítica igual 6,75 U/mL, já o TO-05 apresentou uma atividade hidrolítica de 0,35 U/mL, sendo 19 vezes menor que a apresentada pelo *Myceliophthora* sp F2.1.3, no mesmo tempo de fermentação.



**Figura 13** – Produção de lipase pelo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e *Myceliophthora* sp F2.1.3 em função do tempo através da fermentação em estado sólido com bagaço de cana de açúcar. A atividade foi medida pelo método espectrofotométrico utilizando o p-NPP como substrato.

A produção de lipase foi baixa se comparada aos valores encontrados na literatura, para o *Rhizopus homothallicus* sua melhor produtividade foi de 595 U/g (RODRIGUEZ et al., 2006) e *Rhizopus chinensis* em torno de 570 U/g (SUN; XU, 2008). Entretanto, para o *Bacillus megaterium* a atividade hidrolítica encontrada foi de 36 U/mg (LIMA et al., 2004) e para o *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 de 3,04 U/g de atividade lipolítica (FERRAREZI, 2010).

### 5.3. Precipitação e concentração de proteínas.

As lipases produzidas pelos fungos *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e *Myceliophthora* sp F2.1.3 em FES foram submetidas à precipitação com etanol (item 4.7). Observando-se os dados de precipitação com etanol (Tabela 6) nota-se que para o fungo *Myceliophthora* sp F2.1.3, 67% de álcool apresentou o maior rendimento e o melhor fator de purificação, 71 e 346%, respectivamente.

Para o *T. lanuginosus* TO-05 foi possível observar o maior rendimento (6%), maior atividade específica (49 U/ $\mu$ g) e maior fator de purificação (0,40) utilizando-se também 67% de etanol

Vale destacar que não houve perda significativa de atividade pela lipase produzida pelo *Myceliophthora* sp F2.1.3 mesmo quando se utilizou concentrações

maiores de solvente (80%), indicando que a mesma pode ser tolerante à solventes orgânicos, sendo assim a enzima detentora de uma característica relevante para algumas aplicações industriais. A mesma característica não foi observada para lipase de *T. lanuginosus* TO-05, que apresentou perda de atividade e foi sensível ao solvente orgânico.

**Tabela 6** – Precipitação com etanol dos extratos brutos das lipases produzidas pelos microrganismos *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e *Myceliophthora* sp F2.1.3 por FES.

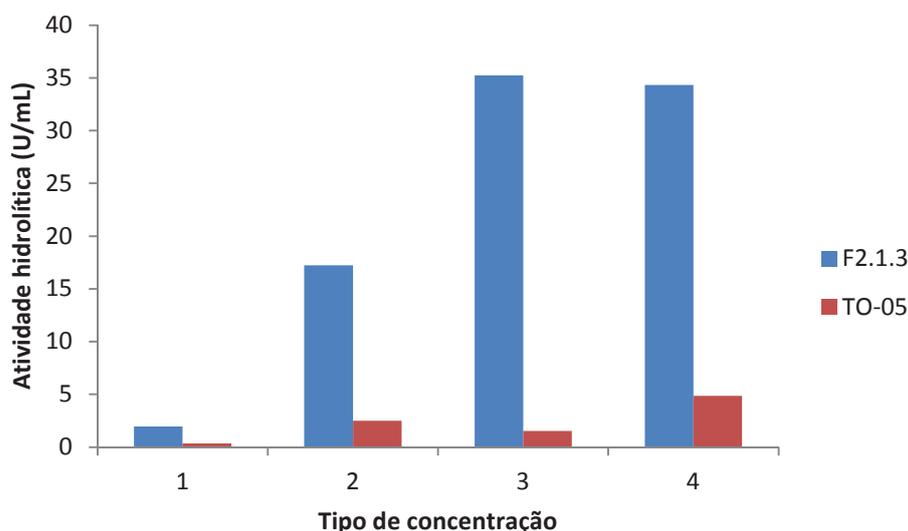
Precipitação	Proteína Total (µg)	Atividade	Atividade	Fator de Purificação	Rendimento (%)
		Lipolítica Total (U)	Específica (U.µg <sup>-1</sup> )		
<b>F2.1.3</b>					
Extrato Bruto	0,0512	12	236	1	100
50%	0,0051	31	6104	26	258
67%	0,0025	42	16727	71	346
75%	0,0286	28	980	4	231
80%	0,0227	23	994	4	187
<b>TO-05</b>					
Extrato Bruto	0,0473	6	128	1	100
50%	0,0042	0,11	26	0,2	2
67%	0,0068	0,33	49	0,4	6
75%	0,0076	0,30	39	0,3	5
80%	0,0105	0,40	36	0,3	6

Os extratos enzimáticos brutos foram concentrados por ultrafiltração utilizando o sistema QuixStand™ Benchtop (item 4.9) e para verificar a eficiência do procedimento foram realizadas medidas das atividades hidrolíticas por determinação espectrofotométrica conforme item 4.11.1.

Os extratos enzimáticos brutos produzidos pelos fungos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *T. lanuginosus* TO-05 foram concentrados 10 vezes e a precipitação com etanol foi realizada utilizando 5 mL dos extratos brutos e concentrados ressuspendendo o precipitado em 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7.

A Figura 14 mostra o efeito dos métodos utilizados para a concentração dos extratos enzimáticos brutos dos fungos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 sobre as respectivas atividades de hidrólise.

Foi possível verificar que a ultrafiltração do extrato bruto do *Myceliophthora* sp F2.1.3 aumentou em 8,8 vezes a atividade hidrolítica, enquanto que com a precipitação dos extratos bruto e concentrado, a atividade de hidrólise aumentou 18 vezes.



**Figura 14** – Atividade lipolítica de hidrólise, determinada por espectrofotometria, em relação aos diferentes métodos de concentração dos extratos enzimáticos brutos produzidos pelos microrganismos F2.1.3 e TO-05. (1) Extrato bruto, (2) extrato concentrado, (3) precipitado do extrato bruto e (4) precipitado do extrato concentrado.

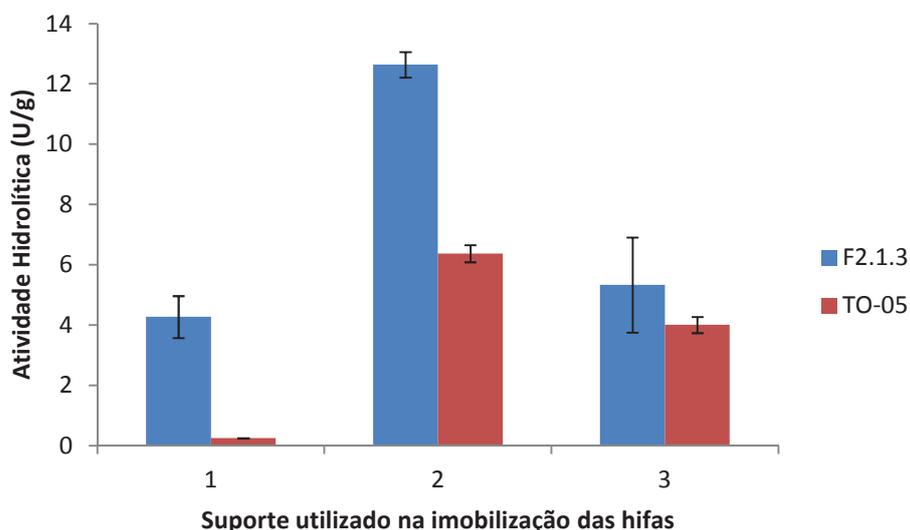
Para o *T. lanuginosus* TO-05, o extrato bruto após o procedimento da ultrafiltração teve um aumento de 7,2 vezes em sua atividade hidrolítica e com a precipitação utilizando etanol, o aumento foi de 4,4 vezes. Enquanto que com a precipitação do extrato concentrado, a atividade hidrolítica aumentou 2 vezes.

Assim como observado no experimento de precipitação de proteínas, a lipase do *Myceliophthora* sp F2.1.3 se mostrou resistente ao etanol, tornando o procedimento de precipitação um bom método para se obter material com maior atividade enzimática. Enquanto que os ensaios com as lipases do *T. lanuginosus* TO-05 evidenciam que a ultrafiltração é o melhor caminho para se obter extratos enzimáticos com maior atividade lipolítica.

#### 5.4. Determinação da atividade hidrolítica das hifas imobilizadas dos microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05.

Após a imobilização das hifas dos fungos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *T. lanuginosus* TO-05 em bucha vegetal, bagaço de cana de açúcar e farelo de soja, conforme descrito no item 4.6, determinou-se a atividade hidrolítica de cada suporte fermentado através do método espectrofotométrico utilizando 10 mg de hifas imobilizadas.

A Figura 15 ilustra a atividade de hidrólise obtida de cada material fermentado. As hifas imobilizadas em bagaço de cana de açúcar apresentaram as maiores atividades hidrolítica para os microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *T. lanuginosus* TO-05, 12 e 6 U/g respectivamente. As hifas imobilizadas do fungo TO-05 em bucha vegetal apresentou a menor atividade de hidrólise entre os suportes utilizados pelo microrganismo, 0,24 U/g, provavelmente devido à baixa adesão de hifas na bucha vegetal e possível lixiviação durante o procedimento de lavagem do material após a fermentação para a retirada de compostos remanescentes do processo, situação que pode ser observada na Figura 16.



**Figura 15** – Atividade hidrolítica determinada pelo método espectrofotométrico das hifas fúngica imobilizadas obtidas com a fermentação dos microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 utilizando como suporte a (1) bucha vegetal, (2) bagaço de cana-de-açúcar e (3) farelo de soja.

Vale ressaltar que as hifas immobilizadas do *T. lanuginosus* TO-05, mesmo após os procedimentos de lavagem com n-hexano e a liofilização do material fermentado, as enzimas estavam ativas e as hifas ainda estavam aptas ao crescimento, como pode ser observado na Figura 17.

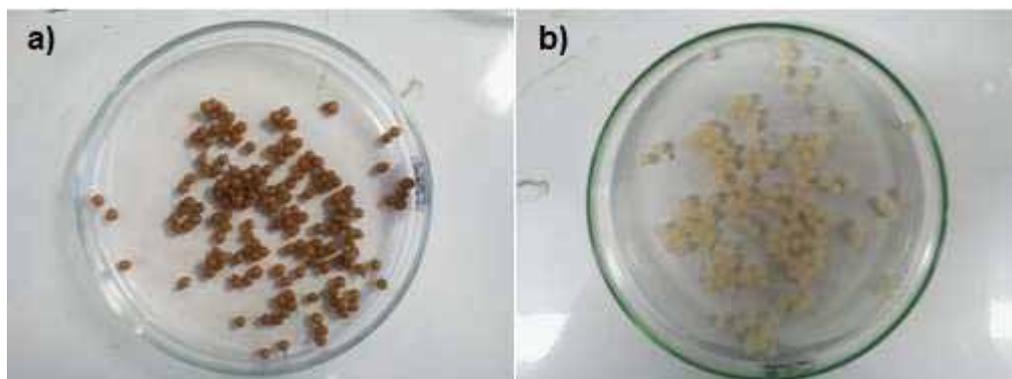


**Figura 16** – Hifas immobilizadas dos microrganismos (a) *Myceliophthora* sp F2.1.3 e (b) *Thermomyces lanuginosus* TO-05 em bucha vegetal.



**Figura 17** – Placa de Petri com meio Sabouraud contendo material fermentado do fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 em farelo de soja.

Para a imobilização em esferas de quitosana (Figura 18) foram utilizados somente os extratos enzimáticos que apresentaram maior atividade hidrolítica (precipitado do extrato bruto do fungo *Myceliophthora* sp F2.1.3 e precipitado do extrato concentrado do *Thermomyces lanuginosus* TO-05). O rendimento obtido para a imobilização em quitosana das lipases extracelulares de *Myceliophthora* sp F2.13 e *T. lanuginosus* TO-05 foram de 49 e 52%, respectivamente.



**Figura 18** – Esferas de quitosanas após a imobilização das lipases dos microrganismos (a) *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e (b) *Myceliophthora* sp F2.1.3.

A determinação da atividade de hidrólise das imobilizações em quitosana foi realizada, porém estas não apresentaram atividade quando colocadas no meio reacional. Ao invés de se observar a coloração amarela característica da formação de *p*-nitrofenol em solução, notou-se que a mistura ficou esbranquiçada, impossibilitando a quantificação da atividade hidrolítica pelo método espectrofotométrico.

### **5.5 Resultados obtidos na quantificação da atividade de lipase hidrolítica por titulometria utilizando as hifas imobilizadas dos microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05**

A atividade hidrolítica das hifas imobilizadas dos microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 foram determinadas pelo método titulométrico e são apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7** – Atividade de hidrólise das hifas imobilizadas dos microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 determinadas pelo método titulométrico.

<b>Microrganismo e tipo de suporte</b>	<b>Atividade de hidrólise (U/g)</b>
F2.1.3 – Bucha vegetal	11,56 ± 0,13
F2.1.3 – Farelo de soja	12,94 ± 0,14
F2.1.3 – Bagaço de cana de açúcar	10,22 ± 0,24
TO-05 – Bucha vegetal	14,64 ± 0,19
TO-05 – Farelo de soja	14,94 ± 0,04
TO-05 – Bagaço de cana de açúcar	13,73 ± 0,09

A hifa imobilizada em farelo de soja do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 apresentou maior atividade de hidrólise, 14,94 U/g, seguida das imobilizações realizadas em bucha vegetal e em bagaço de cana de açúcar com 14,64 U/g e 13,73 U/g, respectivamente.

O microrganismo *Myceliophthora* sp F2.1.3 exibiu maior atividade hidrolítica com sua hifa imobilizada em farelo de soja, 12,94 U/g. As hifas imobilizadas do microrganismo *Myceliophthora* sp F2.1.3 em bucha vegetal apresentou atividade de hidrólise de 11,56 U/g e em bagaço de cana de açúcar de 10,22 U/g.

Ferrarezi (2010) estudou a imobilização das hifas fúngicas em bucha vegetal por fermentação submersa de seis linhagens fúngicas, entre elas os microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 que apresentaram atividade hidrolítica de 168 e 128 U/g de biomassa seca, respectivamente.

O procedimento de imobilização de hifas fúngicas mostrou-se viável e com possibilidades de aplicações em outros processos enzimáticos.

#### **5.6. Resultados obtidos com os ensaios da atividade de esterificação utilizando as hifas e lipases imobilizadas dos microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05.**

A Tabela 8 apresenta as atividades de esterificação obtidas com as hifas e enzimas imobilizadas dos fungos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 determinadas pelo método titulométrico.

**Tabela 8** – Atividade de esterificação das hifas e lipases imobilizadas dos microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 determinadas pelo método titulométrico.

<b>Microrganismo e tipo de suporte</b>	<b>Atividade de esterificação (U/g)</b>
F2.1.3 – Bucha vegetal	6,90 ± 6,45
F2.1.3 – Farelo de soja	4,70 ± 4,76
F2.1.3 – Bagaço de cana de açúcar	9,50 ± 4,36
F2.1.3 – Quitosana	63,25 ± 4,74
TO-05 – Bucha vegetal	6,89 ± 1,69
TO-05 – Farelo de soja	4,71 ± 1,62
TO-05 – Bagaço de cana de açúcar	106,59 ± 2,93
TO-05 - Quitosana	96,74 ± 1,05

A maior atividade de esterificação foi obtida com a imobilização de hifas em bagaço de cana de açúcar do fungo *T. lanuginosus* TO-05, que foi de aproximadamente 107 U/g. As lipases imobilizadas em quitosana de ambos os fungos também apresentaram atividades de esterificação significantes, 96,74 U/g pelo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e 63,25 U/g pelo *Myceliophthora* sp F2.1.3.

Porém, mesmo com alguns resultados expressivos, as determinações das atividades de esterificação apresentaram grandes desvios padrão, o que mostra pouca reprodutibilidade no experimento realizado provavelmente devido ao acúmulo de ácido graxo na ponte salina do eletrodo, dificultando a mobilidade iônica do sistema. E a possibilidade da lipase ter sofrido algum tipo de inibição causada pelo ácido oléico.

### **5.7. Resultados obtidos com os ensaios de transesterificação utilizando as hifas e lipases imobilizadas dos microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05.**

Nos ensaios padrão de transesterificação foram avaliados os materiais fermentados (bucha, bagaço de cana de açúcar e farelo de soja) e as lipases imobilizadas em quitosana. Para a imobilização em quitosana, foram utilizados somente os extratos enzimáticos, analisados na etapa de precipitação e concentração, que apresentaram maior atividade hidrolítica (precipitado do extrato bruto do fungo F2.1.3 e precipitado do extrato concentrado do fungo TO-05).

Este ensaio foi realizado para verificar qual microrganismo e o tipo de imobilização que seria usado no planejamento fatorial (DCCR). A Tabela 9 mostra os rendimentos das reações de transesterificação (item 4.8) com os materiais fermentados e enzimas imobilizadas em quitosana, determinados através da cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID).

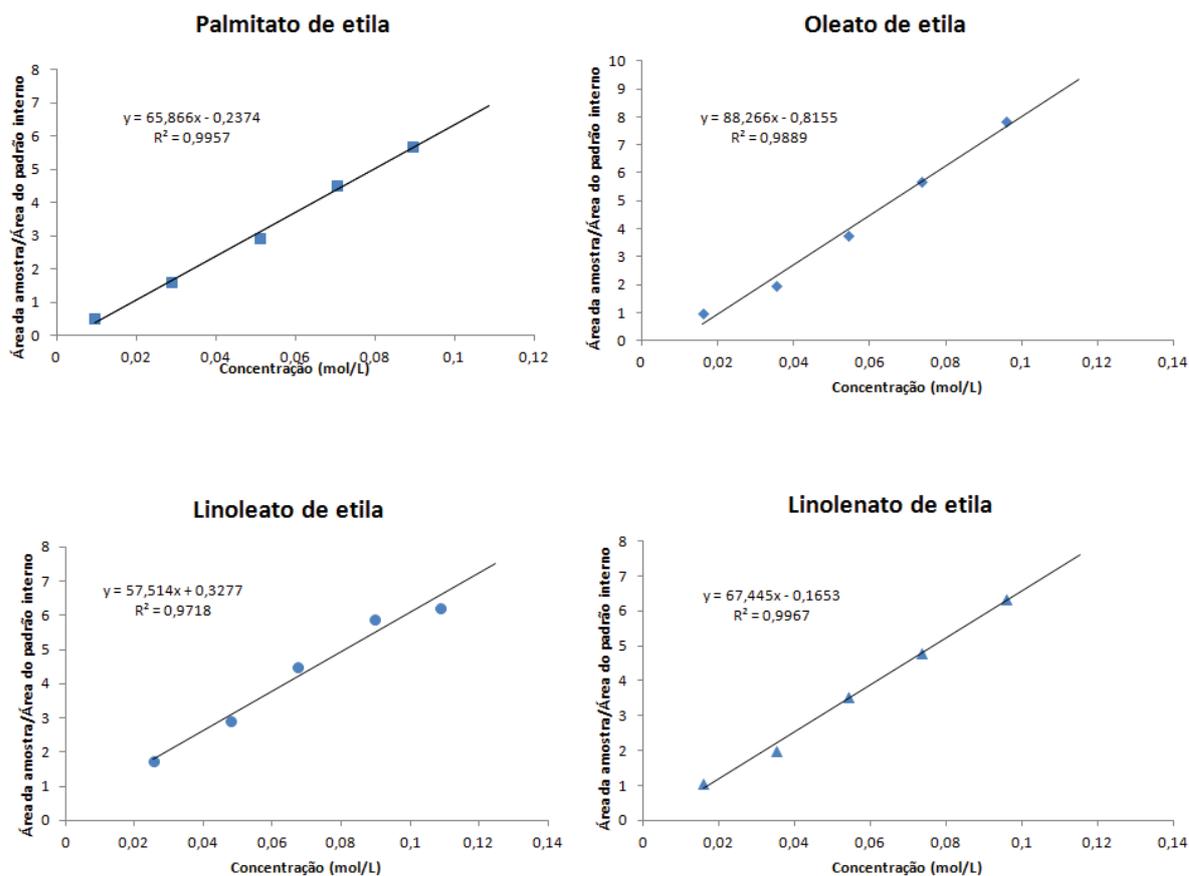
**Tabela 9** – Rendimentos obtidos nas reações de transesterificação com os materiais fermentados e enzimas imobilizadas em quitosana dos microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05.

<b>Suporte</b>	<b>Bucha vegetal</b>	<b>Bagaço de cana de açúcar</b>	<b>Farelo de soja</b>	<b>Quitosana</b>
<b>Microrganismo</b>				
<b>F2.1.3</b>	1,68%	1,57%	1,56%	1,59%
<b>TO-05</b>	1,56%	1,76%	7,19%	3,21%

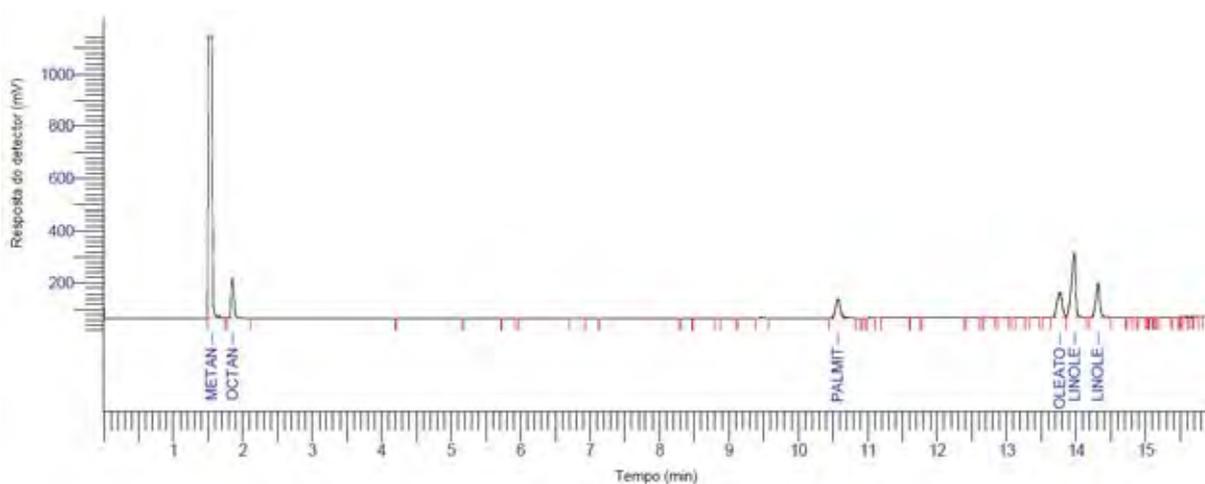
Neste experimento foi possível visualizar que com as imobilizações em farelo de soja e quitosana das hifas e enzimas do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05, obteve-se os maiores rendimentos de ésteres etílicos, 7,2% com as hifas imobilizadas e 3,2% com as enzimas imobilizadas em quitosana.

Também foi realizado nos ensaios para determinação da transesterificação (item 4.12) o uso álcool etílico comercial na síntese de biodiesel. Utilizando a enzima comercial LTL, o rendimento da síntese de ésteres etílicos foi de 49,7% e com a hifa imobilizada em farelo de soja do fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05, 2,8%.

Os cálculos de rendimento de ésteres etílicos foram realizados com o auxílio da curva de calibração construída utilizando octanol como padrão interno e soluções padrão de palmitato de etila, oleato de etila, linoleato de etila e linolenato de etila (Figura 19 e Figura 20).



**Figura 19** – Curva de calibração obtida com os padrões de palmitato de etila, oleato de etila, linoleato de etila e linolenato de etila utilizando octanol como padrão interno.



**Figura 20** – Cromatograma obtido com a injeção de uma das soluções padrão preparada para construção da curva de calibração.

### **5.8. Resultado obtido na produção de biodiesel etílico em fluxo contínuo.**

A produção de biodiesel etílico em sistemas de fluxo contínuo reduziria os custos operacionais de sua produção. Como resultado, reatores com essa característica vem sendo amplamente estudados utilizando enzimas imobilizadas em suportes ou hifas imobilizadas como biocatalisadores (FIJERBAEK et al., 2009; HAMA et al., 2007).

Neste trabalho, a produção de biodiesel etílico em fluxo contínuo também foi avaliada, e com o experimento foi obtido um rendimento de 2,35% na síntese de ésteres etílicos.

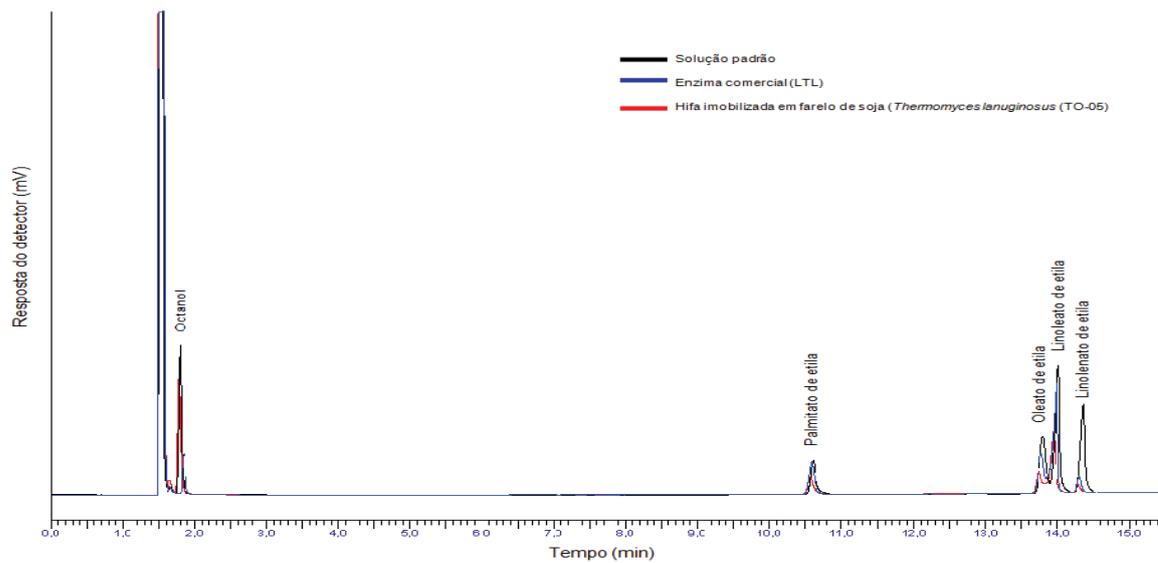
O baixo rendimento provavelmente deve-se a sensibilidade da hifa imobilizada do fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 ao álcool, uma vez que a razão molar de óleo:álcool utilizada para este ensaio foi de 1:6. Também não se descarta a possibilidade da obtenção de maiores rendimentos na síntese de biodiesel em fluxo contínuo com o tratamento das hifas imobilizadas utilizando uma solução de glutaraldeído, por exemplo, procedimento utilizado em muitos trabalhos (HAMA et al., 2007) e não realizado neste ensaio.

Um dos problemas reportados na produção de biodiesel em fluxo contínuo é a adsorção de glicerol no leito onde se encontra o biocatalisador imobilizado, causando a inibição da atividade enzimática.

Jachmanián et al. (2010) relatou que a otimização da composição do meio reacional (razão molar óleo:álcool:solvente), adição de sílica gel e utilização de solventes são algumas das soluções para o problema de inativação da enzima causada pelo glicerol.

### **5.9. Resultados obtidos com o Delineamento composto central rotacional (DCCR) na síntese de biodiesel.**

O delineamento experimental fatorial, DCCR 2<sup>4</sup> composto de 8 ensaios axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 28 ensaios, foi realizado com o intuito de maximizar parâmetros como temperatura (T), razão molar óleo:álcool (RM), quantidade de enzima (QE) em relação ao meio reacional e quantidade de solvente (S) na síntese de ésteres etílicos utilizando como catalisador a enzima comercial LTL e a hifa imobilizada em farelo de soja do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 (Figura 21).



**Figura 21** – Sobreposição de cromatogramas obtidos de uma solução padrão e biodiesel etílico produzido com enzima comercial (LTL) e hifa imobilizada em farelo de soja do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05.

Os resultados obtidos com os planejamentos experimentais para a síntese de biodiesel etílico utilizando a enzima comercial de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) e as hifas imobilizadas em farelo de soja do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

**Tabela 10** – Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com os rendimentos das reações de transesterificação com a enzima comercial LTL em 24 horas.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Razão Molar (óleo:álcool)</b>	<b>Enzima (%)</b>	<b>Solvente (óleo:hexano)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
1	37,5 (-1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	74,97
2	52,5 (1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	62,20
3	37,5 (-1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	44,96
4	52,5 (1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	21,67
5	37,5 (-1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	62,89
6	52,5 (1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	63,52
7	37,5 (-1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	75,02
8	52,5 (1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	45,85
9	37,5 (-1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	69,87
10	52,5 (1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	67,19
11	37,5 (-1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	45,10
12	52,5 (1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	30,38
13	37,5 (-1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	60,75
14	52,5 (1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	64,56
15	37,5 (-1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	74,39
16	52,5 (1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	46,02
17	30 (-2)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	62,04
18	60 (2)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	57,67
19	45 (0)	1:3 (-2)	5,5 (0)	1:1 (0)	83,72
20	45 (0)	1:9 (2)	5,5 (0)	1:1 (0)	66,00
21	45 (0)	1:6 (0)	1 (-2)	1:1 (0)	25,76
22	45 (0)	1:6 (0)	10 (2)	1:1 (0)	39,92
23	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:0 (-2)	59,34
24	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:2 (2)	75,32
25	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	75,91
26	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	68,89
27	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	79,70
28	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	59,93

**Tabela 11** – Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com os rendimentos das reações de transesterificação com a hifa imobilizada em farelo de soja do microrganismo TO-05 em 96 horas.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Razão Molar (óleo:álcool)</b>	<b>Enzima (%)</b>	<b>Solvente (óleo:hexano)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
1	37,5 (-1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	5,88
2	52,5 (1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	4,03
3	37,5 (-1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	5,51
4	52,5 (1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	3,81
5	37,5 (-1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	7,09
6	52,5 (1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	6,11
7	37,5 (-1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	7,14
8	52,5 (1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	6,01
9	37,5 (-1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	4,56
10	52,5 (1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	4,10
11	37,5 (-1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	4,11
12	52,5 (1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	3,75
13	37,5 (-1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	5,51
14	52,5 (1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	3,76
15	37,5 (-1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	6,20
16	52,5 (1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	3,64
17	30 (-2)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	4,79
18	60 (2)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	3,66
19	45 (0)	1:3 (-2)	5,5 (0)	1:1 (0)	10,77
20	45 (0)	1:9 (2)	5,5 (0)	1:1 (0)	7,45
21	45 (0)	1:6 (0)	1 (-2)	1:1 (0)	4,00
22	45 (0)	1:6 (0)	10 (2)	1:1 (0)	11,04
23	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:0 (-2)	3,96
24	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:2 (2)	6,55
25	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	10,35
26	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	8,58
27	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	9,01
28	45 (0)	1:6 (0)	5,5 (0)	1:1 (0)	6,69

Através dos resultados dos planejamentos foi possível determinar os coeficientes de regressão, calcular as variâncias e construir as curvas de contorno para os rendimentos das reações de síntese de ésteres etílicos.

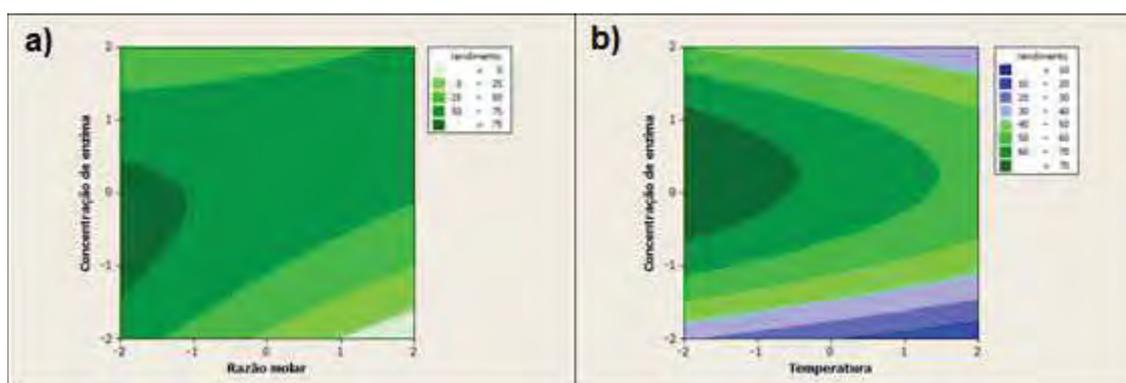
As equações dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos para os experimentos com a enzima comercial (Y1) e as hifas imobilizadas em farelo de soja (Y2) são:

$$Y1 = 67,03 - 5,22 T - 7,00 RM + 4,79 QE - 9,31 QE^2 - 4,66 T RM + 6,98 RM QE$$

$$Y2 = 7,87 + 0,99 QE - 1,22 T^2 - 0,96 S^2$$

As variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, nos experimentos com a enzima comercial LTL e com a hifa imobilizada em farelo de soja do fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 apresentaram porcentagem de variação de 82,70 e 63,36%, respectivamente.

Observou-se através das curvas de contorno (Figura 22) para o rendimento da produção de biodiesel relacionando a temperatura, razão molar e quantidade de enzima, que a enzima comercial LTL é mais eficiente na síntese de ésteres etílicos quando opera em misturas reacionais com baixas concentrações de álcool e temperaturas abaixo de 45°C.



**Figura 22** – Curvas de contorno para o rendimento da síntese de biodiesel utilizando a enzima comercial LTL em função da (a) quantidade de enzima e razão molar e (b) quantidade de enzima e temperatura.

Os baixos rendimentos das reações de transesterificação com razões molares acima de 1:4 de óleo:álcool e temperaturas acima de 45°C provavelmente foi

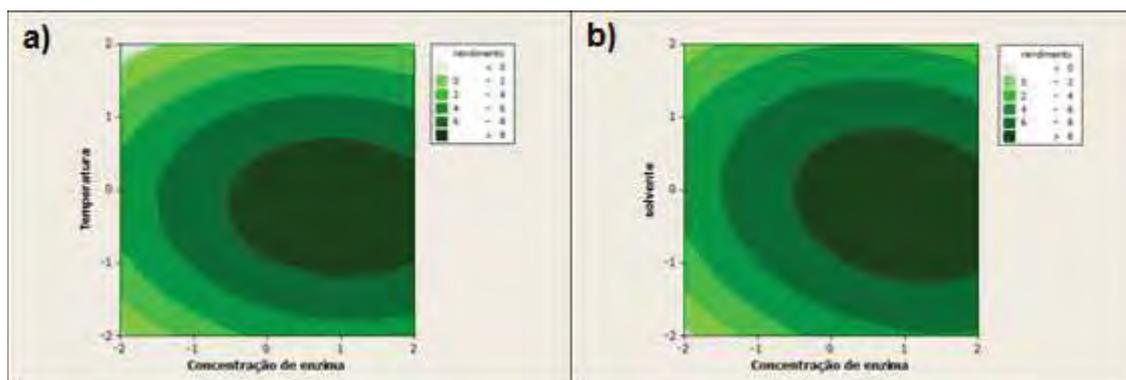
causado pela desnaturação da enzima. Álcoois são fortes agentes desnaturantes e inativam as enzimas (NELSON et al., 1996), colocando o rendimento geral da reação por catálise enzimática dependente da resistência da enzima à concentração de álcool (HAAS et al., 2002). Muitos pesquisadores reconheceram que a determinação da razão molar óleo:álcool é um dos principais fatores que afetam a produção de biodiesel (LEUNG et al., 2010; LEUNG e GUO, 2006; ZHANG et al., 2003).

A influência da temperatura nas reações de biodiesel é outro fator muito estudado, pois o aumento da temperatura de reação diminui a viscosidade de óleos e resulta em maiores taxa de conversão de ésteres alquílicos. No entanto, temperaturas além do nível ótimo diminui o rendimento da síntese de biodiesel, acelerando reações de saponificação dos triglicerídeos, evaporação do álcool reagente e afetando a estabilidade do biocatalisador enzimático, podendo causar a desnaturação da enzima (EEVERA et al., 2009; LEUNG; GUO, 2006).

O fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 se mostrou promissor devido aos resultados adquiridos através planejamento experimental das reações de produção de biodiesel etílico com o uso das hifas imobilizadas em farelo de soja. Rendimentos na síntese de biodiesel maiores que 10% foram obtidos, apesar de não serem tão expressivos quanto os relatados na literatura (TAMALAMPUDI et al., 2008; HAMA et al., 2006; BAN et al., 2001), o fato do material fermentado não ter recebido algum tratamento de ativação (com o glutaraldeído, por exemplo) como nos relatos deve ser levado em consideração.

As curvas de contorno para o rendimento da síntese de biodiesel com as hifas imobilizadas do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 foram construídas em função das variáveis com parâmetros estatisticamente significativos e estão representadas na Figura 23.

A produção de biodiesel etílico utilizando as hifas imobilizadas do fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 mostrou-se dependente das variáveis temperatura, quantidade de enzima e solvente. E analisando as curvas de contorno pode-se verificar uma região ótima compreendida entre temperatura 37 e 52°C, quantidade de solvente entre 1:0,5 e 1:1,5 de óleo:hexano (v/v) e quantidade de enzima entre 5,5 e 10% em relação ao meio reacional.



**Figura 23** – Curvas de contorno para o rendimento da síntese de biodiesel utilizando as hifas imobilizadas do fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 em função da (a) temperatura e quantidade de enzima e (b) solvente e quantidade de enzima.

Também foi observado nos ensaios com as hifas imobilizadas do *Thermomyces lanuginosus* TO-05 que razões molares acima de 1:4 de óleo:álcool diminuem o rendimento da síntese de ésteres etílicos.

Encontram-se disponíveis na literatura muitos trabalhos que relatam a importância de se utilizar solventes orgânicos nas reações do biodiesel (ANTCZAK et al., 2009; ROYON et al., 2007; LI et al., 2006), situação que foi observada neste trabalho com o uso do hexano no meio reacional.

Antczak et al. (2004) relataram que o uso de solvente orgânico apolar na síntese de biodiesel por catálise enzimática garante a solubilidade dos substratos e a proteção das enzimas da desnaturação devido às altas concentrações de álcoois. E que em alguns casos, o sistema ideal para a reação enzimática consiste em uma mistura de solventes orgânicos.

#### **5.10. Resultados obtidos utilizando enzima comercial do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* (LTL).**

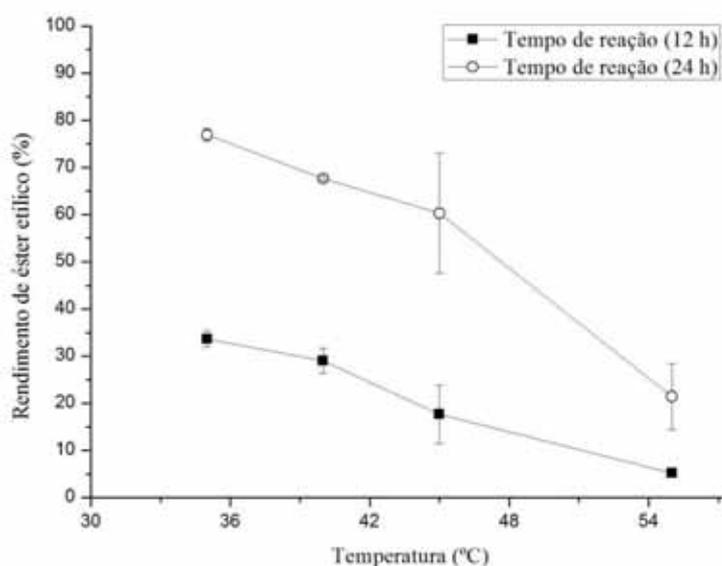
O estudo das condições da reação de transesterificação é fundamental para uma alta eficiência catalítica. Essa análise aliada à imobilização tem o intuito de diminuir os custos do biocatalisador e tornando-o competitivo aos catalisadores químicos (BAJAJ et al., 2010).

Os resultados obtidos com a enzima comercial LTL que serão apresentados a partir deste item, foram realizados com o intuito de verificar a reprodutibilidade dos resultados apresentados no DCCR e estudo de outras variáveis na síntese de biodiesel.

### 5.11. Efeito da temperatura na produção de biodiesel

A temperatura de reação é um dos fatores que influenciam o rendimento da produção de biodiesel catalisado por enzimas. Desse modo, a fim de estabelecer a melhor temperatura de reação enzimática, variou-se a temperatura da reação utilizando óleo de soja e etanol anidro (razão molar 1:3 de óleo:álcool em hexano, 5% de catalisador a 150 rpm), de 35 a 55°C.

De acordo com a Figura 24, observou-se um maior rendimento (77%) a 35°C, a partir desse valor o rendimento decresceu a 30% em 55°C após 24 h de reação. YU et al. (2010) encontraram a temperatura de 40°C como sendo temperatura ótima para a produção do biodiesel metílico quando usaram óleo de soja com a enzima Novozyme 435. Khor et al. (2010) observaram que 40°C foi a temperatura ótima para a catálise da LTL (Novozymes), para a produção de metil ésteres com óleo de palma. Dizge e Keskinler (2008) também obtiveram os mesmos resultados para essa enzima, na conversão de metil ésteres utilizando óleo de canola.



**Figura 24** – Efeito da temperatura na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:3 (óleo de soja:etanol anidro), 5% da LTL a 150 rpm. A variou-se a temperatura de 35 a 60°C. (■) 12 h de reação; (○) 24 h de reação.

A literatura também apresenta resultados de temperaturas ótimas menores que a obtida neste trabalho. Rodrigues e Ayub (2010) testaram a associação da LTL com outra enzima comercial e observaram que com óleo de soja e etanol, a reação

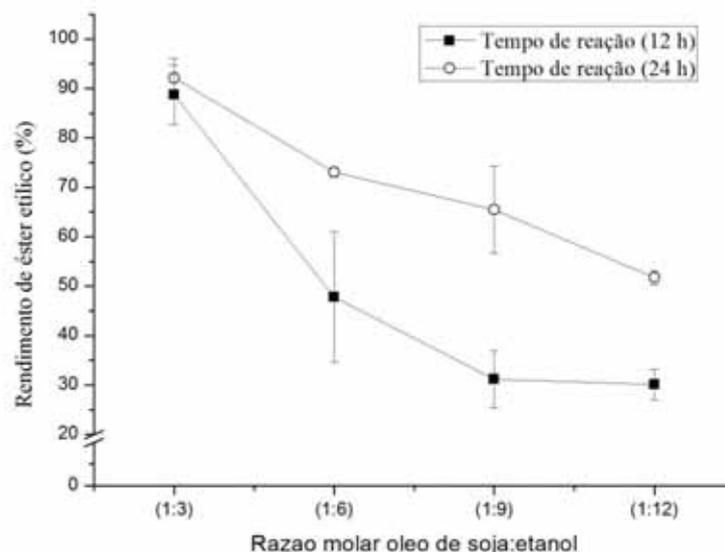
de transesterificação foi melhor a 30°C, resultando em valores de conversão da ordem de 90% de ésteres etílicos. Hernandez-Martin e Otero (2008) também observaram que com o aumento da temperatura a conversão de metil ésteres pelas enzimas Lipozyme (TL IM) e Lipozyme (RM IM) diminuiu, sendo a temperatura ótima de 25°C para ambas as enzimas.

A temperatura ótima (35°C) obtida neste experimento está um pouco diferente dos observados na literatura, mesmo aqueles que usaram a mesma enzima. Uma explicação pode ser o fato que neste trabalho utilizou-se uma mistura reacional diferente (óleo de soja e etanol), na maioria dos trabalhos relatados foi empregado o metanol como substrato. A diminuição da atividade lipásica acima de 40°C, geralmente ocorre devido à desnaturação da enzima, o calor induz à quebra das interações não covalentes levando a uma desestruturação da proteína (YADAV e LATHI, 2006).

#### **5.12. Efeito da variação da razão molar óleo:álcool na produção de biodiesel.**

A variação da concentração do substrato tem um efeito significativo no rendimento da reação de produção de biodiesel (YU et al., 2010). Assim, variou-se a razão dos substratos (óleo:etanol anidro) de 1:3 a 1:12 em hexano, mantendo-se a concentração da enzima constante a 5%. De acordo com a Figura 25, observou-se que acima da razão 1:3 houve uma diminuição do rendimento da reação, proporcional ao aumento da quantidade de álcool.

YU et al. (2010) encontraram a razão de 1:6 para a enzima da Novozym 435 imobilizada sob agitação e irradiação de ultrassom. Soumanou e Bornscheuer (2003) sugeriram a inibição por metanol a uma concentração acima de 1:3. No entanto, outros autores obtiveram uma razão molar ótima em 1:15 utilizando t-butanol como solvente, diminuindo o efeito inibitório do metanol (CHATTOPADHYAY et al., 2011).



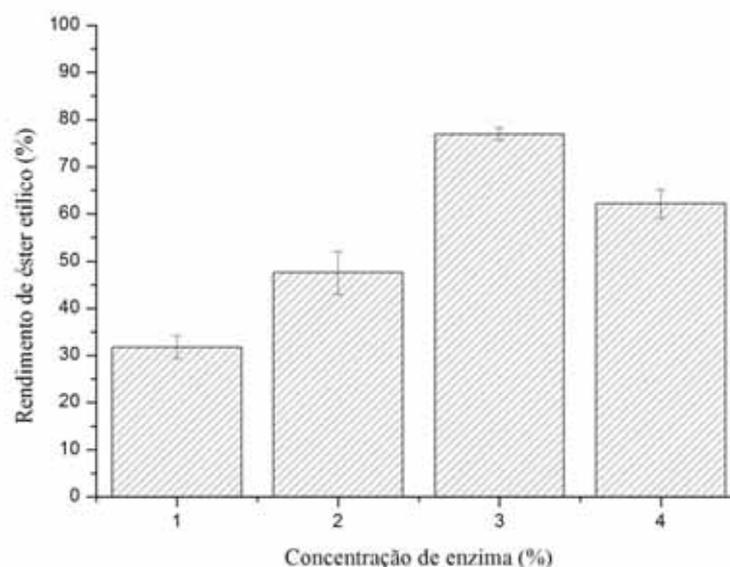
**Figura 25** - Efeito da variação da razão molar óleo:álcool na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, óleo de soja, etanol anidro, 5% da LTL a 35°C e 150 rpm. Variou-se a razão molar de óleo:etanol anidro de 3 a 12. (■) 12 h de reação; (○) 24 h de reação.

O resultado obtido neste trabalho sugere que maiores concentrações de etanol podem causar um efeito inativador da lipase, resultando em menor rendimento. Assim, a razão 1:3 (óleo/etanol) com rendimento de 89% foi a condição ótima de reação para esta enzima.

### 5.13. Efeito da quantidade de enzima na produção de biodiesel.

Neste ensaio a mistura reacional foi composta de óleo de soja e etanol anidro na proporção de 1:3 em hexano a 35°C e 150 rpm, variando a concentração de enzima de 1 a 7,5% (m/m). A quantidade da enzima na reação também influencia o rendimento da produção de biodiesel.

De acordo com a Figura 26, o melhor resultado foi observado quando se utilizou 5% de catalisador resultando em 77% de conversão. Chattopadhyay et al. (2011) relataram 70% de conversão em 4h de reação empregando concentrações na faixa de 5-2% de enzima. Lee et al. (2011) empregando enzimas de *Candida rugosa* (CRL, Sigma) e *Rhizopus oryzae* (ROL, Fluka) verificaram que o rendimento da produção de ésteres metílicos aumentou com o aumento da concentração das enzimas, sendo 20% a concentração ótima dessas enzimas na reação.



**Figura 26** - Efeito da quantidade de enzima na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:3 (óleo de soja:etanol anidro) a 35°C e 150 rpm. A quantidade de enzimas foi variada de 1 a 7,5% (m/m). (1) 1% de enzima, (2) 2,5% de enzima, (3) 5% de enzima; (4) 7,5% de enzima.

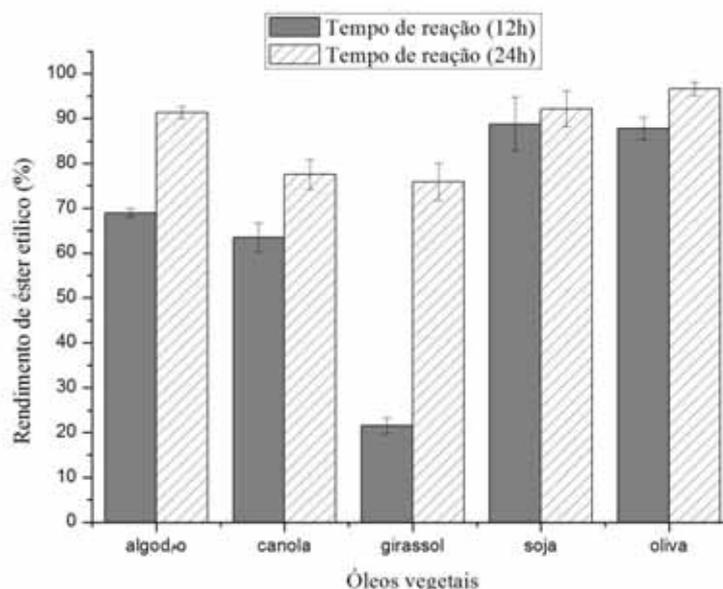
Yu e colaboradores (2010) também observaram que a conversão de metil éster na presença de Novozyme 435 sob irradiação de ultrassom aumentou com o aumento da concentração da enzima na faixa de 0 a 10%.

Neste trabalho, uma provável explicação para a redução do rendimento com concentração da enzima acima de 5% seria uma distorção na proporção adequada da mistura reacional e adsorção de glicerol no suporte da enzima, o que possivelmente causou a inativação do catalisador.

#### **5.14. Efeito do tipo de óleo na produção de biodiesel.**

As reações de síntese de biodiesel foram conduzidas em hexano, razão molar óleo:álcool 1:3, 5% de TL a 35°C e 150 rpm. O tipo de óleo utilizado na obtenção de biodiesel por catálise enzimática é outra variável importante, já que diferentes óleos apresentam composições de ácidos graxos diferentes. Essa composição pode afetar a catálise devido a especificidade da enzima. Por outro lado, o custo do óleo representa 70% do custo do biodiesel produzido. Desse modo, os óleos mais adequados são aqueles originados de cultura de maior produtividade visando a diminuição dos custos (ROBLES-MEDINA et al., 2009).

No Brasil, o óleo de soja é um dos mais abundantes, por isso foi o principal óleo utilizado neste trabalho. Os dados obtidos nos ensaios experimentais variando-se o tipo de óleo vegetal na produção do biodiesel estão representados na Figura 27. Os óleos de soja e de oliva apresentaram maiores rendimentos nas primeiras 12 horas de reação, 89 e 88% respectivamente.



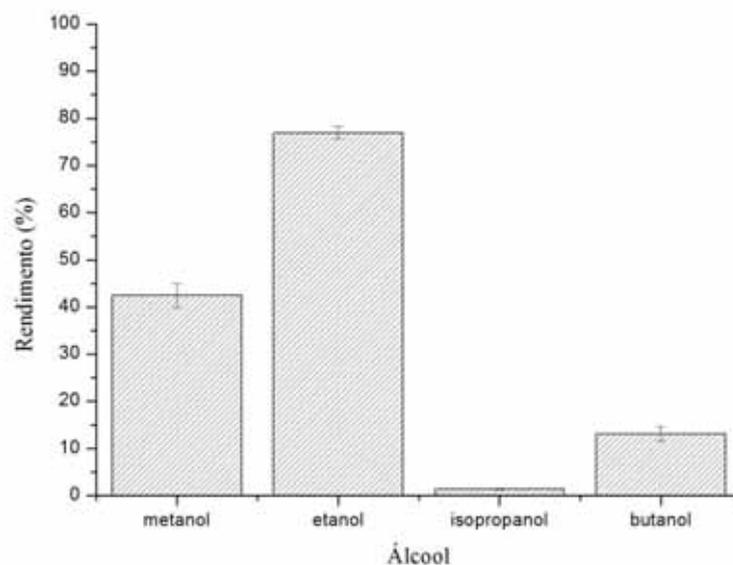
**Figura 27** - Efeito do tipo de óleo na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:3 (óleo:etanol anidro), 5% de LTL a 35°C e 150 rpm. Os óleos usados foram algodão, canola, soja, girassol e oliva.

Após 24 horas de reação os melhores rendimentos foram observados para o óleo de oliva seguido pelo de soja e de algodão, 96, 92 e 91% respectivamente. Royon et al. (2007) obtiveram uma conversão de 90% utilizando óleo de algodão e metanol na reação catalisada pela enzima Novozym 435. Utilizando a TL na etanólise do óleo de soja, outros autores obtiveram 83% de conversão (RODRIGUES; AYUB, 2010).

### 5.15. Efeito do tipo de álcool na produção de biodiesel.

Os experimentos realizados para a verificação do efeito do tipo de álcool na reação de transesterificação do biodiesel de óleo de soja foram conduzidos em hexano, razão molar 1:3 de óleo:álcool, 5% de LTL a 35°C e 150 rpm e estão apresentados na Figura 28. Liu et al. (2010) reportaram o efeito do tipo de álcool na

taxa de conversão por três diferentes lipases comerciais, concluindo ser um fator muito importante para a produção de biodiesel.



**Figura 28** - Efeito do tipo de álcool na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:3 (óleo:álcool anidro), 5% da LTL a 35°C e 150 rpm. Os álcoois utilizados foram metanol, etanol isopropílico e butanol.

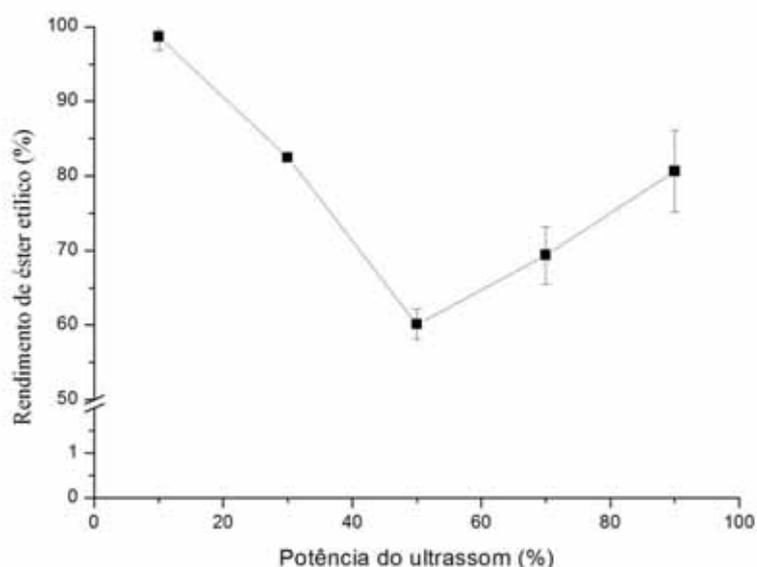
Neste trabalho, os melhores resultados foram atingidos quando se utilizou alcoóis primários de cadeia curta. O maior rendimento, de 77%, foi obtido com o uso de etanol anidro. Rodrigues e colaboradores (2010) conseguiram 100% de conversão em 10 h de reação catalisada pela LTL utilizando etanol e óleo de soja, adicionando o etanol em duas etapas.

Para os resultados obtidos com o isopropanol, um álcool secundário, a conversão foi de apenas 1,4%. Este baixo rendimento provavelmente é devido ao impedimento estérico, limitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. O menor rendimento do metanol em relação ao etanol pode ser atribuído a presença de água, pois nenhuma quantificação de água foi feita para os óleos utilizados nas reações. Metanol na presença de água pode contribuir para a desnaturação da enzima. Em sistemas com etanol, pequenas quantidades de água são necessárias para que se realize a reação de transesterificação (ANTCZAK et al., 2009).

### 5.16. Efeito da irradiação de ultrassom na produção de biodiesel.

A avaliação da influência da irradiação de ultrassom foi realizada com a razão molar 1:4 de óleo:álcool, 5% de LTL a 35°C com irradiação de ultrassom durante 10 segundos a cada 15 minutos variando a potência de 10 a 90%.

Conforme ilustrado na Figura 29, verifica-se um efeito positivo do ultrassom sobre a atuação da enzima, levando a um aumento de 92 para 99% com a irradiação do ultrassom. Com o aumento da potência de ultrassom observou-se uma diminuição da atividade enzimática. Provavelmente devido à desnaturação da enzima e/ou possível degradação do suporte ao qual a enzima estava imobilizada, causada pela energia ultrassônica de alta intensidade irradiada pela sonda.



**Figura 29** - Efeito da irradiação de ultrassom na produção de biodiesel. Condições: As reações foram realizadas em hexano, 1:4 (óleo:etanol anidro), 5% da LTL a 35°C, sob irradiação ultrassônica de 10 segundos a cada 15 minutos durante 12 h. Variou-se a potencia do ultrassom de 10 a 90%.

Yu et al. (2010) não encontraram diferença significativa na atividade da enzima variando a potência do ultrassom de 40 a 100%. No entanto, esses autores observaram 96% de conversão de ésteres metílicos em apenas 4 h combinando 50% de irradiação ultrassônica e agitação mecânica de 50 rpm.

O aumento da conversão de ésteres com a irradiação de ultrassom pode ser explicado por formar uma mistura uniforme a um micronível diferente do que provavelmente ocorre quando se utiliza somente a agitação mecânica ou magnética (BRADLEY et al., 2003). A enzima também se mostrou mais ativa sob irradiação

ultrassônica. O aumento da movimentação das moléculas pode facilitar o acesso do substrato ao sítio ativo (SHAH, GUPTA, 2008), o que poderia contribuir para aumentar o rendimento da reação de transesterificação, conforme verificado neste trabalho.

O experimento realizado para a avaliação do efeito da irradiação de ultrassom na síntese de biodiesel, com o uso de hifas imobilizadas do microrganismo TO-05, utilizando sonda ultrassônica e o banho de ultrassom apresentaram rendimentos de 3,51 e 1,73%, respectivamente, de síntese de ésteres etílicos.

A reação de transesterificação executada no reator com a sonda ultrassônica teve duração de 96 horas e exibiu um resultado menor do que os apresentados nos ensaios sem a irradiação de ultrassom. Provavelmente devido à degradação observada do suporte ao qual as hifas estavam imobilizadas e causada pela energia ultrassônica de alta intensidade irradiada pela sonda.

Esta mesma degradação do material fermentado foi observada na reação de síntese de biodiesel com o banho de ultrassom.

## 6. Conclusões

A detecção de atividade lipolítica com rodamina B mostrou ser um bom método de seleção quando se trabalha com grande número de linhagens fúngicas. Através deste método foram selecionados os microrganismos *Myceliophthora* sp F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 que apresentaram atividade hidrolítica de 3,83 e 0,09 U/mL, respectivamente.

Nos experimentos de precipitação e concentração de proteínas, a lipase do fungo *Myceliophthora* sp F2.1.3 se mostrou resistente ao etanol.

O microrganismo *Thermomyces lanuginosus* TO-05 apresentou maior atividade lipolítica quando concentrado por ultrafiltração e baixa tolerância ao etanol, exibindo perda de atividade hidrolítica.

A imobilização de hifas fúngicas mostrou-se um procedimento fácil, barato e com possibilidade de aplicação em outros processos enzimáticos. Esses fatores são de grande relevância, pois diminuem o custo da produção de biocatalisadores.

O planejamento experimental, é sem dúvida alguma, uma poderosa ferramenta para se chegar às condições otimizadas de um processo e avaliar os efeitos que os fatores tem sobre as informações desejadas. Através do DCCR foi possível verificar os efeitos dos parâmetros utilizados nas reações de transesterificação realizadas neste trabalho e determinar as condições ótimas utilizando a lipase comercial LTL e as hifas imobilizadas em farelo de soja do fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-05.

A irradiação ultrassônica em reações catalisadas por enzimas provou ser um eficiente método para produção de biodiesel utilizando óleo de soja, etanol anidro. Apenas 10% da irradiação do ultrassom foi suficiente para atingir 99% conversão de ésteres etílicos em 12h de reação, nas seguintes condições estabelecidas: razão molar 1:4 de óleo de soja:etanol anidro, 5% de enzima imobilizada LTL, 1:1,5 (v/v) de hexano como solvente (óleo:solvente), 35 °C a 150 rpm.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a LTL é um eficiente biocatalisador e que a irradiação de ultrassom é uma promissora ferramenta na produção do biodiesel etílico.

## 7. Sugestões para trabalhos futuros

- Testar influência de diferentes tipos de suportes para imobilização de lipases e de hifas fúngicas.
- Analisar o biodiesel etílico produzido por rota enzimática através de técnicas de análises térmicas.
- Verificar o efeito da irradiação de ultrassom com banho ultrassônico na reação de transesterificação utilizando a enzima comercial LTL.
- Realizar experimentos de produção de biodiesel etílico em fluxo contínuo com hifas fúngicas e lipases imobilizadas em diferentes suportes.
- Produção de biodiesel etílico em duas etapas: na primeira fase com a reação de hidrólise de triglicerídeos e na segunda fase, a esterificação dos ácidos graxos obtidos na primeira etapa.

## 8. Refências bibliográficas.

ANDERSCH, P.; BERGER, M.; HERMANN, J.; LAUMEN, K. LOBELL, M.; SEEMAYER, R.; WALDINGER, C.; SCHNEIDER, M. P. Ester synthesis via acyl transfer (transesterification). in: RUBIN, B.; DENNIS, E. A. (org.). Methods Enzimology. Part B, v. 286, p. 406-442, 1997.

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.

ANTCZAK, T.; PATURA, J.; SZCZESNA-ANTCZAK, M.; HILER, D.; BIELECKI, S. Sugar ester synthesis by a mycelium-bound *mucor circinelloides* lipase in a micro-reactor equipped with water activity sensor. Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 29, p. 155-161, 2004.

BABICZ, I.; LEITE, S. G. F.; SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. Ultrasonics sonochemistry, v. 17, p. 4-6, 2010.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase Catalyzed transesterification: an overview. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 62, p. 9-14, 2010.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. O. L.; MALCATA F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. Enzyme and Microbial Technology, v. 18, p. 392-416, 1996.

BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 17, p. 157-165, 2002.

BAN, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. Biochemical Engineering Journal., v. 8, p. 39-43, 2001.

BERNARDES, O. L.; BEVILAQUA, J. V.; LEAL M. C. M. R., FREIRE, D. M. G., LANGONE, M. A. P. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137, p. 105-114, 2007.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, M.; ASHOKKUMAR, M.; GRIESER, F. Sonochemical production of fluorescent And phosphorescent latex particles. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125(2), p. 525-529, 2003.

BRUSAMARELO, C. Z.; ROSSET, E.; DE CÉSARO, A.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of lipase catalyzed synthesis of soybean fatty acid ethyl esters in pressurized propane. *Journal of Biotechnology*, v. 147, n. 2, p. 108-115.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; DA SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Analytica*, v. 23, p. 60-70, 2006.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, nº 1, p. 146-156, 2004.

CASTRO-OCHOA, L .D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *bacillus thermoleovorans* ccr 11. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 648-654, 2005.

CERNIA, E.; PALOCCI, C.; SORO, S. The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93, p. 157-168, 1998.

CHATTOPADHYAY, S.; KAREMORE, A.; DAS, S.; DEYSARKAR, A.; SEM, R. Biocatalytic Production of biodiesel from cottonseed oil: standardization of process

Parameters and comparison of fuel characteristics. *Applied Energy*, v. 88, p. 1251-1256, 2011.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D. Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, p. 423–429, 2008.

CHIOU, S. H.; WU, W. T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, v. 25, p. 197-204, 2004.

CUNHA, A. G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUTARRA, M. L. E.; BELIVAQUA, J. V.; ALMEIDA, R. V.; PAIVA, L. M. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; FREIRE, D. M. G. Separation and immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 156, p.563-575, 2009.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Química Nova*, v. 32, nº 3, p. 776-792, 2009.

DIZGE, N.; KESKINLES, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 1274-1278, 2008.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; LI, Z. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 37, p. 68-71, 2005.

2000.

EEVERA, T.; RAJENDRAN, K.; SARADHA, S. Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions. *Renew Energy*, v. 34, p. 762-765, 2009.

FERRAREZI, A. L. Produção de lipases por fungos termofílicos imobilizados e a sua utilização para a produção de biodiesel por transesterificação. Rio Claro. 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista.

FIAMETTI, K. G.; SYCHOSKI, M. M.; DE CESARO, A.; FURIGO JR., A.; BRETANHA, L. C.; PEREIRA, C. M. P.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 981-987, 2011.

FIJERBAEK, L.; CRISTHENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, p. 1298-1315, 2009.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; de CASTRO, H. F.; *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 1725, 2007.

FUKUDA, H.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NODA, H. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 12, p. 668-673, 2008.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, p. 405-406, 2001.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent free system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 335-363, 2004.

GOH, S. H.; YEONG, S. K.; WANG, C. W. Transesterification of cocoa butter by fungal lipases: effect of solvent on 1,3-specificity. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 70, p. 567-570, 1993.

GOMES, E.; GUEZ, M. U.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fonte, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v. 30, p. 136-145, 2007.

HAAS, M. J.; PIAZZA, G. J.; FOGLIA, T. A. Enzymatic approaches to the production of biodiesel fuels. In: KUO, T. M.; GARDNER, H. W., editors. *Lipid Biotechnology*. New York: Marcel Dekker Inc, p. 587-598, 2002.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within

biomass support particles for use as whole cell biocatalysts in biodiesel fuel production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, p. 328-333, 2006.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZO, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, v. 34, n. 3, p. 273-278, 2007.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresource Technology*, v. 99(2), p; 277-286, 2008.

ISO, M.; CHEN, B.; 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.

JACHMANIÁN, I.; DOBROYÁN, M.; MOLTINI, M.; SEGURA, N.; IRIGARAY, B.; VIEIRA, J. P.; VIEITEZ, I.; GROMPONE, M. A. Continuous lipase-catalyzed alcoholysis of sunflower oil: Effect of phase-equilibrium on process efficiency. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 87, n. 1, p. 45-53, 2010.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, nº 4, p. 390-397, 2002.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase – a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 28, p. 253-264, 2008.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; et al. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a watercontaining system without an organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88, p. 627-631, 1999.

KAMINI, N. R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 4, p. 317-324, 2000.

KAZLAUKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Pihler G, Stadler A, Kelly PJW (Org.). *Biotechnology*. New York, 1998. v. 8, p. 37-192.

KHOR, G. K.; SIM, J. H.; KAMARUDDIN, H.; UZIR, M. H. Thermodynamics and inhibition studies of lipozyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6558-6561, 2010.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, v. 409, p. 241-246, 2001.

KNEZ, Z.; HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 23, p. 29-42, 2002.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v.35, p. 126-139, 2004.

KRIEGER, N. Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum*. Curitiba. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A. M.; LIMA, V. M. G.; MITHELL, D. A. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technology and Biotechnology*, v. 42, n. 4, p. 279-286, 2004.

KULKARNI, N.; GRADE, R. V. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology and Biotchnology*, v. 28, p. 344-348, 2002.

LEE, J. H.; KIM, S. B.; KANG, S. W.; SONG, Y. S.; PARK, C.; HAN, S. O.; KIM, S. W. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 2105-2108, 2011.

LEUNG, D. Y. C.; GUO, Y. Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production. *Fuel Process Technology*, v. 87, p. 883-890, 2006.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG M. K. H. A review on biodiesel using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v. 87, p. 1083-1095, 2010.

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, p. 58-62, 2006.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamento a aplicações em química analítica. *Química Nova*, v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potencial for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, v. 31, p. 53-61, 2004.

LIU, Y.; TAN, H.; ZHANG, X.; YAN, Y.; HAMEED, B. H. Effect of monohydric alcohols on enzymatic transesterification for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, v. 157, p. 223-229, 2010.

LU, J.; NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99–125. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1367-1370, 2007.

LU, J.; NIE, K.; WANG, F.; TAN, T. Immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 catalyzed methanolysis of glycerol trioleate: Solvent effect. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 6070-6074, 2008.

LU, J.; CHEN, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, p. 122-125, 2009.

LV, P.; WANG, X.; YUAN, Z.; TAN, T. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida* lipase on textile cloth. *Energy Sources Part A*, v. 30, p. 872-879, 2008.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 715-721, 2002.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. P. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 76, p. 629-635, 2001.

MATEOS-DIAZ, J. C.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p.1042-1050, 2006.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v. 28, nº 2, p. 296-305, 2005.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MESSIAS, J. M.; DA COSTA, B. Z.; DE LIMA, V. M. G.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Bothryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Bothryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 426-431, 2009.

MITCHELL, D. A.; RODRIGUEZ, J. A., CARRIERE, F.; KRIEGER, N. Determination of the quantitative stereoselectivity fingerprint of lipases during hydrolysis of a prochiral triacylglycerol. *Journal of Biotechnology*, v. 135, p.168-173, 2008.

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 73, p. 1191-1195, 1996.

NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, v. 43, p. 142-147, 2006.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; JOSHI, S. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by sol-gel entrapment and its application in the hydrolysis of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society.*, v. 80, p. 1077, 2003.

NYBROE, O.; JORGENSEN, P. E.; HENZE, M. Enzyme activities in waste water and activated sludge. *Water Research*, v. 26, nº 5, p. 579-584, 1992.

PARK, E. Y.; PIZARRO, A. V. L. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

PILISSÃO, C.; NASCIMENTO, M. G. Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases. *Tetrahedron-Asymmetry*, v. 17, n. 3, p. 428-433, 2006

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLES-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 398-408, 2009.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, 2010. doi:10.1016/j.procbio.2010.11.013

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2264-2269, 2006.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology*, v. 27, nº 5, p. 298-306, 2009.

ROMDHANE, I. B. B.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, p. 230-239, 2011.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 648-653, 2007.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 9, nº 1, p. 199-210, 1998.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. *Chemistry Central Journal*, v. 2, Article Number 1, 2008.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of jatropha oil. *Energy Fuel*, v. 18, p. 154-159, 2004.

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

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application for the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17, p.133-142, 2002.

SMANIOTTO, A. Produção e caracterização parcial de uma lipase sintética produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus*. Tese (Mestrado) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional do Alto do Uruguai e das Missões – Campus de Erechin, 2010.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 79, n. 1-3, p. 745-757, 1999.

SOLOMON, B. D.; BARNES, J. R.; HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. *Biomass Bioenergy*, v. 31, p. 416-425, 2007.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microbial Technology*, v. 33, p. 97-103, 2003.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. *Química Nova*, v. 30, nº 3, p. 667-676, 2007.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS A. L. F.; RODRIGUES J. P.; ALVES M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: Desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, v. 32, nº 3, p. 768-775, 2009.

SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1336-1342, 2009.

SUN, Y. S.; XU, Y. Solid state fermentation for "whole-cell synthetic lipase" production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 219-224, 2008.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 185-189, 2008.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 5, p. 628-634, 2010.

TAN, T.; NIE, K.; WANG, F. Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. lipase at high water content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 128, p. 109-116, 2006.

TING, W. J.; TUNG, K. Y.; GIRIDHAR, R.; WU, W. T. Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 42, p. 32, 2006.

TORRES, F. T., TORÉ, A. M., FORNARI, T., SEÑORÁNS, F. J., REGLERO G. Ethanolysis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic study. *Biochemical Engineering Journal*, v. 34, p. 165-171, 2007.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technology*, v. 3, p. 182-196, 2010.

TRETIN, C. M.; LIMA, A. P.; ALKIMIM, I. P.; DA SILVA, C.; DE CASTILHOS, F.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V. Continuous catalyst free production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in microtube reactor using supercritical carbon dioxide as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 56, p. 283-291, 2011.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. R., *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ed. Legis Summa, 2004. Cap.7, p. 115-135.

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. *Química Nova*, v. 31, nº 2, p. 407-412, 2008.

VIEIRA, A. P. D. A.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. *Latin American Applied Research*, v. 36, p. 283-288, 2006.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.

VYAS, A. P.; VERMA, J. L.; SUBRAHMANYAM, V. N. A review on FAME production processes. *Fuel*. p.1-9, 2009.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17, p. 151-155, 2002.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. The Journal of Bacteriology, v. 138, n° 3, p. 663-670, 1979.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: kinetics of forward and reverse reactions. Enzyme and Microbial Technology, v. 38(6), p. 814–820, 2006.

YI-HSU, J.; VALI, S. R. Rice bran oil as a potential resource for biodiesel: A review. Journal of Scientific & Industrial Research, v. 64, p. 866-882, 2005.

YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y.; MA, D.; FANG, X. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. Process Biochemistry, v. 45, p. 519-525, 2010.

ZHANG Y, DUBE MA, MCLEAN DD, KATES M. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. Bioresource Technology, v. 90, p. 229-240, 2003.