

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELY KARINE KLEIN

NICOLY KAROLINE KLEIN

ESTUDO DA TEMPERATURA E CO-SOLVENTES NA ESTERIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DO ÁCIDO OLEICO COM ETANOL CATALISADA POR LIPASES DE
Candida rugosa E *Candida cylindracea*

PALOTINA

2022

MICHELY KARINE KLEIN
NICOLY KAROLINE KLEIN

ESTUDO DA TEMPERATURA E CO-SOLVENTES NA ESTERIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DO ÁCIDO OLEICO COM ETANOL CATALISADA POR LIPASES DE
Candida rugosa E *Candida cylindracea*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Isac G. Rosset

PALOTINA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIAS E EXATAS
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

ATA DE REUNIÃO

Aos catorze dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e dois, às vinte horas, na Sala 02 do Seminário, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Estudo da Temperatura e Co-solventes na Esterificação Enzimática do Ácido Oleico com Etanol Catalisada por Lipases de *Candida rugosa* e *Candida cylindracea*" apresentado pelas discentes Michely Karine Klein e Nicolý Karoline Klein, orientadas pelo Prof. Dr. Isac George Rosset, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, o orientador e Presidente da Banca concedeu a palavra às discentes, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir as discentes. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído às discentes as seguintes notas: **Profa. Dra. Raquel Stroher, nota: 100 (cem), Profa. Dra. Tania Sila Campioni Magon, nota: 100 (cem), e Prof. Dr. Isac George Rosset, nota: 100 (cem)**. A nota final das discentes, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi **100 (cem)**. As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pelas discentes sob acompanhamento de seu orientador. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ISAC GEORGE ROSSET, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/09/2022, às 21:28, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/09/2022, às 21:29, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **TANIA SILA CAMPIONI MAGON, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/09/2022, às 21:29, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4875806** e o código CRC **05A90EAB**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIAS E EXATAS
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

ATA DE REUNIÃO

Aos catorze dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e dois, às vinte horas, na Sala 02 do Seminário, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Estudo da Temperatura e Co-solventes na Esterificação Enzimática do Ácido Oleico com Etanol Catalisada por Lipases de *Candida rugosa* e *Candida cylindracea*" apresentado pelas discentes Michely Karine Klein e Nicolý Karoline Klein, orientadas pelo Prof. Dr. Isac George Rosset, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, o orientador e Presidente da Banca concedeu a palavra às discentes, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir as discentes. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído às discentes as seguintes notas: **Profa. Dra. Raquel Stroher, nota: 100 (cem), Profa. Dra. Tania Sila Campioni Magon, nota: 100 (cem), e Prof. Dr. Isac George Rosset, nota: 100 (cem)**. A nota final das discentes, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi **100 (cem)**. As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pelas discentes sob acompanhamento de seu orientador. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ISAC GEORGE ROSSET, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/09/2022, às 21:27, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **TANIA SILA CAMPIONI MAGON, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/09/2022, às 21:29, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/09/2022, às 21:29, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4875790** e o código CRC **EB32ACD7**.

Dedicamos esse trabalho a Deus, aos nossos pais, ao nosso orientador e a todos que colaboraram para que ele se concretizasse, como expressão de nosso reconhecimento e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus, pela força, amparo e por todas as bênçãos concedidas. Sem ele nada seria possível.

Aos nossos pais, Teresa e Jacinto, que nunca mediram esforços para que concretizássemos esse sonho. Nossa eterna gratidão por toda dedicação, incentivo e amor.

Agradecemos de forma especial ao nosso orientador, Prof. Dr. Isac George Rosset, pela oportunidade, orientação e conhecimento repassado.

Aos técnicos do Bloco de Química, sobretudo a Raquel Vilvert, pela atenção e solicitude.

Agradecemos de coração ao Gabriel Luca de Lima por todo apoio, dedicação e conhecimento compartilhado.

Aos colegas e amigos por tudo que vivenciamos dentro e fora da universidade.

Aos professores do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e aos demais colaboradores da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, pela receptividade e ensinamentos. Vocês tornaram nossa formação acadêmica possível.

E, por fim, agradecemos à Universidade Federal do Paraná, por nos proporcionar um ambiente cativante, motivador e repleto de oportunidades.

A todos, nossa eterna gratidão.

Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.

(LAVOISIER, 1785)

RESUMO

As reações de biocatálise tem sido amplamente empregadas em síntese orgânica devido as diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais. O uso de biocatalisadores acelera as reações, otimiza o uso de matérias-primas, permitindo a utilização de biomassa, bem como de resíduos agroindustriais, entre outros, otimiza o gasto de energia, e ainda minimiza a geração de resíduos. Em geral, biocatalisadores, como as enzimas, apresentam boa estabilidade sob diferentes condições reacionais, como variações de temperatura e utilização de solventes orgânicos. Além disso, demonstram alta seletividade para diferentes substratos, versatilidade e biodegradabilidade. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da temperatura e co-solventes na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol catalisada por lipases de *C. cylindracea* e *C. rugosa*. Os ensaios foram preparados com ácido oleico, etanol anidro, enzima e peneira molecular, incubadas em agitador orbital, por 24 horas. No estudo de temperatura as reações foram realizadas para temperaturas entre 20 e 60 °C, com intervalos de 5 °C. Os ensaios com co-solventes se deram apenas para a temperatura que rendeu os melhores resultados, através da adição de 1 mL dos solventes orgânicos *n*-hexano, DMSO, acetonitrila, éter etílico, THF, clorofórmio, diclorometano, tolueno, benzeno, nitrobenzeno, acetona e *n*-heptano. A conversão dos reagentes foi observada qualitativamente por meio de cromatografia em camada delgada, além disso, o rendimento foi verificado através de microtitulação. Com relação a temperatura, as lipases das duas linhagens demonstraram melhor desempenho a 25°C, com eficiência de conversão de 22,5% e 22,8%, para as lipases de *C. rugosa* e *C. cylindracea*, respectivamente. Já em relação aos co-solventes, o DMSO apresentou 98,7% de conversão para a lipase de *C. rugosa* e 99,4% para a lipase de *C. cylindracea*. O nitrobenzeno também demonstrou resultados promissores com 81,0% de conversão na reação empregando a lipase de *C. rugosa* e 78,2% com a lipase de *C. cylindracea*. Desse modo, foi observado incremento nos rendimentos das reações realizadas na presença, especialmente do DMSO e do nitrobenzeno, quando comparadas aos maiores rendimentos dos experimentos de temperatura.

Palavras-chave: Biocatálise. Lipases. *C. rugosa*. *C. cylindracea*. Bioenergia.

ABSTRACT

Biocatalysis reactions have been widely used in organic synthesis due to several advantages over traditional methods. The use of biocatalysts accelerates the reactions, optimizes the use of raw materials, allowing the use of biomass, as well as agro-industrial residues, among others, optimizes energy expenditure, and also minimizes the generation of waste. In general, biocatalysts, such as enzymes, have good stability under different reaction conditions, such as temperature variations and the use of organic solvents. In addition, they demonstrate high selectivity for different substrates, versatility and biodegradability. Thus, the aim of the present study was to evaluate the influence of temperature and co-solvents on the enzymatic esterification of oleic acid with ethanol catalyzed by lipases from *C. cylindracea* and *C. rugosa*. The assays were prepared with oleic acid, anhydrous ethanol, enzyme and molecular sieve, incubated in an orbital shaker for 24 hours. In the temperature study, the reactions were carried out at temperatures between 20 and 60 °C, with intervals of 5 °C. Tests with co-solvents were performed only at the temperature that yielded the best results, through the addition of 1 mL of the organic solvents n-hexane, DMSO, acetonitrile, ethyl ether, THF, chloroform, dichloromethane, toluene, benzene, nitrobenzene, acetone and n-heptane. The conversion of the reagents was qualitatively observed by means of thin layer chromatography, in addition, the yield was verified by microtiter. Regarding temperature, the lipases of the two strains showed better performance at 25°C, with conversion efficiency of 22.5% and 22.8%, for lipases from *C. rugosa* and *C. cylindracea*, respectively. Regarding co-solvents, DMSO showed 98.7% conversion to *C. rugosa* lipase and 99.4% to *C. cylindracea* lipase. Nitrobenzene also showed promising results with 81.0% conversion in the reaction using *C. rugosa* lipase and 78.2% with *C. cylindracea* lipase. Thus, an increase was observed in the yields of the reactions carried out in the presence, especially of DMSO and nitrobenzene, when compared to the higher yields of the temperature experiments.

Keywords: Biocatalysis. Lipases. *C. rugosa*. *C. cylindracea*. Bioenergy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE REAÇÕES DE CATÁLISE ENZIMÁTICA	21
FIGURA 2 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO INTERFACIAL DE LIPASES.....	22
FIGURA 3 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE <i>C. rugosa</i>	24
FIGURA 4 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE LIPASE DE <i>C. cylindracea</i>	25
FIGURA 5 – REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO COM ETANOL GERANDO OLEATO DE ETILA E ÁGUA	27
FIGURA 6 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA CATÁLISE DE ÁCIDO OLEICO POR <i>C. cylindracea</i> PARA DIFERENTES TEMPERATURAS.....	36
FIGURA 7 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA CATÁLISE DE ÁCIDO OLEICO POR <i>C. rugosa</i> PARA DIFERENTES TEMPERATURAS.....	37
FIGURA 8 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA CATÁLISE DE ÁCIDO OLEICO POR <i>C. cylindracea</i> PARA DIFERENTES CO-SOLVENTES.....	40
FIGURA 9 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA CATÁLISE DE ÁCIDO OLEICO POR <i>C. rugosa</i> PARA DIFERENTES CO-SOLVENTES.....	40

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – RENDIMENTO DAS REAÇÕES COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA.....	36
GRÁFICO 2 – RENDIMENTO DAS REAÇÕES COM DIFERENTES CO- SOLVENTES.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS	20
TABELA 2 – REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES	26
TABELA 3 – CO-SOLVENTES EMPREGADOS NO ESTUDO	30
TABELA 3 – CO-SOLVENTES EMPREGADOS NO ESTUDO	31
TABELA 4 – TITULAÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE TEMPERATURA	35
TABELA 5 – TITULAÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES COM CO- SOLVENTES.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

°C	–	Graus Celsius
<i>C. cylindracea</i>	–	<i>Candida cylindracea</i>
<i>C. rugosa</i>	–	<i>Candida rugosa</i>
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
mL	–	Mililitros
pH	–	Potencial hidrogeniônico
RPM	–	Rotações por minutos
THF	–	Tetraidrofurano
µL	–	Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

®

– Marca registrada

TM

– Marca comercial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	17
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivos específicos.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	BIOCATÁLISE	19
2.2	ENZIMAS.....	19
2.3	LIPASES.....	21
2.3.1	Lipase de <i>C. rugosa</i>	23
2.3.2	Lipase de <i>C. cylindracea</i>	25
2.4	REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES	25
2.4.1	Catálise enzimática em meios aquo-restritos	26
2.5	SOLVENTES ORGÂNICOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	MATERIAL.....	30
3.1.1	Enzimas	30
3.1.2	Reagentes	30
3.1.3	Equipamentos.....	31
3.2	METODOLOGIA.....	32
3.2.1	Síntese de oleato de etila via esterificação catalisada por lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>C. cylindracea</i>	32
3.2.1.1	Estudo de temperatura	32
3.2.1.2	Estudo de co-solventes	32
3.2.1.3	Filtração.....	33
3.2.1.4	Análise qualitativa das reações: cromatografia em camada delgada	33
3.2.1.5	Quantificação do rendimento das reações: microtitulação	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO EM RELAÇÃO A VARIÇÃO DE TEMPERATURA.....	35
4.2	RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO EM RELAÇÃO AOS CO SOLVENTES EMPREGADOS.....	38
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42

5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	42
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A catálise é uma importante ferramenta na indústria química e de processos. Ela consiste em reações que ocorrem na presença de um catalisador. O uso de catalisadores tem como objetivo acelerar reações através de um conjunto de etapas mais favoráveis, do ponto de vista cinético, em alternativa às etapas que ocorrem em sua ausência (CHANG; GOLDSBY, 2013; DALBERTO, 2022).

Desse modo, em determinadas reações, a catálise aumenta a velocidade de formação dos produtos e otimiza o uso de matérias-primas e energia, minimizando a geração de resíduos e os impactos ambientais gerados nos processos convencionais (DALBERTO, 2022; GOMES, *et al.*, 2017).

Atualmente, uma das tecnologias catalíticas mais empregadas é a biocatálise. Ela refere-se à utilização de enzimas, hormônios ou vitaminas como catalisadores naturais de diferentes reações químicas. O emprego dessas moléculas, denominadas biocatalisadores, em diferentes processos, representa uma rota sustentável para síntese de químicos, principalmente devido à possibilidade de se utilizar uma vasta gama de substratos, dentre os quais se destacam resíduos e biomassas (DALBERTO, 2022; MANFRÃO NETTO, 2021).

De acordo com Manfrão Netto (2021):

Com os avanços no campo da biotecnologia, várias moléculas podem ser sintetizadas através de biocatálise, incluindo compostos não produzidos naturalmente por microrganismos. Nestes casos, ferramentas de engenharia genética são utilizadas para inserção de genes exógenos ou para deleção de vias endógenas que competem pelo substrato, otimizando o processo de produção. Além disso, novas técnicas para edição de genes estão constantemente sendo desenvolvidas, ampliando os limites da biocatálise. (MANFRÃO NETTO, 2021, p. 7).

A nível industrial, as enzimas ocupam lugar destaque devido à sua maior estabilidade frente a diferentes temperaturas, pH, métodos de agitação, solventes orgânicos, e outras condições reacionais. Além disso, o uso de enzimas como biocatalisadores oferece diversas vantagens quando comparado ao uso de catalisadores convencionais. Dentre elas destacam-se a alta seletividade para determinados substratos, a versatilidade, a biodegradabilidade e o baixo impacto ambiental, em função da minimização dos resíduos gerados nesses processos (DALBERTO, 2022; GOMES, *et al.*, 2017; NETA *et al.*, 2012; SALUM, 2010).

Nesse sentido, o uso de lipases, triacilglicerol-acil hidrolases (E.C. 3.1.1.3), é bastante significativo na indústria de alimentos, farmacêutica, de química fina, oleoquímica, biodiesel e detergentes. Essas enzimas atuam como biocatalisadores tanto em meios aquosos como orgânicos, onde o teor de água é restrito. Elas são sintetizadas por mamíferos, plantas, fungos e bactérias, sendo as lipases microbianas as de maior interesse para aplicação em biotecnologia e em química orgânica (GUNCHEVA, ZHURYAKOVA, 2011; MELANI, TAMBOURGI, SILVEIRA, 2020; TURATI, 2012).

As lipases atuam na hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa, liberando monoglicerídeos e ácidos graxos livres. Além disso, em meios aquo-restritos elas são capazes de promover a esterificação entre ácidos graxos e etanol produzindo ésteres oleatos, como o oleato de etila (MELANI, TAMBOURGI, SILVEIRA, 2020; ZANELLA, 2020).

Nesse sentido, a produção biotecnológica de oleato de etila usando lipases tem recebido atenção especial devido às condições brandas de reação envolvidas, o alto grau de pureza do produto alcançado, bem como, a aceitação desses produtos na indústria alimentícia. Além disso, esses compostos apresentam várias vantagens sobre os ésteres sintéticos, tais como serem biodegradáveis, biocompatíveis e essencialmente não tóxicos e poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis como ácidos graxos (NETA *et al.*, 2012).

1.1 JUSTIFICATIVA

A justificativa do presente estudo fundamenta-se na necessidade de compreender melhor como diferentes temperaturas e utilização de co-solventes influenciam as reações de esterificação catalisadas por enzimas.

A reação investigada consiste na esterificação do ácido oleico com etanol, na presença de duas lipases, uma oriunda de *C. rugosa* e outra de *C. cylindracea*, como biocatalisadores, gerando oleato de etila (éster etílico de ácido graxo) e água (TWEDDELL *et al.*, 1998).

1.2 OBJETIVOS

Avaliar a influência da temperatura e co-solventes na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol catalisada por lipases.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a influência das temperaturas entre 20 e 60 °C, com intervalos de 5 °C, na reação de esterificação do ácido oleico com etanol catalisada por lipases de *C. rugosa* e *C. cylindracea*;
- Investigar a atuação dos co-solventes *n*-hexano, DMSO, acetonitrila, éter etílico, THF, clorofórmio, diclorometano, tolueno, benzeno, nitrobenzeno, trietilamina, acetona e *n*-heptano na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol catalisada por lipases de *C. rugosa* e *C. cylindracea*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOCATÁLISE

A biotransformação, também chamada de catálise enzimática ou biocatálise refere-se a uma das tecnologias catalíticas mais empregadas atualmente (DALBERTO, 2022). Consiste em uma das ferramentas da química verde, que emprega enzimas purificadas ou células íntegras, em especial, células microbianas, como catalisadores naturais de diferentes reações químicas (DALBERTO, 2022; KRUGER, 2017).

Na biocatálise, por meio de um limitado número de etapas, o biocatalisador transforma moléculas precursoras pré-formadas, naturais ou sintéticas, nos produtos de interesse (CORTEZ, CASTRO, ANDRADE, 2017; FABER, 2011).

Os processos de catálise aumentam a velocidade de formação dos produtos e otimizam o uso de matérias-primas e energia, e minimizam a geração de resíduos e os impactos ambientais oriundos dos processos empregando catalisadores químicos. Adicionalmente, têm-se, ainda, menores custos econômicos relacionados especialmente aos processos de purificação (DALBERTO, 2022).

Dentre os atributos relacionados a biocatálise destacam-se a versatilidade reacional, a especificidade pelo substrato, a redução no número de etapas do processo, além da obtenção de altos rendimentos em produtos (PERKINS *et al.*, 2016).

Reações de biocatálise são amplamente empregadas em síntese orgânica e envolvem a ação de enzimas hidrolíticas, como as lipases, proteases e esterases, em ambientes aquo-restritos (FABER, 2011).

2.2 ENZIMAS

As enzimas são proteínas que atuam como biocatalisadores, ou catalisadores biológicos. Assim como os demais catalisadores, aceleram reações bioquímicas sem alterar o equilíbrio químico entre reagentes e produtos (REIS, 2020; ROBINSON, 2015).

Essas proteínas consistem em heteropolímeros de 20 diferentes aminoácidos. Algumas incluem em sua estrutura um grupo prostético. Tratam-se de

macro-moléculas, com massa molar variando entre cerca de 5 mil a mais de 1 milhão de daltons, podendo ser formadas por dezenas ou milhares de aminoácidos. Com exceção da prolina, os aminoácidos componentes das proteínas apresentam um átomo de carbono ligado a uma carboxila, a um grupo amino, a um átomo de hidrogênio e a uma cadeia lateral, variável de acordo com o aminoácido (TORRES, 2020).

Pelas regras oficiais de classificação e nomenclatura, as enzimas são divididas em classes, de acordo com o tipo de reação que catalisam. Cada uma dessas classes é ainda subdividida subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambiguidade (TORRES, 2020). Portanto, elas são denominadas através de um nome sistemático, composto por um identificador único do tipo EC 1.2.3.4. e um nome recomendado. O EC refere-se a Comissão de Enzimas (Enzyme Commission) do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NCIUBMB). O primeiro número corresponde a classes e descreve o tipo de reação química catalisada, o segundo e o terceiro número identificam o substrato envolvido e o quarto é o número de catálogo (CUESTA *et al.*, 2015; BUCHHOLZ, KASCHE, BORNSCHEUER, 2012).

Na TABELA 1, a seguir, estão descritas as 7 classes de enzimas e as respectivas reações que catalisam.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

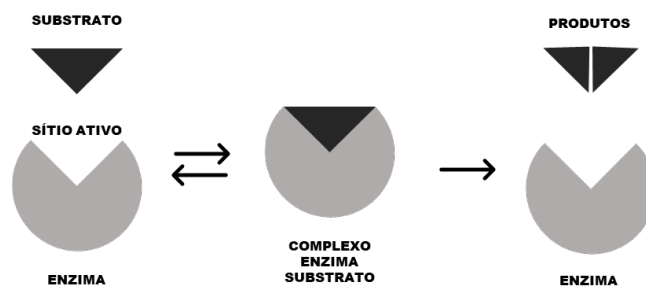
Primeiro nº EC	Classes das enzimas	Tipo de reação catalisada
1	Oxirredutases	Oxidação-redução
2	Transferases	Transferência de grupos químicos entre moléculas
3	Hidrolases	Hidrólise
4	Liasas	Remoção ou adição de grupos funcionais
5	Isomerases	Isomerização
6	Ligases	Formação de ligação química entre moléculas, associada a degradação de uma ligação fosfatada
7	Translocases	Movimentação de íons e moléculas entre membranas

FONTE: Adaptado de PINTO (2018) e REIS (2020).

As enzimas apresentam sobre os catalisadores inorgânicos inúmeras vantagens, especialmente em função dos processos de separação (CARDOSO *et al.*, 2020). Elas atuam diminuindo a energia de ativação, levando a altas velocidades de reação. Graças à sua estrutura complexa, podem apresentar um alto grau de especificidade, permitindo selecionar reações de interesse que poderão ocorrer ainda que vários compostos diferentes estejam presentes no meio. Em virtude de suas propriedades estruturais a atividade enzimática pode ser modulada, permitindo ajustes contínuos na reação catalisada (TORRES, 2020). Além disso, esses catalisadores atuam em condições reacionais brandas de pH, temperatura e pressão, e em baixas concentrações do biocatalisador (SOUZA *et al.*, 2017).

A catálise enzimática se dá pela afinidade do substrato com o sítio ativo da enzima, implicando na ligação do substrato com o sítio ativo, formando um complexo enzima-substrato. O substrato ligado ao sítio catalítico é convertido em produto, que é então liberado do complexo (REIS, 2020; ROBINSON, 2015; SOUZA *et al.*, 2017). A FIGURA 1, abaixo, representa a catálise enzimática.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE REAÇÕES DE CATÁLISE ENZIMÁTICA



FONTE: As autoras (2022).

2.3 LIPASES

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes a classe das hidrolases, responsáveis pela catálise total ou parcial de gorduras e óleo, gerando como produtos ácidos graxos livres, acilgliceróis e glicerol (BALDO *et al.*, 2020). Em meios aquo-restritos essas enzimas são capazes de promover a esterificação entre ácidos graxos e etanol produzindo ésteres oleatos (MELANI, TAMBOURGI, SILVEIRA, 2020; ZANELLA, 2020). Elas atuam sobre a ligação éster

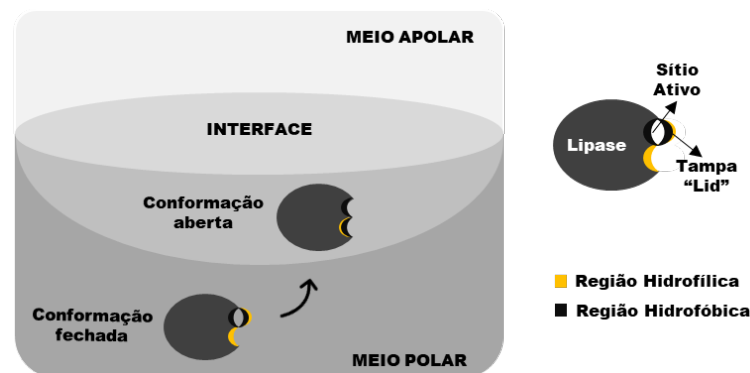
de diversos compostos, sendo os acilglicerois seus melhores substratos (RESENDE; SOCCOL, 2016).

As lipases são enzimas muito versáteis e estão amplamente presentes na natureza, sendo produzidas por plantas, animais e microrganismos. Dentre elas, as lipases microbianas, nativas ou recombinantes são as mais utilizadas em aplicações biotecnológicas (BALDO *et al.*, 2020).

Em geral, os microrganismos mais empregados para a produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor*, bactérias do gênero *Pseudomonas* e leveduras do gênero *Candida*. Essas inclusive são empregadas na produção de biodiesel, apresentando custos mais baixos em função do seu potencial na hidrólise de resíduos industriais (ARTHY *et al.*, 2014; FERRAZ *et al.*, 2018; VANLEEuw, *et al.*, 2019).

Devido às suas características estruturais as lipases possuem ativação interfacial. Elas podem se apresentar, basicamente, nas conformações aberta e/ou fechada. Na forma fechada uma α -hélice anfifílica protege o sítio ativo da enzima. Ao interagir com uma interface hidrofóbica, a estrutura é movida e expõe o sítio ativo proporcionando livre acesso ao substrato conforme disposto na FIGURA 2 (REIS, 2020; ZISIS, *et al.*, 2015).

FIGURA 2 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO INTERFACIAL DE LIPASES



FONTE: As autoras (2022).

O cerne das lipases é composto por uma lâmina β central, a qual consiste de oito diferentes fitas β (β 1- β 8) conectadas por seis α hélices (A-F) (BÔAS, 2018). Os sítios ativos dessas enzimas são geralmente caracterizados por uma tríade composta de serina (Ser), histidina (His) e ácido glutâmico/aspártico (Asp/Glu),

sendo os complexos acil-enzima intermediários cruciais em todas as reações catalisadas por elas (PINTO, 2019; TURATI, 2012).

As lipases podem ser definidas em classes de acordo com sua especificidade, dentre elas, destacam-se as lipases não específicas, essas catalisam a hidrólise completa do triacilglicerol em ácidos graxos e glicerol, apresentando mono e diacilgliceróis como intermediários, atuando de modo aleatório. As lipases de *C. rugosa*, *C. cylindracea* pertencem a essa classe (BÔAS, 2018).

Outra classe refere-se as lipases 1,3 específicas que catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis produzindo ácidos graxos, 2-monoacilgliceróis e 1,2 ou 2,3 diacilgliceróis, ambos quimicamente instáveis, proporcionam a migração do grupo acila para produzir 1,3 diacilgliceróis e 1 ou 3 monacilgliceróis. As lipases ácido graxo específicas, apresentam ação específica na hidrólise de ésteres de cadeia longa insaturada com duplas ligações. Ésteres com ácidos graxos saturados ou sem insaturação são lentamente hidrolisados. Trata-se de um tipo de especificidade pouco comum entre as lipases, com aplicações na alcoólise de óleos selecionados para produtos específicos (BÔAS, 2018).

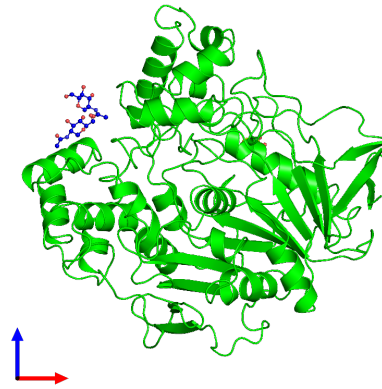
Finalmente a estereoespecificidade, a propriedade que algumas lipases possuem em discriminar os enantiomêros de uma mistura racêmica. Essa especificidade estrutural ou regiosseletividade é decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do centro ativo à ligação do substrato. Estas restrições levam à distinção e à transformação seletiva de funções quimicamente similares na mesma molécula. A seletividade e a estereoquímica advém da própria quiralidade da enzima. Essas enzimas são empregadas na resolução de racematos, resultando em rendimentos elevados, para obtenção de ésteres, álcoois e ácidos opticamente puros (BÔAS, 2018).

2.3.1 Lipase de *C. rugosa*

A levedura *C. rugosa* produz várias lipases extracelulares intimamente relacionadas que diferem em sua especificidade de substrato. Em geral, essas lipases apresentam 549 aminoácidos em suas cadeias, sendo que os 15 primeiros compõem o peptídeo sinal. Além disso, as cadeias possuem duas ligações dissulfeto nas posições 75-112 e 283-292, e glicosilações nas posições 329 e 366

(KHUNNAMWONG, 2015). A estrutura tridimensional da lipase pode ser observada na FIGURA 3.

FIGURA 3 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE *C. rugosa*



FONTE: KHUNNAMWONG (2015).

A lipase de *C. rugosa* é uma enzima amplamente utilizada em biotransformações, tanto em hidrólise quanto em abordagens sintéticas. Trata-se de uma lipase versátil, vastamente utilizada na indústria de aromas e sabores, na indústria de gorduras e óleos, farmacêutica e também possui aplicação como biossensor. Ela é interessante por possuir excelente potencial hidrolítico e se tratar de um catalisador muito eficiente sob condições de água limitada (MARÍA, *et al.*, 2006; VANLEEuw, *et al.*, 2019).

Essas lipases, são não específicas e, portanto, catalisam reações em todos os grupos hidroxila do triglicerídeo de maneira aleatória, podendo remover o ácido graxo de qualquer posição do triglicerídeo, gerando ácidos graxos livres e glicerol, ou monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Esses intermediários são hidrolisados mais rapidamente que os triglicerídeos de modo que não se acumulam na reação (KRUGER, 2017).

As lipases de *C. rugosa* apresentam como características ampla especificidade em substratos, tolerância em relação a solventes orgânicos e elevada estabilidade térmica, permitindo sua utilização como biocatalisador em aplicações industriais realizadas a temperaturas elevadas, bem como, na presença de solventes orgânicos (MORAIS JÚNIOR, 2013).

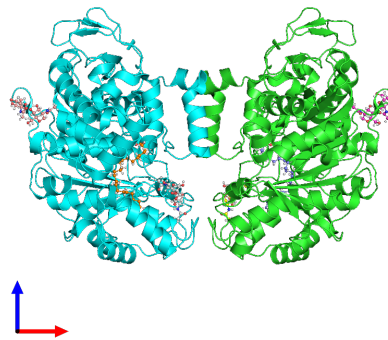
2.3.2 Lipase de *C. cylindracea*

A *C. cylindracea*, é uma levedura, que pertence a uma espécie não ascospórica, muitas vezes unicelular, não patogênica e reconhecida como GRAS (generally considered safe, que em português significa geralmente considerado seguro). Ela apresenta resultados promissores, principalmente no que diz respeito à produção de lipases. Trata-se de uma das melhores produtoras dessa enzima sendo amplamente empregada em pesquisas devido à sua alta atividade em reações hidrolíticas, bem como em química sintética (FERNANDES, 2022).

As lipases de *C. cylindracea* podem ser consideradas enzimas chave na formação de ésteres etílicos de ácidos graxos.

A lipase de *C. cylindracea*, assim como a de *C. rugosa*, também é composta por 549 aminoácidos, sendo que os 15 primeiros compõem o peptídeo sinal. As cadeias possuem nas posições 75-112 e 283-292 duas ligações dissulfeto, e nas posições 329 e 366 glicosilações (PLETNEV, *et al.*, 2003). Sua conformação pode ser visualizada na FIGURA 4.

FIGURA 4 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE LIPASE DE *C. cylindracea*



FONTE: PLETNEV, *et al.*, (2003)

2.4 REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

As lipases atuam sobre a ligação éster de inúmeros compostos. Os acilgliceróis são seus melhores substratos. A hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipases é uma reação reversível, portanto o equilíbrio pode ser alterado através de variações nas concentrações de reagentes ou produtos. As reações de hidrólise

e esterificação podem ser combinadas de modo sequencial gerando um grupo de reações denominado de interesterificação (BALCÃO, PAIVA, MALCATA, 1996).

As lipases, de acordo com os reagentes, possibilitam as seguintes reações: transesterificação, nela dois grupos acilas são trocados com dois acilgliceróis; acidólise, onde o grupo acila é deslocado entre um acilglicerol e um ácido carboxílico; e a alcoólise, na qual o grupo acila é deslocado entre um acilglicerol e um álcool. O teor de água é considerado um fator crítico nessas reações catalíticas, uma vez que pode afetar diretamente a velocidade das reações, a extensão de reações paralelas de hidrólise, os rendimentos dos produtos, a atividade enzimática e a seletividade das reações (BÔAS, 2018).

A TABELA 2, abaixo, demonstra as principais reações catalisadas por lipases, conforme descrito anteriormente.

TABELA 2 – REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

Tipo de reação	Reação
Hidólise de éster	$R-CO-O-R' + H_2O \leftrightarrow R-CO-OH + HO-R'$
Esterificação	$R-CO-OH + HO-R' \leftrightarrow R-CO-OR' + H_2O$
Interesterificação	-
Transesterificação	$R_1-COO- R_1' + R_2-COO- R_2' \leftrightarrow R_1-COO- R_2' + R_2-COO- R_1'$
Acidólise	$R_1-COO- R_1' + R_2-COOH \leftrightarrow R_2-COO- R_1' + R_1-COOH$
Alcoólise	$R_1-COO- R_1' + HO-R_2 \leftrightarrow R_1-COO- R_2 + R_1'-OH$

FONTE: Adaptado de BÔAS (2018).

Nas reações de esterificação, a água é formada na mesma proporção que o produto principal, podendo interferir no equilíbrio reacional quando não são adotadas estratégias para controlar ou remover a quantidade extra de água formada (BÔAS, 2018).

2.4.1 Catálise enzimática em meios aquo-restritos

Ambientes aquo-restritos podem ser classificados em sistemas macro-heterogêneos e micro-heterogêneos. Os sistemas macro-heterogêneos compõem os

sistemas bifásicos ou trifásicos, nos quais a enzima ou o solvente orgânico não são miscíveis em água. Já os sistemas micro-heterogêneos envolvem sistema de micelas reversas (SCILLIPOTI *et al.*, 2017).

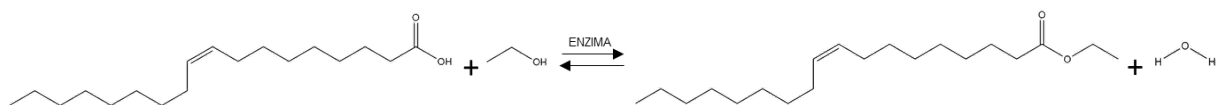
Os sistemas bifásicos aquo-restritos, geralmente são compostos por um reagente hidrofóbico, solúvel no solvente orgânico e um biocatalisador, solúvel em água. O uso desses sistemas permite o deslocamento do equilíbrio da reação, favorecendo a síntese dos produtos. Além disso, a separação dos produtos é facilitada, uma vez que os mesmos são solúveis na fase orgânica e o catalisador na fase aquosa (SCILLIPOTI *et al.*, 2017).

Um dos principais tipos de sistemas bifásicos é o sistema sólido-líquido. Nele, a enzima se encontra na forma sólida suspensa na fase orgânica que contém os substratos. A maioria das lipases é insolúvel em solventes orgânicos, e a enzima é protegida da desnaturação pela formação de uma camada de hidratação ao seu redor (KRUGER, 2017; SCILLIPOTI *et al.*, 2017).

Em meios aquo-restritos as lipases promovem a esterificação entre ácidos graxos e etanol, gerando ésteres oleatos como principal produto e água como subproduto (MELANI, TAMBOURGI, SILVEIRA, 2020; ZANELLA, 2020).

A reação de esterificação empregada no estudo está representada na FIGURA 5.

FIGURA 5 – REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO COM ETANOL GERANDO OLEATO DE ETILA E ÁGUA



FONTE: As autoras (2022).

A reação de esterificação ocorre pela reação de substituição nucleofílica do grupamento acila de um ácido carboxílico com um álcool. Todas as etapas da reação são reversíveis, de modo que a reação pode ser conduzida em qualquer sentido. A reação de esterificação favorece a formação de um éster quando um excesso de álcool é usado como solvente, e a formação de um ácido carboxílico é beneficiada quando há água em excesso (MCMURRY, 2016).

2.5 SOLVENTES ORGÂNICOS

Os solventes orgânicos são compostos químicos, aptos a dissolver, suspender ou extrair outras substâncias sem alterá-las quimicamente. São compostos contendo carbono, geralmente classificados pelo grupo funcional presente na molécula, como por exemplo, álcoois, cetonas, ésteres, éteres, éter glicóis, aminas, hidrocarbonetos aromáticos, alifáticos, ciclos-alifáticos, halogenados ou nitretados e terpenos. Esses grupos geralmente indicam os tipos de interações físico-químicas que podem ocorrer entre o soluto e o solvente (RODRIGUES, 2007).

Os solventes orgânicos podem ser divididos em polares próticos, polares apróticos e não-polares apróticos, de acordo com suas interações com o solvente. A distinção entre eles está principalmente na polaridade do solvente e na sua habilidade de formar pontes de hidrogênio (RODRIGUES, 2007).

Os solventes polares próticos são compostos que apresentam um átomo de hidrogênio ligado a um átomo eletronegativo e são aptos a formar pontes de hidrogênio. Devido a esta habilidade estes solventes são particularmente bons solvatores de ânions (RODRIGUES, 2007).

Os solventes polares apróticos possuem altas constantes dielétricas e momento dipolar. Eles não atuam como formadores de pontes de hidrogênio, pois suas ligações C-H não são polarizadas o suficiente. Entretanto, eles são geralmente bons solvatores de cátions. Dentre os principais solventes dipolares apróticos encontram-se a acetona, acetato de etila, dimetilsulfoxido e nitrobenzeno (RODRIGUES, 2007).

Os solventes não-polares apróticos são caracterizados por uma baixa constante dielétrica, baixo momento dipolar e inabilidade de atuarem como formadores de pontes de hidrogênio. Tais solventes interagem levemente com o soluto, onde apenas forças de indução e de dispersão podem operar. Pertencem a este grupo de solventes hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e seus derivados halogenados, aminas terciárias e bissulfeto de carbono (RODRIGUES, 2007).

Essas substâncias são amplamente empregadas em vários segmentos industriais para processar, manufaturar e formular produtos. Em processos químicos, os solventes são empregados em etapas operacionais como separação de gases, líquidos e/ou sólido, em reações como meio reacional, reagente e agente de arraste, etapas de lavagem, entre outras operações. Além disso, integram produtos

formulados para pintura, tecidos, borrachas, adesivos e muitos outros (RODRIGUES, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Enzimas

Foram utilizadas 2 lipases na forma livre, em estado sólido, não imobilizadas, para o desenvolvimento do estudo, sendo elas: Lipase de *C. rugosa* e Lipase de *Candida cylindracea*. Ambas foram adquiridas por doação.

3.1.2 Reagentes

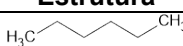
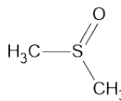
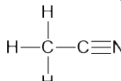
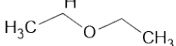

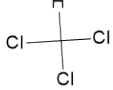
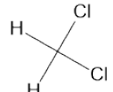
As reações de esterificação catalisada pelas Lipases de *C. rugosa* e *C. cylindracea* foram realizadas com Ácido Oleico (Aldrich®) e Etanol Anidro, na presença de peneira molecular.

As filtrações para a recuperação do produto foram realizadas com sulfato de sódio (Alphatec®) e Hexano (Alphatec®).

Os estudos de co-solventes empregaram 12 solventes orgânicos que se encontram elencados na TABELA 3:

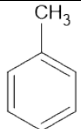

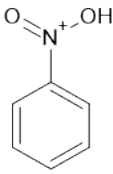
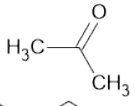

TABELA 3 – CO-SOLVENTES EMPREGADOS NO ESTUDO

(continua)

Co-solventes	Marca	Polaridade Relativa	Estrutura
<i>n</i> -Hexano	Alphatec®	0,009	
DMSO	Synth®	0,444	
Acetonitrila	Honeywell®	0,460	
Éter etílico	Synth®	0,117	
THF	Dinâmica®	0,207	
Clorofórmio	Alphatec®	0,259	
Diclorometano	Alphatec®	0,309	

FONTE: Adaptado de MUROV (2010).

TABELA 3 – CO-SOLVENTES EMPREGADOS NO ESTUDO

			(conclusão)
Co-solventes	Marca	Polaridade Relativa	Estrutura
Tolueno	Neon®	0,099	
Benzeno	Synth®	0,111	
Nitrobenzeno	Dinâmica®	0,450	
Acetona	Neon®	0,355	
<i>n</i> -Heptano	Alphatec®	0,012	

FONTE: Adaptado de MUROV (2010).

As análises cromatográficas utilizaram de diclorometano (Alphatec®), acetato de etila (Êxodo científica®), e cicloexano (Vetec®). Bem como, de uma câmara de revelação cromatográfica de iodo.

E as titulações, hidróxido de sódio 0,1 M, álcool etílico (P.M. 46,07) (Êxodo científica®) e fenolftaleína (Neon®).

3.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: Balança Analítica (Shimadzu™), Incubadora Shaker Refrigerada – LT 600/2 (Limatec®), Agitador Magnético (Centauro®), Placas de Sílica (Fluka analytical™) e Capela de Exaustão de Gases (Max Labor®).

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Síntese de oleato de etila via esterificação catalisada por lipases de *C. rugosa* e *C. cylindracea*

Foi estudada a influência de diferentes temperaturas e a utilização de co-solventes na reação de esterificação do ácido oleico com etanol catalisada por lipases de *C. rugosa* e *C. cylindracea*.

As reações foram realizadas com 0,22 mL ácido oleico, 205 μ L etanol anidro, 10 mg de enzima e 20 mg de peneira molecular. A peneira molecular remove a água da reação (produtos), favorecendo a formação do éster oleato de etila (MCMURRY, 2016).

3.2.1.1 Estudo de temperatura

Para os ensaios de temperatura inicialmente foram empregados microtubos tipo Eppendorf® de 1,5 mL, aos quais foram adicionados a enzima, a peneira molecular, o etanol anidro e o ácido oleico. Preparadas as reações elas foram incubadas em agitador orbital, por 24 horas, a 150 rpm.

Para cada uma das enzimas foram testadas as temperaturas: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C, de acordo com Devi, Radhika e Bhargavi (2017).

Os microtubos foram substituídos por tubos criogênicos de 5 mL para as reações de 45, 50, 55 e 60 °C, uma vez que, com o aumento da temperatura houve o extravasamento das reações.

3.2.1.2 Estudo de co-solventes

As reações com co-solventes, foram realizadas acrescentando, além da enzima, da peneira molecular, e dos reagentes, 1 mL de solvente orgânico por reação. Cada um dos solventes orgânicos foi testado individualmente para cada uma das enzimas. Na temperatura de 25 °C.

Nessa etapa os tubos criogênicos foram substituídos por frascos de vidro com batoque, evitando a interação dos solventes com os componentes plásticos dos frascos.

3.2.1.3 Filtração

Após o período reacional os produtos das reações foram filtrados duas vezes utilizando funil de filtração simples e papel filtro comum (qualitativo). A primeira filtração sucedeu em béqueres contendo 100 mg de sulfato de sódio, o produto dessa foi novamente filtrado em béquer previamente pesado para a quantificação do composto. Ambas as filtrações foram realizadas com 10 mL de hexano, que foi adicionado aos poucos nos produtos, homogeneizado e transferido ao papel filtro.

Em seguida os béqueres contendo os produtos foram dispostos em capela de exaustão de gases para a evaporação do solvente, hexano, e posteriormente pesados.

Para o armazenamento até a realização da cromatografia e titulação os produtos das reações foram diluídos em 1 mL de diclorometano e transferidos a microtubos tipo Eppendorf® de 2 mL, o diclorometano foi evaporado em capela de exaustão de gases e os microtubos contendo apenas os produtos das reações foram dispostos em geladeira a 5°C.

3.2.1.4 Análise qualitativa das reações: cromatografia em camada delgada

Para analisar qualitativamente a formação do produto nas reações, utilizou-se da cromatografia em camada delgada.

Com o auxílio de um capilar foram adicionadas algumas gotas das amostras dissolvidas em diclorometano nos *spots*, pontos próximos a extremidade inferior da placa ou fase estacionária. Essa é composta por uma fina camada de sílica depositada sobre uma placa de alumínio.

A placa foi introduzida em uma cuba de vidro contendo a fase móvel ou eluente, composta pela mistura de solventes, ciclohexano:acetato de etila na proporção 95:5 V/V.

Na técnica a base da placa fica submersa no eluente, a fase móvel interage com a fase estacionária por capilaridade e a compatibilidade entre a polaridade do eluente com a amostra permite a revelação dos compostos de interesse.

A revelação é então realizada a partir da aplicação de um reativo que colore as substâncias, uma vez que se tratam de substâncias incolores. Nesse experimento foi utilizada uma câmara de revelação contendo vapor de iodo.

3.2.1.5 Quantificação do rendimento das reações: microtitulação

O rendimento das reações foi determinado através de microtitulação, avaliando a capacidade de conversão do ácido oleico em oleato de etila. O método baseia-se na reação de neutralização do ácido oleico com hidróxido de sódio.

A partir do volume de NaOH 0,1 M, gastos na titulação determinou-se a quantidade de ácido oleico presente nas amostras. Subtraindo então a quantidade de ácido oleico da massa total titulada determinou-se a quantidade de oleato de etila. O resultado dessa subtração permitiu estimar o rendimento obtido em cada uma das reações.

Em frascos de vidro (tipo penicilina) foram pesadas amostras dos produtos de cada uma das reações separadamente, a esses adicionou-se 3 mL de etanol absoluto e 3 gotas de fenolftaleína. O frasco foi então disposto em agitador magnético, contendo uma barra magnética, homogeneizando a solução. A solução de hidróxido de sódio 0,1 M foi então gotejado na amostra até o indicador de alcalinidade indicar o ponto de viragem através da alteração da coloração da amostra. Finalmente verificou-se o volume de NaOH gasto e esse foi relacionado a reação de neutralização do ácido oleico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO EM RELAÇÃO A VARIACÃO DE TEMPERATURA

A quantificação dos resultados das reações foi realizada através da titulação ácido-base. Os volumes de NaOH gastos para titular as amostras são equivalentes a quantidade de ácido oleico presente nas mesmas. Sendo assim, foi possível determinar o rendimento das reações.

Com o objetivo de determinar o volume exato de NaOH 0,1 M gastos para titular o ácido oleico, inicialmente titulou-se o etanol absoluto em triplicata. Determinou-se a média dos valores, que foi igual a 0,02 mL, e essa foi subtraída dos resultados das titulações dos produtos.

Em seguida determinou-se o volume de NaOH gastos nas titulações dos produtos das reações de esterificação. Os resultados obtidos estão descritos na TABELA 4.

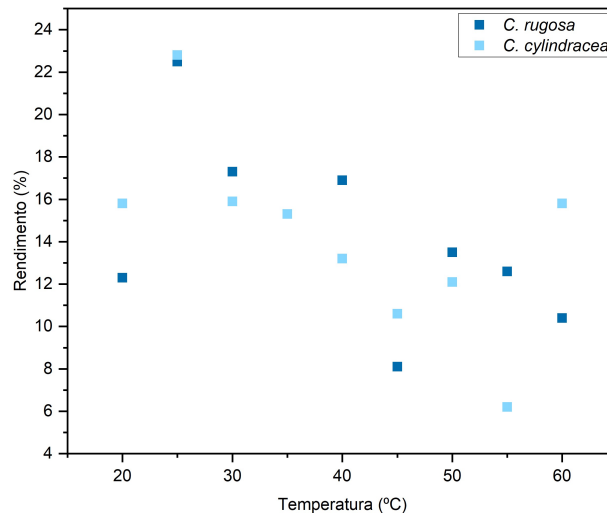
TABELA 4 – TITULAÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE TEMPERATURA

Temperatura (°C)	Rendimento (%)	
	<i>C. rugosa</i>	<i>C. cylindracea</i>
20	12,3	15,8
25	22,5	22,8
30	17,3	15,9
35	15,3	15,3
40	16,9	13,2
45	8,1	10,6
50	13,5	12,1
55	12,6	6,2
60	10,4	15,8

Fonte: As autoras (2022).

Para melhor visualização dos rendimentos para os testes de temperatura os resultados obtidos foram plotados no gráfico 1.

GRÁFICO 1 – RENDIMENTO DAS REAÇÕES COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA

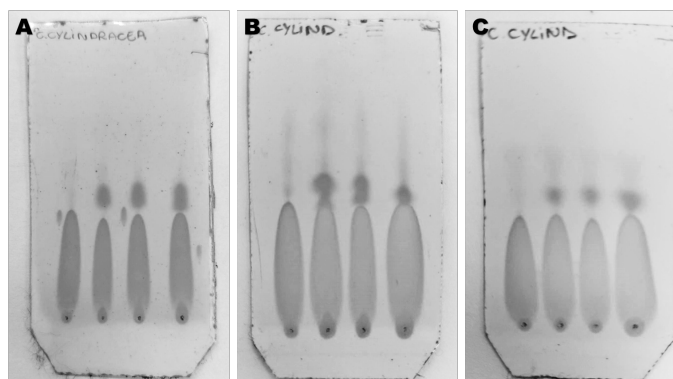


Fonte: As autoras (2022).

Os maiores rendimentos de reação para ambas as enzimas foram aos 25 °C, de modo que essa foi a temperatura selecionada para o estudo com os co-solventes.

A conversão dos reagentes nos produtos também foi observada através da caracterização qualitativa cromatográfica para a lipase de *C. cylindracea*, conforme representado pela FIGURA 6.

FIGURA 6 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA CATÁLISE DE ÁCIDO OLEICO POR *C. cylindracea* PARA DIFERENTES TEMPERATURAS

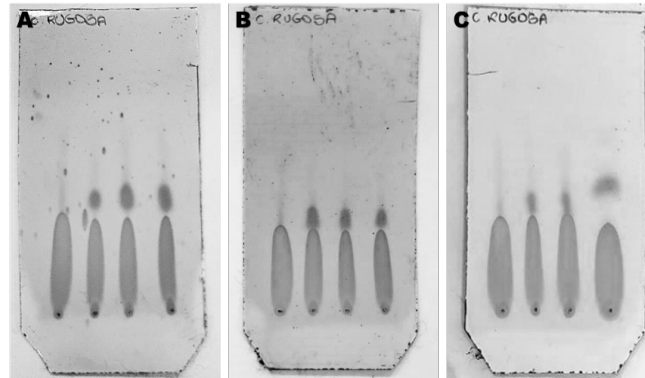


FONTE: As autoras (2022).

LEGENDA: A) Ácido oleico; 20°C; 25°C; 30°C. B) Ácido oleico; 35°C; 40°C; 45°C. C) Ácido oleico; 50°C; 55°C; 60°C

O mesmo foi observado para a lipase de *C. rugosa*, de acordo com a FIGURA 7 disposta a seguir:

FIGURA 7 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA CATÁLISE DE ÁCIDO OLEICO POR *C. rugosa* PARA DIFERENTES TEMPERATURAS



FONTE: As autoras (2022).

LEGENDA: A) Ácido oleico; 20°C; 25°C; 30°C. B) Ácido oleico; 35°C; 40°C; 45°C. C) Ácido oleico; 50°C; 55°C; 60°C.

Nas figuras 6 e 7 é possível observar a conversão do ácido oleico e etanol em oleato de etila, quando comparadas as reações para as diferentes temperaturas com o ácido oleico, disposto nos primeiros *spots* de cada placa.

A temperatura em reações de esterificação, catalisada por enzimas, exerce forte influência sobre os rendimentos. As enzimas em sua forma livre sofrem perda na estabilidade frente a elevadas temperaturas, proporcionando menores rendimentos.

Cea *et al.*, (2019) estudaram a síntese de oleato de etila em reações de esterificação do ácido oleico, na temperatura de 30 °C, empregando lipase de *C. rugosa* na forma livre e imobilizada em *biochar*. Os autores observaram uma melhora significativa na estabilidade térmica com a imobilização da lipase.

Devi, Radhika e Bhargavi (2017) avaliaram o efeito da temperatura na síntese de butirato de etila, em reações de esterificação empregando lipase de *C. rugosa*. Os autores verificaram aumento linear na porcentagem de esterificação com o aumento da temperatura de reação de 30 °C a 50 °C, atingindo 92,6% em 96 h de incubação. No entanto, ao aumentar a temperatura além de 50°C, observaram uma redução para 80% a 65°C e 58% a 70°C.

Salihu *et al.*, (2014) exploraram a reação de esterificação para formação de butirato de butila empregando uma lipase de *C. cylindracea* comercial e uma lipase

de *C. cylindracea* produzida a partir de meio suplementado com efluente de fábrica de óleo de palma, incubadas a 35 °C. Os autores investigaram velocidades de agitação de 50-200 rpm, encontrando rendimento máximo de esterificação a 150 rpm. Também avaliaram o efeito da concentração das lipases (30, 45, 60, 75 e 90 U/mg). O maior rendimento de esterificação foi de 84,22% obtido empregando a lipase comercial em razão molar e concentração de enzima de 10 e 75 U/mg, respectivamente, comparado ao rendimento de 60,34% pela enzima produzida nas mesmas condições.

4.2 RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO EM RELAÇÃO AOS CO SOLVENTES EMPREGADOS

Os rendimentos das reações de co-solventes e os incrementos em comparação as reações realizadas sem os solventes estão dispostos na TABELA 5.

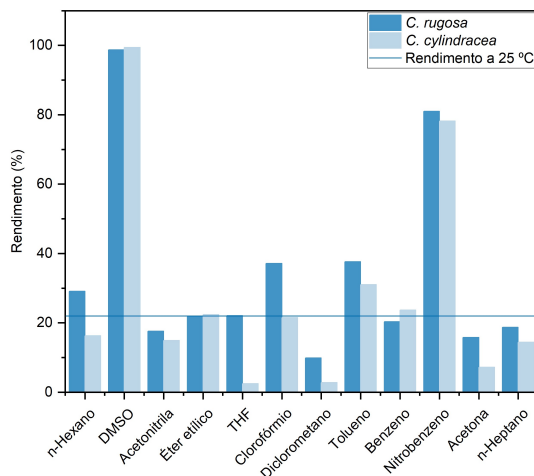
TABELA 5 – TITULAÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES COM CO-SOLVENTES

Co-solventes	<i>C. rugosa</i>		<i>C. cylindracea</i>	
	Rendimento (%)	Incremento (%)	Rendimento (%)	Incremento (%)
<i>n</i> -Hexano	29,1	6,6	16,3	-
DMSO	98,7	76,2	99,4	76,6
Acetonitrila	17,6	-	14,9	-
Éter etílico	21,8	-	22,4	-
THF	22,1	-	2,5	-
Clorofórmio	37,1	14,6	21,5	-
Diclorometano	9,9	-	2,8	-
Tolueno	37,6	15,1	31,0	8,2
Benzeno	20,3	-	23,7	0,9
Nitrobenzeno	81,0	58,5	78,2	55,4
Acetona	15,8	-	7,2	-
<i>n</i> -Heptano	18,7	-	14,4	-

Fonte: As autoras (2022).

Para melhor visualização os resultados foram plotados no GRÁFICO 2, a seguir:

GRÁFICO 2 – RENDIMENTO DAS REAÇÕES COM DIFERENTES CO-SOLVENTES



Fonte: As autoras (2022).

Conforme os resultados obtidos, observa-se que para ambas as enzimas o solvente com maior influência positiva é o DMSO seguido pelo nitrobenzeno.

O DMSO é um composto utilizado como solvente orgânico dipolar aprótico, cuja polaridade relativa é 0,444.

De acordo com Lima (2015), solventes polares apróticos, como o DMSO e a acetonitrila, tendem a aumentar as velocidades das reações, pois favorecem intermediários e estados de transição, enquanto os solventes próticos tendem a deixar o nucleófilo menos reativo devido as ligações de hidrogênio.

Em relação a *C. rugosa* o tolueno, o clorofórmio e o *n*-hexano, também proporcionaram incremento no rendimento em relação a reação de esterificação do ácido oleico e etanol anidro na presença apenas do catalisador enzimático e peneira molecular.

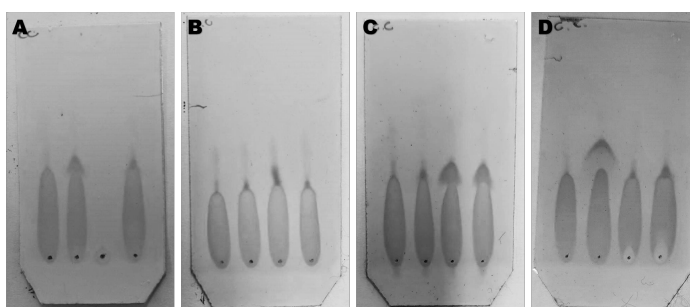
Para *C. cylindracea*, um aumento no rendimento foi observado, para, além das reações contendo DMSO e nitrobenzeno, às reações que ocorreram na presença do tolueno e benzeno.

Segundo Lima (2015), clorofórmio e THF são bastante úteis, mesmo que estes acarretem em reações mais lentas, eles são mais fáceis de serem eliminados do sistema, facilitando os processos de purificação.

Outra questão importante de se salientar é que geralmente as lipases apresentam alta estabilidade em solventes orgânicos, principalmente nos solventes orgânicos de baixa polaridade. Além disso, os solventes apolares são responsáveis pela solubilização da maioria dos compostos do meio reacional, facilitando o contato da enzima com o substrato e evitando-se a inibição pelo excesso de produto, pois o produto encontra-se diluído no meio (KRUGER, 2017).

A análise qualitativa permitiu verificar a conversão dos reagentes nos produtos conforme dispostos nas figuras 8 e 9.

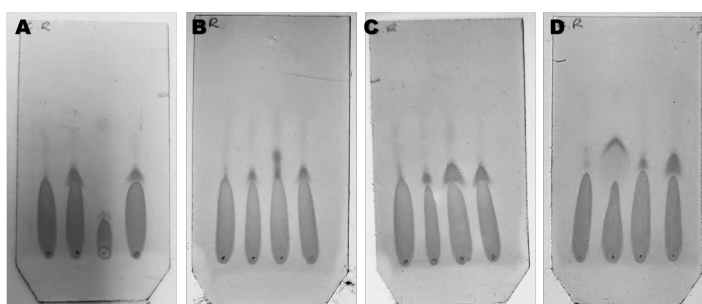
FIGURA 8 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA CATÁLISE DE ÁCIDO OLEICO POR *C. cylindracea* PARA DIFERENTES CO-SOLVENTES



FONTE: As autoras (2022).

LEGENDA: A) Ácido oleico; *N*-Hexano; DMSO; Acetonitrila. B) Ácido oleico; Éter Etílico; THF; Clorofórmio. C) Ácido oleico; Diclorometano; Tolueno; Benzeno. D) Ácido oleico; Nitrobenzeno; Acetona; *n*-Heptano.

FIGURA 9 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA CATÁLISE DE ÁCIDO OLEICO POR *C. rugosa* PARA DIFERENTES CO-SOLVENTES



FONTE: As autoras (2022).

LEGENDA: A) Ácido oleico; *N*-Hexano; DMSO; Acetonitrila. B) Ácido oleico; Éter Etílico; THF; Clorofórmio. C) Ácido oleico; Diclorometano; Tolueno; Benzeno. D) Ácido oleico; Nitrobenzeno; Acetona; *n*-Heptano.

Entretanto, para os estudos contendo DMSO a cromatografia sofreu influência do solvente impossibilitando sua visualização.

Estudos de reações de esterificação catalisadas por enzimas na presença de co-solventes demonstraram ser viáveis para a obtenção de ésteres.

Dentre esses, a pesquisa realizada por Medeiros *et al.*, (2021), demonstrou que a reação de esterificação catalisada por lipase oriunda de *Candida antarctica* tipo B (CALB) imobilizada, reagiu com a acetona proporcionando uma conversão de 78,42%, evidenciando a eficiência catalítica frente a presença do solvente orgânico.

An *et al.*, (2019) investigaram a síntese de éster de glicose empregando Novozyme 435 como catalisador, frente a solventes orgânicos como o n-hexano, THF, terc-butanol. De acordo com os autores a lipase apresentou maior atividade catalítica no solvente THF do que em outros solventes hidrofóbicos. Além disso, verificaram que a adição fracionada do solvente polar THF ou terc-butanol em n-hexano hidrofóbico levou a conversões mais altas, mostrando que a conversão foi significativamente melhorada na presença do co-solvente.

Além disso, Pappalardo *et al.*, (2017) estudaram o efeito de diferentes quantidades de DMSO em reações de esterificação da L-(+)-arabinose com ácido palmítico catalisada pela lipase B de *C. antarctica*. Os autores verificaram 22 % de conversão de ácido palmítico em 24 h usando 10 % (v/v) de DMSO em terc-butanol, a 60 °C e com razão equimolar dos substratos. Por um lado, maiores quantidades de DMSO no meio reacional levaram tanto à diminuição das taxas de conversão quanto da atividade do biocatalisador.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidenciou-se a necessidade de estudos empregando lipases de *C. rugosa* e *C. cylindracea* uma vez que se tratam de enzimas versáteis, que apresentam estabilidade a altas temperaturas, ampla faixa de atuação em relação ao pH, apresentam grande seletividade e são de fácil produção. A síntese de ésteres apesar de poder ser conduzida por via química, apresenta desvantagens associadas ao custo energético, exigindo condições operacionais elevadas de temperatura e pressão. Além disso, os catalisadores químicos apresentam baixa especificidade. Sendo assim, os biocatalisadores tornam-se uma ferramenta interessante, demandando estudos a seu respeito.

O presente trabalho permitiu verificar que ambas enzimas apresentaram melhor desempenho na temperatura de 25 °C. Apesar de essas enzimas exibirem alta estabilidade frente a elevadas temperaturas, estudos demonstraram que a temperatura ótima para a atividade enzimática de lipases provenientes de leveduras do gênero *Candida* é em torno de 30 °C.

Em relação aos solventes orgânicos, sua utilização permitiu melhorar o desempenho da reação catalítica de esterificação entre o ácido oleico e o etanol anidro na presença de ambas as enzimas. O DMSO apresentou os resultados mais promissores o que possivelmente se deu em função de suas características de organocatalisador. O mesmo foi observado para o nitrobenzeno. Adicionalmente, ambos são solventes polares apróticos, que em reações químicas favorecem os mecanismos de reação S_N2.

Portanto, o trabalho permitiu avaliar a influência da temperatura e da utilização de co-solventes na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol catalisada pelas lipases de *C. rugosa* e *C. Cylindracea*. Verificou-se que ambas se comportam de forma semelhante frente a variação de temperatura, bem como, na presença dos solventes orgânicos.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Comparar a atividade catalítica da enzima à atividade catalítica dos solventes orgânicos, por meio de reações empregando apenas os organocatalisadores, sem

adição de enzimas, a fim de verificar a influência dos co-solvente e das enzimas nas reações de esterificação do ácido oleico e etanol anidro.

Avaliar variáveis como a relação estequiométrica dos reagentes, o tempo de reação, a concentração de enzima e a velocidade de agitação, buscando compreender melhor a influência desses parâmetros na esterificação enzimática de ácido oleico com etanol.

REFERÊNCIAS

AN, D., *et al.* Synthesis, surface properties of glucosyl esters from renewable materials for use as biosurfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2019, 577: 257-264. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.05.079>. Acesso em: 05 set. 2022.

ARTHY, M., *et al.* Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical engineering research and design**, 2014, v. 92, n. 8, p. 1591-1601. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.04.008>. Acesso em: 19 jun. 2022.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00125-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00125-5). Acesso em: 13 ago. 2022.

BALDO, C. *et al.* **Utilization of agroindustrial byproducts for the production of lipase by a new strain of Pseudomonas sp.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 41, n. 2, p. 165, 2020. Disponível em: <https://proceedings.science/acpm/cpm/papers/utilization-of-agroindustrial-byproducts-for-the-production-of-lipase-by-a-new-strain-of-pseudomonas-sp?lang=en#>. Acesso em: 08 ago. 2022.

BÔAS, R. de N. V. **Óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades aromáticas, emulsificantes e lubrificantes por biotransformação utilizando lipases imobilizadas.** 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.97.2019.tde-12072019-110723>. Acesso em: 13 ago. 2022.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. Enzyme Classification. *In*: BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. Biocatalysts and enzyme technology. 2^a ed. Alemanha: John Wiley & Sons, 2012. não p.

CARDOSO, T. S *et al.* Uma revisão da utilização de catalisadores heterogêneos para a produção de biodiesel. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 1, p. 240-276, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34115/basrv4n1-016>. Acesso em: 19 set. 2022.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

CEA, M. *et al.* Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar. **Journal of environmental management**, v. 242, p. 171-177, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.013>. Acesso em: 05 set. 2022.

CHANG, R.; GOLDSBY, K. A. Química. 11. ed. Porto Alegre: AMGH; Bookman, 2013. 1168 p.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. de; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, p. 85-96, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100025>. Acesso em: 12 ago. 2022.

CUESTA, S. M. *et al.* The classification and evolution of enzyme function. **Biophysical journal**, v. 109, n. 6, p. 1082-1086, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.020>. Acesso em: 19 jan. 2022.

DALBERTO, B. T. Biocatálise. *In*: SIMOMUKAY, E.; *et al.* **Engenharia Bioquímica**. Porto Alegre: Grupo A, 2022. 9786556901732. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786556901732/>. Acesso em: 09 ago. 2022. Acesso em: 09 ago. 2022.

DEVI, N. A.; RADHIKA, G. B.; BHARGAVI, R. J. Lipase catalyzed transesterification of ethyl butyrate synthesis in n-hexane - a kinetic study. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 9, p. 2871-2877, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2725-2>. Acesso em: 05 set. 2022.

FABER, K. (ed.) *In*: Biotransformations in Organic Chemistry: a Textbook, 6rd ed., Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 2011, 436p.

FERRAZ, J. L. DE A. A, *et al.* Obtenção de lipases microbianas: uma breve revisão. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, Santa Cruz, v. 20, n. 1, p. 30-54, jan./jun. 2018. Disponível em: <https://revistas.unicentro.br/index.php/RECEN/article/view/4579>. Acesso em: 19 jun. 2022.

FERNANDES, A. S. **Solid state fermentation to add value to vegetable oil cakes**. 2022. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2022. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/77449>. Acesso em: 12 ago. 2022.

GOMES, P. H. L. *et al.* Avaliação da eficiência catalítica de lipases combinadas na síntese de oleato de etila. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 57., 2017, Gramado. **Anais...** Gramado: Associação Brasileira de Química- ABQRS, 2017. Não p. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2017/trabalhos/13/10665-24270.html>. Acesso em: 18 jun. 2022.

Guncheva M, Zhiryakova D. 2011. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68: 1-21.

KHUNNAMWONG, P. *et al.* Description of Diutina gen. nov., Diutina siamensis, fa sp. nov., and reassignment of Candida catenulata, Candida mesorugosa, Candida neorugosa, Candida pseudorugosa, Candida ranongensis, *Candida rugosa* and Candida scorzettiae to the genus Diutina. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. Pt_12, p. 4701-4709, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000634>. Acesso em: 12 ago. 2022.

KRUGER, C. Síntese enzimática de éster do biodiesel a partir de lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* produzidas por fermentação no estado sólido. 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2017. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/handle/tede/3558>. Acesso em: 12 ago. 2022.

LIMA, D. **Investigando mais a fundo as reações de 1, 2-dicloro-4, 5-dinitrobenzeno e 2, 3-dicloro-6, 7-dinitroquinoxalina com aminas: estudo sintético e teórico**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Bacharelado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/38198>. Acesso em: 12 ago. 2022.

MANFRÃO NETTO, J. H. C. **Microrganismos geneticamente modificados aplicados à biocatálise**. 2021. 85 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/41537>. Acesso em: 09 ago. 2022.

MARÍA, P. D. *et al.* Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 2, p. 180-196, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.003>. Acesso em: 12 ago. 2022.

MCMURRY, J. **Química Orgânica - Volume 2: Tradução da 9ª edição norte-americana**. São Paulo: Cengage Learning Brasil, 2016. 9788522125319. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522125319/>. Acesso em: 09 ago. 2022.

MEDEIROS, R. de C. P. *et al.* Síntese de ésteres derivados do glicerol produzidos através de catálise enzimática. 2021. Disponível em: <https://200.137.2.163/handle/1044/2027>. Acesso em: 05 set. 2022.

MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: from production to applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143-158, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>. Acesso em 16 jun. 2022.

MORAIS JÚNIOR, W. G. de. *et al.* Produção de lipase por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* empregando melão de soja. 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15198>. Acesso em: 12 ago. 2022.

MUROV, S. **Properties of Organic Solvents**, Miller's Home, University of Notre Dame, EUA, 2010. Disponível em: <https://sites.google.com/site/miller00828/in/solvent-polarity-table>. Acesso em: 12 ago. 2022.

NETA, N. S. *et al.* Produção enzimática do éster oleato de etila utilizando lipase a partir de *Candida antarctica* B. **HOLOS**, v. 2, p. 22-33, 2012. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1822/32551>. Acesso em: 16 jun. 2022.

PAPPALARDO, V. M., *et al.* Synthesis and characterization of arabinose-palmitic acid esters by enzymatic esterification. **Molecular Catalysis**, 2017, 433: 383-390. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2017.02.029>. Acesso em: 05 set. 2022.

PERKINS, C. *et al.* Biotechnological applications of microbial bioconversions. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1050-1065, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1083943>. Acesso em: 11 ago. 2022.

PINTO, G. C. **Óxido de grafeno magnético: uma estratégia para imobilização de lipases**. 2019. 40 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP. 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/180901>. Acesso em 19 jun. 2022.

PINTO, F. T. R. **Obtenção de álcoois e ésteres quirais utilizando lipases e resolução cinética enzimática da ketamina e análogos**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/34940>. Acesso em: 13 ago. 2022.

PLETNEV, V. *et al.* Three-dimensional structure of homodimeric cholesterol esterase–ligand complex at 1.4 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 59, n. 1, p. 50-56, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S0907444902018851>. Acesso em: 12 ago. 2022.

REIS, E. A. dos. Estudo da influência de nanopartículas de ouro na atividade de lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em nanopartículas superparamagnéticas. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/13039>. Acesso em: 19 jun. 2022.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Editora Blucher, 2016. 9788521211150. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521211150/>. Acesso em: 11 ago. 2022.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bse0590001>. Acesso em: 19 jun. 2022.

RODRIGUES, E. Aspectos gerais. In: GARBELOTTO, P. **Solventes industriais**. São Paulo. Editora Blucher, 2007. E-book. ISBN 9788521215127. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521215127/>. Acesso em: 19 set. 2022.

SALIHU, A. *et al.* Esterification for butyl butyrate formation using *Candida cylindracea* lipase produced from palm oil mill effluent supplemented medium. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 1159-1165, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.08.012>. Acesso em: 05 set. 2022.

SALUM, T. F. C. **Produção e imobilização de lipase de Burkholderia cepacia LTEB11 para a síntese de ésteres etílicos**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/882764>. Acesso em: 16 jun. 2022.

SCILLIPOTI, J. *et al.* **Prediction of Conversion at Equilibrium for Lipase Esterification in Two-Phase Systems**. *Biochem. Eng. J.*v.117, p.162– 171. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.012>. Acesso em: 13 ago. 2022.

SOUZA, L. T. DE A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. 1.* Editora Blucher, 2017. p. 529–568. Disponível em: <https://doi.org/10.5151/9788521211150-15>. Acesso em: 19 jun. 2022.

TORRES, B. B. Elementos de Enzimologia. *In: ALTERTHUM, Flávio. Biotecnologia industrial: fundamentos*. São Paulo. Blucher, 2020. 9788521218975. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521218975/>. Acesso em: 11 ago. 2022.

TURATI, D. F. M. **Influência de parâmetros nutricionais e físicos sobre a produção de Lipase por Penicillium janthinellum**. 2012. 42 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, SP, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/121634>. Acesso em: 16 jun. 2022.

TWEDDELL, R. J. *et al.* Esterification and interesterification activities of lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: a comparative study. **Enzyme and microbial technology**, v. 22, n. 6, p. 439-445, 1998.

VANLEEUEW, E. *et al.* Substrate-specificity of *Candida rugosa* lipase and its industrial application. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 19, p. 15828-15844, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b03257>. Acesso em: 19 jun. 2022.

ZANELLA, R. A. **Síntese enzimática do éster oleato de etila a partir de lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* produzidas por fermentação no estado sólido**. 2020. 51 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, PR, 2020. Disponível em: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/4971>. Acesso em: 18 jun. 2022.

ZISIS, T. *et al.* Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: combined evidence from experiment and simulation. **Biochemistry**, v. 54, n. 38, p. 5969-5979, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00586>. Acesso em: 19 jun. 2022.