

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS (CCMF)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU-SENSU EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**Uma abordagem sobre a produção de lipases do gênero *Penicillium* e
suas potenciais aplicações biotecnológicas**

JAQUELINE HECK

CASCAVEL, PR
2021

JAQUELINE HECK

Uma abordagem sobre a produção de lipases do gênero *Penicillium* e suas potenciais aplicações biotecnológicas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em cumprimento aos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas em saúde.

Orientadora: Professora Dra. Rosemeire Aparecida da Silva de Luca

Co-Orientadora: Professora Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

CASCADEL, PR
2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Heck, Jaqueline
Uma abordagem sobre a produção de lipases do gênero Penicillium e suas potenciais aplicações biotecnológicas / Jaqueline Heck; orientadora Rosemeire Aparecida da Silva de Luca; coorientadora Maria Luiza Fernandes Rodrigues. -- Cascavel, 2021.
64 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2021.

1. biotecnologia. 2. penicillium. 3. lipase. I. da Silva de Luca, Rosemeire Aparecida, orient. II. Fernandes Rodrigues, Maria Luiza , coorient. III. Título.

JAQUELINE HECK

Uma abordagem sobre a produção de lipases do gênero *Penicillium* e suas potenciais aplicações biotecnológicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rosemeire Aparecida da Silva de Luca

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Rosemeire Aparecida da Silva de Luca
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador



VÁLIDO SOMENTE NA UNIOESTE-SEM VALOR LEGAL-
VÁLIDO SOMENTE NA UNIOESTE-SEM VALOR LEGAL-
VÁLIDO SOMENTE NA UNIOESTE-SEM VALOR LEGAL-
VÁLIDO SOMENTE NA UNIOESTE-SEM VALOR LEGAL-

Prof. Dr. Marina Kimiko Kadowaki
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE



Prof. Dr. Karina Graziella Fiametti Colombo
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR)

Cascavel - PR
2021

BIOGRAFIA

Jaqueline Heck, nascida em 15 de junho de 1990, na cidade de Toledo-PR, residente na cidade de Toledo, formada em Farmácia Generalista pela Universidade Paranaense (UNIPAR) no ano de 2012. Especialista em Análises Clínicas pela UNIPAR, concluída no ano de 2014. Trabalhou como farmacêutica bioquímica no Laboratório de Análises Clínicas da UNIPAR, entre os anos de 2013 e 2017; posteriormente, atuou como farmacêutica em Farmácias comerciais nos municípios de Toledo e Marechal Cândido Rondon. Atualmente, é farmacêutica clínica no Ambulatório de Infectologia do Consórcio Intermunicipal de Saúde Costa Oeste (CISCOPAR), situado na cidade de Toledo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho para Deus, que sempre esteve comigo nos momentos mais difíceis, oferecendo-me forças e sabedoria para concluir mais uma etapa em minha vida; também, à minha família, que sempre me apoiou nos meus sonhos e me ensinou os princípios que regem meus dias: responsabilidade, perseverança e honestidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a oportunidade de aprimorar o meu conhecimento com a chance de entrar no mestrado, quando achava que isso não era para mim, subestimando a minha capacidade.

Agradeço à minha família, em especial, à minha mãe, Sirlei Terezinha Rambo, por ter me apoiado e incentivado a não desistir nos dias em que o desânimo era grande. Você me ensinou a ser uma pessoa responsável, determinada e comprometida.

Ao meu pai, Valdemar Heck (*in memoriam*), por ter estado comigo mesmo que lá do alto, me concedendo a sua garra. Não tive a oportunidade de passar muito tempo com você, mas tenho certeza de que sempre quis o meu melhor.

Agradeço aos meus avós, Noeli Cecília Rambo e Paulo Leonardo Rambo, por torcerem pela minha felicidade e realização dos meus sonhos.

Agradeço à minha maior incentivadora e amiga, Thalita Faleiros Demito Santos, que sempre me deu ânimo para concluir cada etapa dessa jornada, me trazia uma palavra de força e acalento quando a vontade de desistir era maior.

Agradeço ao meu namorado, Alan Pinheiro de Almeida, por ter aparecido em minha vida quando eu menos esperava e, ao mesmo tempo, quando eu mais precisava: eu te amo.

Agradeço à minha orientadora, Profa Dra. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca, que me acolheu desde a primeira conversa, até os dias difíceis entre as mudanças de empregos que tive nesse período. Sou imensamente grata por poder compartilhar o seu conhecimento e experiência comigo, assim como pela sua compreensão e amizade quando a dificuldade apertava.

À minha coorientadora, Profa Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues, pela sua disponibilidade de auxiliar nos poucos momentos em que estive no laboratório, logo no início da pesquisa, assim como por agregar e melhorar este trabalho com sua experiência.

Agradeço às bancas, Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki e Profa. Dra. Karina Graziella Fiametti Colombo, por aceitarem o convite e compartilharem sua experiência e conhecimento para o aprimoramento deste trabalho. Profa. Marina, jamais esquecerei suas aulas no laboratório, pois foram essenciais para compreender sobre o mundo das enzimas e me certificar do amor que tinha pela bioquímica.

Aos meus amigos e amigas, que estiveram comigo durante o período do mestrado; sem citar nomes para não esquecer de ninguém, vai aqui meu muito obrigada, pelo apoio, por entenderem minhas ausências quando necessário e comemorarem comigo a alegria de cada etapa finalizada.

À equipe do Ambulatório de Infectologia do Ciscopar – Toledo/PR, que me apoiou e incentivou com cada abraço e palavra amiga, mesmo com a correria do dia-dia de trabalho.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

Roberto Shinyashike

Uma abordagem sobre a produção de lipases do gênero *Penicillium* e suas potenciais aplicações biotecnológicas

RESUMO

As lipases pertencem ao grupo das hidrolases e apresentam uma estrutura tridimensional alfa/beta muito característica quanto à localização do sítio ativo da enzima. Entre as suas diversas funções, são responsáveis por catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, liberando os ácidos graxos correspondentes (monoglicerídeos, diglicerídeos) e glicerol, no entanto, as lipases podem participar de reações de esterificação, inesterificação e transesterificação (alcoólise, acidólise e aminólise). Entre as fontes de lipases, estão as vegetais e animais, entretanto, a sua obtenção, a partir de microrganismos, tem se tornado uma alternativa mais econômica e viável. A produção de lipases microbianas ocorre por processos fermentativos, como a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). Após sua produção, é necessário separar a enzima de interesse por meio de processos de purificação, que envolvem etapas de separação, concentração e cromatografias. Durante as etapas de produção e purificação, realiza-se a dosagem da atividade lipolítica por meio de métodos colorimétricos ou titulométricos, evidenciando, assim, a eficácia da enzima obtida. No que se refere às aplicabilidades, destaca-se o uso das lipases, na indústria alimentícia, farmacêutica, química e biotecnológica, como na biorremediação de resíduos agroindustriais e produção de biodiesel. O presente trabalho tem como objetivo principal elaborar uma revisão bibliográfica destacando as principais aplicações das lipases obtidas pelo fungo *Penicillium sp.*, assim como relatar as características físico-químicas que envolvem o processo de fermentação. Demonstrou-se a aplicação das lipases obtidas do fungo *Penicillium sp.* em diferentes áreas industriais, enfatizando as áreas de biorremediação de resíduos agroindustriais e produção de biodiesel. Evidencia-se a busca pela redução dos custos de produção de lipases, bem como o aumento da sua estabilidade em relação ao pH, temperatura e sua atividade lipolítica para uso em escala industrial. Concluiu-se que a maior parte das lipases atualmente disponíveis são utilizadas nas áreas ambientais, tanto de biorremediação quanto na produção de biocombustível e verificou-se uma intensa utilização do método fermentativo submerso para a produção das lipases devido à sua propriedade de mimetizar o habitat dos microrganismos utilizados no processo. Verificou-se a carência de novos estudos envolvendo lipases com aplicações nas áreas da saúde e indústria alimentícia.

Palavras-chaves: biodiesel, biorremediação. enzimas, fermentação, fungos.

An approach to the production of lipases from the *Penicillium* genus and their potential biotechnological applications

ABSTRACT

Lipases belong to the group of hydrolases and have a three-dimensional alpha/beta structure that is very characteristic in terms of the location of the active site of the enzyme. Among their various functions, these are responsible for catalyzing the hydrolysis of long-chain triacylglycerols, releasing the corresponding fatty acids (monoglycerides, diglycerides) and glycerol, however, lipases can participate in esterification, interesterification and transesterification (alkalosis, acidolysis and aminolysis). Among the sources of lipases, there are plants and animals, however, obtaining them from microorganisms has become a more economical and viable alternative. The production of microbial lipases occurs by fermentation processes such as solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SF). After its production, it is necessary to separate the enzyme of interest through purification processes, which involve separation and concentration steps, and then carry out the chromatographic methods. During the stages of production and purification, the lipolytic activity is measured using colorimetric or titrimetric methods, thus showing the effectiveness of the enzyme obtained. About applicability, the use of lipases in the food, pharmaceutical, chemical and biotechnological industries, such as in the bioremediation of agro-industrial residues and in the production of biodiesel, stands out. The main objective of this work is to elaborate a bibliographical review highlighting the main applications of lipases obtained by the fungus *Penicillium* sp., as well as to report the physicochemical characteristics that involve the fermentation process. The application of lipases obtained from the fungus *Penicillium* sp. in different industrial areas, emphasizing the areas of agro-industrial waste bioremediation and biodiesel production. The search for the reduction of lipase production costs is evident, as well as the increase of its stability in relation to pH, temperature and its lipolytic activity for use on an industrial scale. It was concluded that most of the lipases currently available are used in environmental areas, both for bioremediation and for biofuel production, and there was an intense use of the submerged fermentation method for the production of lipases due to its property of mimicking the habitat of microorganisms used in the process. There was a lack of new studies involving lipases with applications in the health and food industry.

Keywords: biodiesel, bioremediation, enzymes, fermentation, fungus.

SUMÁRIO

Introdução.....	xii
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	1
1.1. Enzimas	1
1.2. Definição e características estruturais das lipases	2
1.3. Reações catalisadas por lipases	5
1.4. Fontes das lipases	6
1.5. Gênero <i>Penicillium</i> sp.	8
1.6. Métodos fermentativos na produção de lipases	9
1.6.1. Fermentação em Estado Sólido	10
1.6.2. Fermentação Submersa	11
1.7. Purificação das lipases	13
1.8. Dosagem lipolítica	17
1.9. Aplicações biotecnológicas das lipases	18
1.10 Referências Bibliográficas	21
Capítulo 2 – Artigo submetido ao Periódico Applied Biochemistry an Biotechnology	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicação industriais de lipases..... 19

ARTIGO:

Tabela 1 – Lipases obtidas do gênero *Penicillium* e suas atividades lipolíticas relacionadas aos substratos..... 53

Tabela 2 – Aplicações potenciais de lipases obtidas de diversas espécies de *Penicillium* 53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da hidrólise de triacilglicerídeos por lipases	3
Figura 2 – Esquema da conformação α/β das lipases.....	4
Figura 3 – Mecanismo catalítico das lipases	4
Figura 4 – Ativação interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas	5
Figura 5 – Reações catalisadas por lipases	6
Figura 6 – Morfologia microscópica do fungo <i>Penicillium roqueforti</i>	8
Figura 7 – Morfologia da colônia do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i>	9
Figura 8 – Fermentação em estado sólido para produção de lipases	11
Figura 9 - Esquema da purificação de lipases microbianas	13
Figura 10 – Separação de proteínas por cromatografia de troca iônica	14
Figura 11 - Separação de proteínas por cromatografia de interação hidrofóbica ..	14
Figura 12 - Separação por cromatografia de exclusão molecular.....	15
Figura 13 - Determinação da atividade lipolítica através de método titulométrico ..	17
Figura 14 - Reação de Hidrólise do substrato sintético p-NPP por lipases	17

ARTIGO:

Figura 1 – Reação de lipólise para obtenção de ácidos graxos	48
Figura 2 – Fatores que influenciam a fermentação submersa (SF)	49
Figura 3 – Fatores que influenciam a fermentação em estado sólido (SSF)	50
Figura 4 – Etapas de transesterificação para produção de biodiesel	51
Figura 5 – Evolução das aplicações das lipases obtidas do <i>Penicillium</i> sp.....	52

INTRODUÇÃO

O emprego das enzimas tem se intensificado com o passar dos anos, devido à sua versátil aplicação na catálise de reações. Entretanto, o uso das lipases tem se evidenciado por causa de sua capacidade de catalisarem diferentes reações, entre elas: hidrólise, esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise, aminólise e lactonização.

O aumento no uso das lipases deve-se ainda às variadas fontes dessas moléculas, destacando-se os microrganismos que podem estar disponíveis no meio ambiente e que produzem eficientes quantidades dessas enzimas. A produção a partir de microrganismos é realizada com base em dois processos: fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).

Existem diversos fungos filamentosos que são bons produtores de lipases, entre os quais se destacam os do gênero *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Candida* sp. e *Pseudomonas* sp., que podem ser submetidos às fermentações em estado sólido, pois utilizam resíduos agroindustriais como substrato para o fungo, mimetizando o habitat natural do microrganismo.

Diversos setores biotecnológicos utilizam as lipases para diferentes aplicações, entre eles: alimentício, médico, farmacêutico, cosmético, produção de detergentes, produção de biodiesel e biorremediação.

Nesse contexto, o presente estudo realizou uma revisão bibliográfica que evidenciou a produção de lipases a partir do fungo *Penicillium* sp., a fim de demonstrar os fatores determinantes para a produção da enzima e relacionar as aplicações biotecnológicas de acordo com as diferentes propriedades catalíticas dessas biomoléculas.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Enzimas

As enzimas são proteínas que têm como principal propriedade a aceleração de diversas reações químicas, que ocorrem *in vivo* e *in vitro*, sendo ecologicamente mais viáveis que os catalisadores químicos (MONTEIRO et al., 2009). De acordo com a União Internacional de Bioquímica apresenta a classificação das enzimas em diferentes classes conforme sua função catalítica, sendo elas:

- Oxirredutases = Catalisam reações de óxido-redução;
- Transferases = Medeiam a transferência de grupos funcionais entre moléculas;
- Hidrolases = Catalisam as reações de hidrólise;
- Liases = Catalisam reações de quebra de ligações formando dupla ligação e ainda catalisando a adição de grupos às duplas ligações;
- Isomerasas = Catalisam reações de mudança intramolecular na qual um substrato será transformado em um produto isômero;
- Ligases = Catalisam a ligação covalente de moléculas com simultânea quebra de uma ligação de alta energia;
- Translocases = Catalisam o movimento de moléculas ou íons por meio das membranas.

Em comparação aos catalisadores químicos, as enzimas apresentam as seguintes vantagens: possuem alta especificidade catalítica; aumentam a velocidade por reduzirem a energia de ativação. Ademais, não são degradadas durante o processo; são estereoseletivas, produtos naturais biológicos e biodegradáveis; atuam em temperaturas e pHs mais brandos (MOURA, 2012).

A atividade biológica da enzima irá depender da estrutura química da proteína, ou seja, do número de cadeias peptídicas e do arranjo dessas cadeias na molécula, assim como depende da natureza do substrato e da natureza do grupo prostético (KIELING e JUNIOR, 2002). A atividade da enzima pode ser estimada por meio da quantidade de produto formado em 1 micromol por uma unidade (U), sendo que a atividade específica da enzima é expressada em atividade por miligrama de proteína ($U\ mg^{-1}$) (GONÇALVES, 2013).

Entre os fatores que interferem na atividade enzimática, temos: pH (pequenas mudanças no pH do meio podem provocar a desnaturação da enzima); temperatura

(também pode desnaturar a enzima); cofator (presença de um componente não-proteico para que a enzima seja ativada); inibidores (estruturas que ocupam temporariamente o sítio ativo devido à semelhança com o substrato original) (KIELING e JUNIOR, 2002).

O interesse no uso de enzimas abrange desde a sua utilização em processos que reduzam os impactos ambientais, como tratamento de resíduos, até a indústria de química fina e farmacêutica (MOURA, 2013). Como é frequente a utilização das enzimas de origem fúngica, em sistemas de tratamento de doenças digestivas e no caso de aplicação endovenosa, requerem uma purificação com alta seletividade acoplada ao método, preservando a atividade enzimática, além de evitar a proteólise e desnaturação proteica (ZIMMER, 2009).

Dentre as diversas enzimas existentes, atualmente, as lipases destacam-se por sua propriedade catalítica e grande interesse biotecnológico, visto serem versáteis, pois atuam em condições ambientais aquosa e aquorrestritas. Dessa forma, são, então, aplicáveis em diferentes setores industriais, entre eles, o alimentício, saúde e agroindustrial (PASCOAL, 2018).

As lipases possuem características que beneficiam seu uso nos diferentes processos, entre elas: sua solubilidade em água de acordo com o tipo de reação que catalisam (hidrólise, esterificação ou transesterificação); estabilidade em solventes orgânicos; não necessitarem de cofatores; especificidade ao substrato utilizado; e sua propriedade de régio, quimio e enantioseletividade (MESSIAS, 2011; ALMEIDA, 2013).

1.2 Lipases: Definição e características

As lipases, quimicamente conhecidas como glicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são enzimas pertencentes ao grupo das serinas, as quais catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, liberando os ácidos graxos correspondentes (monoglicerídeos, diglicerídeos) e glicerol (RAJENDRAN, 2009), como apresentado na figura 1.

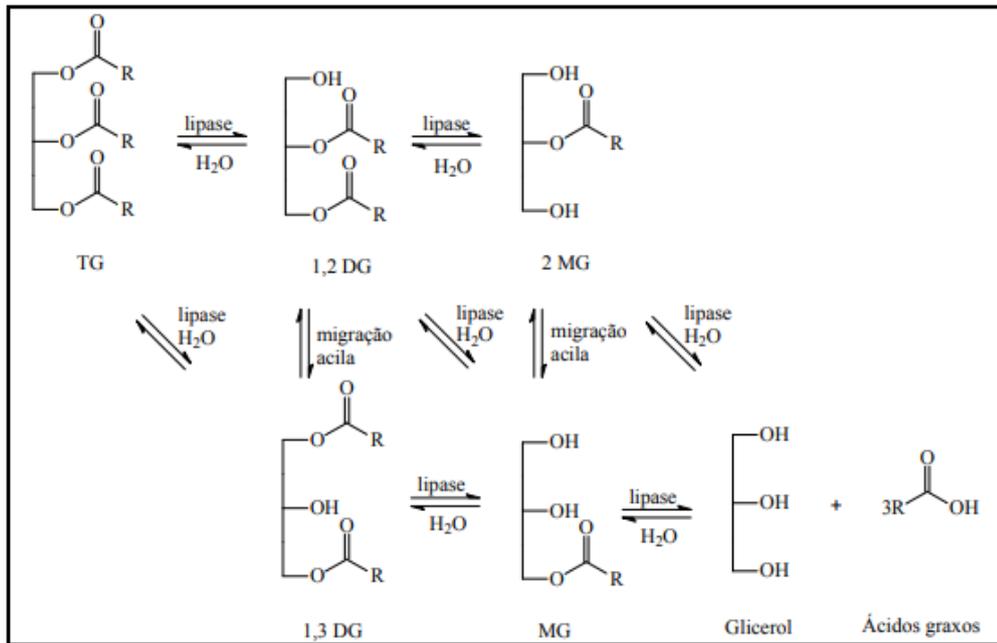


Figura 1 Representação da hidrólise de triacilglicerídeos por lipases. TG -triglicerídeos, MG: monoglicerídeo, DG - diglicerídeo. Fonte: Adaptado de FUREBY, 1997.

Essas proteínas são estáveis em sistemas aquosos e não aquosos, nos quais catalisam as reações reversas, denominadas esterificação e transesterificação, que são de grande interesse industrial (OLIVEIRA et al., 2013). Quando a hidrólise ocorre em acilgliceróis de cadeia acila com mais de dez átomos de carbono, as lipases são denominadas carboxilesterases (CORTEZ et al., 2017).

O sítio catalítico da lipase é uma tríade que geralmente contém: um resíduo nucleofílico (serina, cisteína ou aspartato); resíduos de ácido aspártico ou ácido glutâmico e um resíduo de histidina. Estudos cristalográficos revelaram a existência de um padrão conformacional comum na estrutura tridimensional das lipases de procariotos e eucariotos, denominada conformação α/β hidrolase. Por outro lado, a estrutura primária dessas enzimas apresenta diferentes graus de homologia, contudo, possuem um domínio pentapeptídico altamente conservado, Gly-X-Ser-X-Gly, localizada entre a fita β 5 e α C (Figura 2). Essa configuração facilita o acesso do resíduo nucleofílico serina à histidina e ao substrato (JAEGER et. al. 1999).

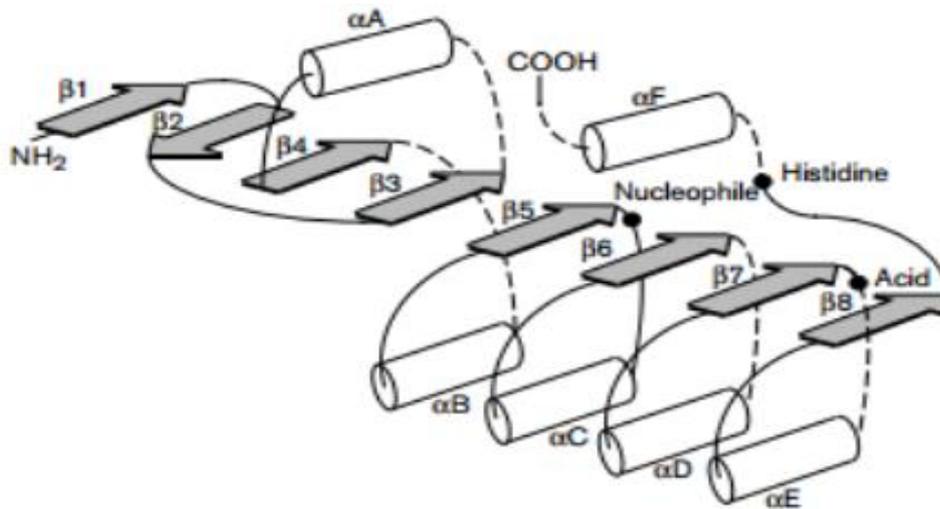


Figura 2 Esquema da conformação α/β das lipases. Alfa hélices e folhas beta são representadas pelos cilindros brancos e setas cinzas, respectivamente. A tríade catalítica é representada pelos pontos pretos. Fonte: NARDINI e DIJKSTRA, 1999.

O mecanismo catalítico das lipases representado na Figura 3, na qual a hidrólise ocorre quando a serina é desprotonada por meio do ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes da molécula de histidina, permitindo um novo ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, que origina um intermediário tetraédrico, o qual, por sua vez, é estabilizado por duas pontes de hidrogênio formadas com ligações amida dos resíduos de aminoácidos (JAEGER et. al., 1999). Após a liberação de uma molécula de álcool, é formado o complexo acil-enzima e, com a liberação do ácido graxo, a enzima é regenerada.

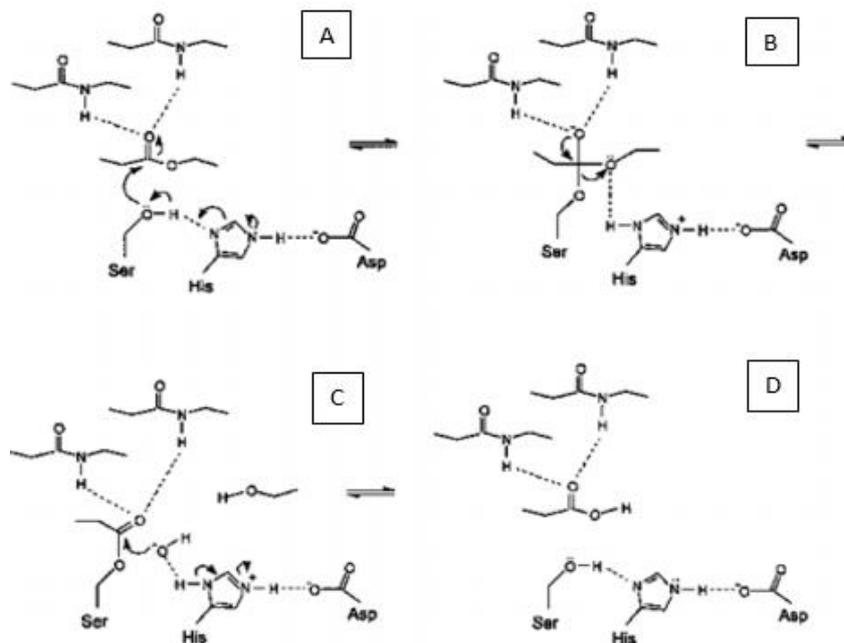


Figura 3 Mecanismo catalítico das lipases.(A): ligação do lipídio, seguida de ativação da serina nucleofílica que é, então, desprotonada pelo ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes da

histidina. (B) ataque nucleofílico ao carbono ligado ao éster do substrato, formando um intermediário tetraédrico, estabilizado por duas pontes de hidrogênio. (C): formação do intermediário acil-enzima que passa por novo ataque nucleofílico pela água. (D) liberação da molécula de álcool, um ácido graxo e a enzima regenerada. Fonte: Adaptado de JAEGER, 1999.

Em seu interior, as lipases apresentam uma cavidade hidrofóbica, profunda ou superficial, que faz com que a ligação éster permaneça alinhada ao sítio ativo. A cavidade apresenta a “tampa” polipeptídica, que, em presença de interface polar/apolar, se abre e expõe o sítio ativo, o que justifica a atividade aumentada das lipases, na interface óleo/água (BRADY, 1991). A Figura 4 ilustra o sítio ativo de uma lipase quando ocorre a ativação interfacial frente à interface hidrofóbica, justificando o aumento da atividade da lipase em presença de substratos insolúveis (VOLPATO, 2009).

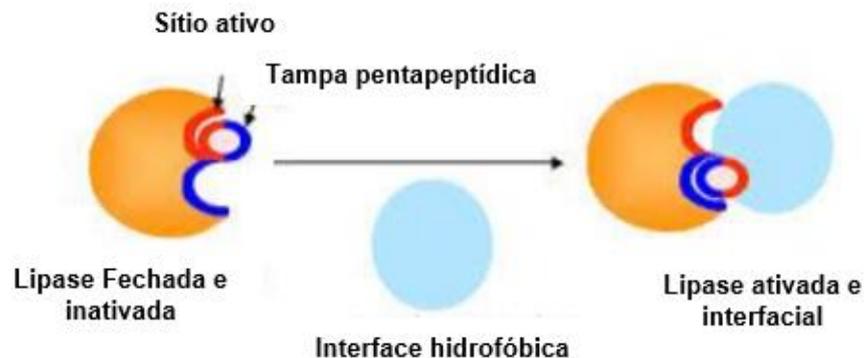


Figura 4 Ativação interfacial de lipases na presença de interfaces hidrofóbicas. Fonte: VOLPATO, 2009.

Quanto à ligação aos ésteres, as lipases são divididas em dois grandes grupos: as regiosseletivas, que possuem especificidade pela região do triacilglicerol a que se ligará, podendo ser ainda classificadas como não específicas ou 1-3-específicas; e as tipo-seletivas, que, por sua vez, apresentam especificidade pelo número de insaturações do grupo acila e/ou tamanho da cadeia carbônica (FABER, 2000).

1.3 Reações catalisadas pelas lipases

As lipases, além de catalisarem a hidrólise de gorduras, são responsáveis por diferentes reações reversas, entre as quais, temos: transesterificação; interesterificação, esterificação, aminólise (síntese de amidas), alcoólise e a lactonização, como apresentado na Figura 5 (PAQUES, 2006).

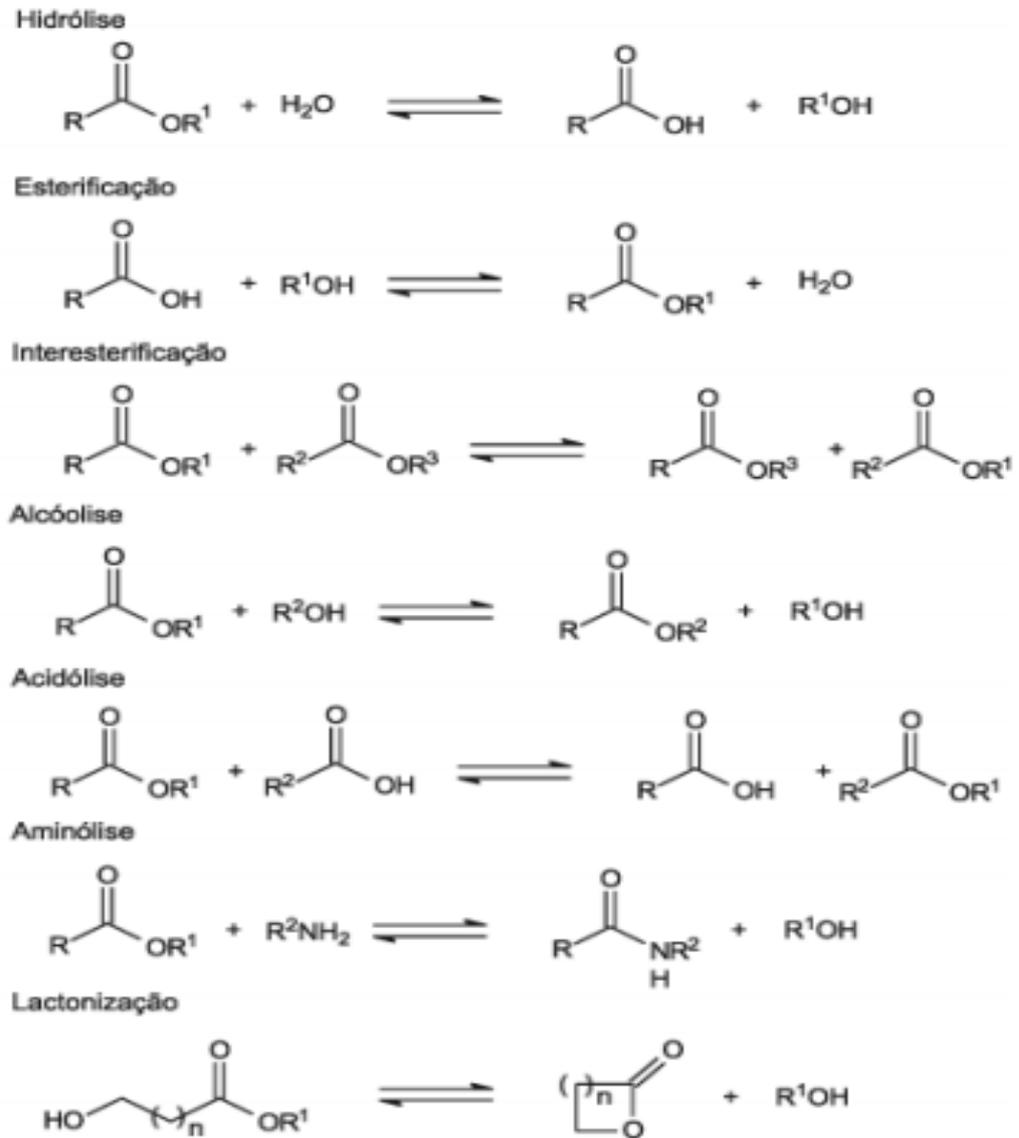


Figura 5 Reações catalisadas por lipases. Fonte: PAQUES e MACEDO, 2006.

1.4 Fontes de lipases

Os vegetais representam 11% do total de fontes alternativas, para obtenção de lipases. A obtenção a partir de vegetais, é devida à sua presença nos tecidos de reserva alimentar das plantas, apresentando característica de pH entre 7,0 e 11,0, além de temperatura ótima entre 20°C e 40°C (TOMBINI, 2015).

As sementes são importantes fontes de lipases, devido à produção estimulada pela presença de triacilgliceróis, na forma de óleos, que fornecem energia para a planta. Após o processo de hidrólise dos triacilgliceróis, obtêm-se os ácidos graxos, que são, por sua vez, usados como combustível em diversos processos (NELSON e COX, 2014).

A forma mais importante atualmente é a produção de lipases por microrganismos, que se apresenta como um método mais econômico, sendo mais viável para a produção em larga escala, se comparada com as outras fontes (PASCOAL et. al., 2018).

Inúmeros microrganismos são capazes de sintetizar lipases, no entanto, é necessário realizar uma triagem nesses produtores dessas enzimas, com o objetivo de descobrir novas biomoléculas que sejam mais seletivas e estáveis, para serem empregadas na biocatálise e síntese orgânica de outras moléculas (SANDOVAL e MARTY, 2007).

Lipases provenientes de bactérias termofílicas são mais utilizadas em escala industrial, pois apresentam uma estabilidade maior em relação às altas temperaturas, entretanto, as lipases psicofílicas, também, são importantes, pelo fato de apresentarem elevada atividade em baixíssimas temperaturas (MESSIAS et. al., 2011).

A estrutura química e as características cinéticas das lipases microbianas apresentam variação de acordo com microrganismo usado para a obtenção, assim como seu gênero, espécie e cepa (MESSIAS et. al., 2011). A maioria das lipases bacterianas, em relação à atividade, atuam em pH alcalino, havendo outras que atuam em uma ampla faixa de pH, como é o caso do *Staphylococcus epidermidis* (MESSIAS et. al. 2011).

Os fungos são muito utilizados para a produção de enzimas, por produzirem enzimas extracelulares, facilitando o processo de recuperação do meio fermentativo (GEOFFRY e ACHUR, 2018).

Os fungos filamentosos são utilizados, pois têm a propriedade de secretar grande variedade de proteínas que, por sua vez, podem ser utilizadas em bioprocessos, além de secretarem e expressarem proteínas em grande escala, com a utilização de resíduos agroindustriais na fermentação (RODRIGUES et. al. 2015).

Os principais fungos utilizados nesse sentido pertencem aos gêneros *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizomucor sp.* (CORTEZ et. al., 2017). As lipases fúngicas apresentam atividade lipolítica entre pH 7- 9 e temperatura entre 20°C e 35°C (AZEVEDO et. al. 2020).

As lipases são secretadas para o meio de cultivo, com o intuito de buscar nutrientes provenientes da fonte de carbono, provocando a clivagem do substrato lipídico, porém, essa excreção dependerá do gênero do fungo, sendo que o

crescimento e as diferentes atividades metabólicas dos microrganismos são resultado das condições ambientais e físico-químicas oferecidas (CORTEZ et. al., 2017).

A utilização dos novos microrganismos produtores de lipases visa reduzir os custos do processo, assim como aumentar a produção e síntese de enzimas com diferentes propriedades ainda não descobertas (SHU, et al., 2006). Com isso, evidenciam-se os fungos filamentosos, como o *Penicillium* sp., devido à sua versatilidade na produção de lipases com significativa atividade lipolítica.

1.5 Gênero *Penicillium* sp.

Fungos anamorfos ascomicetos, pertencentes à família *Thichocomaceae*, podem ser obtidos do solo, alimentos e outros materiais (DOMSCH et. al., 2008; SAMNISON, et al., 2000). O gênero *Penicillium* apresenta cerca de 150 espécies catalogadas, sendo que a maioria é capaz de deteriorar alimentos quando em baixas temperaturas; isso devido ao fato de serem resistentes às baixas temperaturas (PITT e HOCKING, 1997).

Os primeiros relatos do uso desse microrganismo foram na produção de queijos, a exemplo do *Penicillium roqueforti*, que é utilizado na produção do famoso queijo azul ou mais conhecido como gorgonzola (OLIVEIRA, 2010). No entanto, o fungo pode produzir micotoxinas que comprometem a segurança dos alimentos (CHALFOUN e BATISTA, 2003).

Apresenta, como características microscópicas peculiares, a forma e tamanho dos conídios que, devido ao número de ramificações (figura 6), torna a identificação do fungo complexa (CHALFOUN e BATISTA, 2003).



Figura 6 Morfologia microscópica do fungo *Penicillium roqueforti*. Fonte: GILLOT, 2015.

O gênero *Penicillium* pode ser cultivado em meios de cultura padronizados, como ágar batata dextrose e ágar com extrato de maltose (MEA), com temperatura entre 25 e 37°C, durante pelo menos 7 dias (CHALFOUN, 2003).

Existem cerca de 30 espécies desse gênero, capazes de produzir lipases com diferentes propriedades e, conseqüentemente, suas aplicabilidades, no entanto, ainda são poucos os trabalhos que abordam o emprego de lipases provenientes desse gênero. Além das lipases extracelulares, os fungos desse gênero podem produzir lipases ligadas ao micélio, como citado por Marotti (2017), que destaca as espécies *P. janthinellum*, *P. chrysogenum*, *P. camemberti*, *P. charlesi*, *P. oxallicum*, *P. italicum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*.

A Figura 7 ilustra o *Penicillium chrysogenum*, um dos importantes fungos produtores de lipases, utilizado, por exemplo, na aromatização de alimentos, como os queijos.

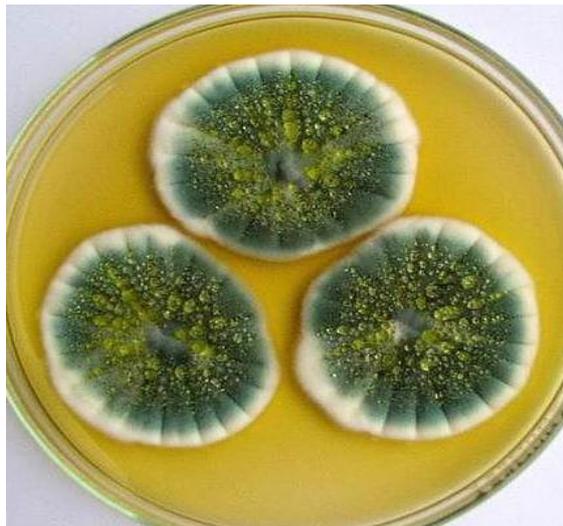


Figura 7 Morfologia da colônia do fungo *Penicillium chrysogenum*. Fonte:

<http://pt.nextews.com/e143187d/>

Após o cultivo do fungo, é necessário que as enzimas sejam secretadas para o meio; para isso, realizam-se os processos fermentativos, utilizando diferentes substratos que auxiliam a produção da enzima para o meio externo.

1.6 Métodos fermentativos na produção de lipases

Para a produção de lipases, geralmente, são empregadas técnicas de fermentação, classificadas de acordo com a forma de cultivo e substratos envolvidos

no processo, sendo denominadas fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES) (ABBAS e COMEAU, 2003).

O meio de cultivo deve ser rico em carbono, fonte energética principal, porém, a produção dependerá também de outras fontes sintéticas ou naturais, como nitrogênio, sais orgânicos, presença de oxigênio e aeração, além do indutor lipídico, que estimula ativamente a produção da lipase (RAJENDRAN et. al., 2009).

A utilização de diferentes substratos, suplementos e microrganismos favorece a possibilidade de encontrar combinações entre esses elementos, que contribuam para a obtenção de lipases em escala industrial com menor custo (FEITOSA, 2010). Um exemplo seria a utilização de óleos refinados, que contribuem para o aumento da atividade catalítica das células íntegras, em que a adição de óleos vegetais, ricos em ácidos graxos insaturados, promove uma maior produção de lipases, ligadas ao micélio, como é o caso do óleo de oliva, potente indutor de enzimas (CORTEZ et. al., 2017).

Fatores ambientais, como pH e a temperatura, influenciam significativamente o crescimento e produção da lipase fúngica, sendo os valores de pH entre 6,0 e 8,0, e temperatura entre 20 e 40°C, os mais utilizados para a otimização do processo (RAJENDRAN et. al., 2009). Para a produção em larga escala, a estabilidade térmica é uma das características principais a ser estabelecida, considerando-se que muitos processos utilizam temperaturas extremas (MESSIAS, 2011).

A produção de lipases pode ser inibida pela presença de açúcares simples ou glicerol nos meios de cultivo, a qual pode ser estimulada por ácidos graxos livres, gorduras, óleos ou polissacarídeos complexos nos meios de cultura (KOBLOITZ, 2004).

1.6.1 Fermentação em estado sólido

O uso da fermentação em estado sólido é datado desde 1000 A. C., a qual era utilizada nos países orientais, para a preparação de bebidas alcoólicas e molhos à base de soja (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Na fermentação em estado sólido (FES), os microrganismos crescem em um meio insolúvel, isto é, em ambiente aquo-restrito, sendo que a umidade presente no substrato e a alta heterogeneidade de nutrientes e componentes faz com que o substrato suporte o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo (TOMBINI, 2015). Esse substrato, além de funcionar como suporte físico, é fonte de

nutrientes, podendo ser um sólido natural, como resíduos agroindustriais, ou um suporte inerte, como resinas poliméricas ou poliuretano.

A FES pode ser extremamente útil, pois proporciona condições ambientais semelhantes ao habitat natural dos fungos filamentosos (RODRIGUES et.al., 2015). Diferentes substratos agroindustriais são utilizados, como bagaço de cana, farelo de trigo e resíduos agroindustriais, ricos em nutrientes, os quais são consumidos lentamente e de forma constante durante o processo (SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012).

O gênero *Penicillium* é frequente nesse tipo de fermentação e, devido ao reaproveitamento dos resíduos agroindustriais, esse método tem se apresentado com uma alternativa limpa para a produção de enzimas (BARRIOS-GONZÁLES, 2012). A exemplo do farelo de soja, usado para a produção de lipases de *Penicillium verrucosum*, foi mais eficiente a 27,5°C e umidade igual a 55%, apresentando atividade ótima de 40 U g⁻¹ entre 30 e 45°C, com pH 7,0, sendo úteis nas indústrias cosméticas e na medicina (KEMPKA, 2008).

A semente de girassol e a casca de arroz são citadas na literatura para obtenção de lipases do gênero *Penicillium*, uma vez que a semente de girassol atua como fonte de carbono, nitrogênio e outros nutrientes para o microrganismo; a casca de arroz funciona como suporte físico por apresentar baixo teor lipídico, obtendo-se uma atividade enzimática de 55,8 U gSS⁻¹, após 96 horas de fermentação em estado sólido, com umidade de 55% (ZANELLA, 2020).



Figura 8 Fermentação em estado sólido do *Penicillium* sp. Fonte: ZANELLA, 2020.

1.6.2 Fermentação submersa

O método mais utilizado atualmente é a fermentação submersa, por apresentar maior controle do processo empregando meio líquido, no qual os nutrientes são solúveis, contendo carbono como fonte energética principal, fontes sintéticas e naturais diversificadas (FEITOSA et.al., 2010; CORTEZ et. al., 2017).

A produção, por meio da fermentação submersa, dependerá dos níveis de carbono, nitrogênio, sais inorgânicos, oxigênio e aeração, além da presença do indutor lipídico, que estimula ativamente a produção da lipase (RAJENDRAN et. al., 2009).

A fermentação submersa refere-se ao processo no qual o microrganismo produtor da enzima é emergido no interior do meio líquido submetido à agitação. Apresenta como vantagens: microrganismos serem submetidos às mesmas condições físico-químicas, assim como acesso aos nutrientes, facilitando a determinação dos parâmetros ideais de produção; maior eficiência na absorção de nutrientes e consequente excreção de metabólitos; facilidade no controle de grandes volumes de produção (WANDERLEY, 2011).

Produzida pelo fungo *Aspergillus niger* C, por meio de fermentação submersa, a lipase apresentou melhor atividade quando utilizado óleo de soja e em temperatura de 55°C e pH entre 5,0, com atividade específica igual a 57,17 U g⁻¹ (LIMA et. al., 2019). Entretanto, o *Paecilomyces formosus* e *Aspergillus tubingensis* estão entre os fungos isolados do bagaço de cana-de-açúcar e submetidos à fermentação submersa para a produção de lipase, na qual a atividade lipolítica obtida foi de, respectivamente, 8,00 U g⁻¹ e 5,077 U g⁻¹, sendo valores maiores que os relatados na literatura (BESSA et. al., 2021).

1.7 Purificação das lipases

A extração é o processo que antecede a purificação tendo a finalidade de obter o extrato bruto com a enzima solúvel, de forma que se recupera a enzima do meio fermentativo na qual foi produzida; nesse caso, é preciso avaliar se é excretada (extracelular) ou não (intracelular) para a escolha do procedimento mais adequado, geralmente, por meio do uso de solventes (MONTEIRO e SILVA, 2009). A etapa de separação, por sua vez, pode ser realizada com base em procedimentos de filtração, decantação, centrifugação ou sedimentação.

A etapa de concentração das proteínas ocorre por meio da diferença entre as solubilidades das moléculas, sendo um dos métodos mais empregados, principalmente nas fases iniciais da purificação (VESCOVI, 2012). As etapas do processo de purificação de enzimas são representadas pelo fluxograma da Figura 9:

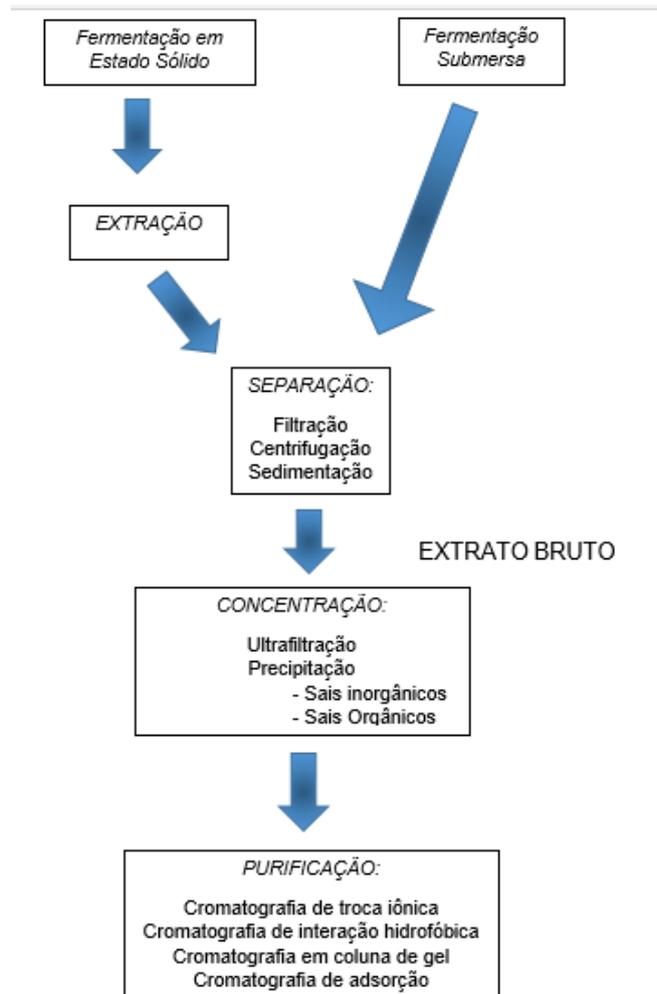


Figura 9: Esquema da purificação de lipases microbianas Fonte: O autor.

A solubilidade das proteínas do extrato é influenciada pela adição de sais, que, em concentração reduzida, aumentam a sua solubilidade (efeito “*salting in*”) e, em concentração elevada, diminuem-na, causando a precipitação das enzimas (efeito “*salting out*”) (NELSON e COX, 2014).

Um dos métodos mais utilizados como pré-purificação das lipases é a precipitação do extrato bruto por sulfato de amônio, que concentra as proteínas de interesse e aumenta a atividade lipolítica específica (FERREIRA et. al., 2017). Silva et. al. (2017), por sua vez, pré-purificou a lipase obtida do fungo *Penicillium roqueforti*, após fermentação em estado sólido, utilizando sulfato de amônio, de forma que obteve

uma atividade lipolítica igual a $34,67 \text{ U g}^{-1}$ quando a concentração de sulfato de amônio era de 60%.

Os métodos cromatográficos, têm a finalidade de purificar as enzimas de interesse, de maneira que a separação acontece pela migração diferencial dos componentes de uma mistura, devido às diferentes interações entre a fase móvel e a fase estacionária da coluna (AMORIM, 2019).

As cromatografias utilizadas para a purificação de lipases são aquelas usualmente empregadas para outras proteínas, tais como as cromatografias de troca iônica (ex.: DEAE Sepharose) (OLIVEIRA et. al., 2017), interação hidrofóbica (ex.: FENIL Sepharose) (AMORIM, 2019), colunas de permeação em gel (OLIVEIRA et. al., 2017) e, ainda, resinas de bioafinidade (VOLPATO, 2009).

Na cromatografia de troca iônica, a fase estacionária pode ser catiônica ou aniônica, sendo que a separação ocorre por diferença de carga elétrica, isto é, uma interação eletrostática na qual as proteínas com carga oposta se ligam reversivelmente à coluna carregada (Figura 10):

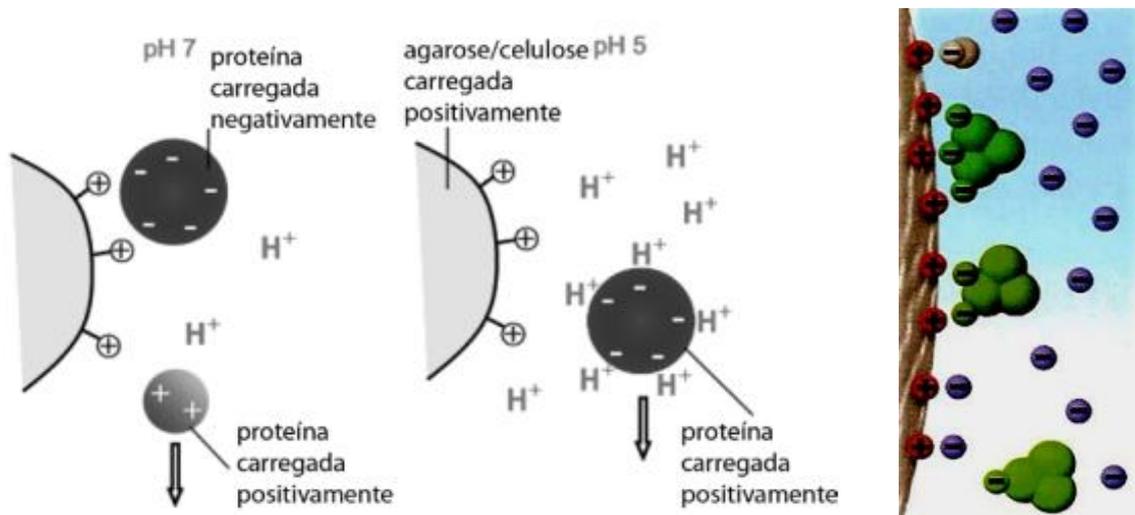


Figura 10: Separação de proteínas por cromatografia de troca iônica. Fonte: AMORIM, 2019.

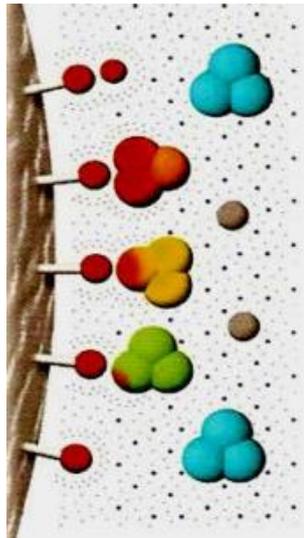


Figura 11 Separação de proteínas por cromatografia de interação hidrofóbica. Fonte: AMORIM, 2019.

Um exemplo de lipase obtida por cromatografias de troca iônica e interação hidrofóbica, em que, nesta última, a purificação ocorre pela interação reversível entre moléculas hidrofóbicas com uma resina também hidrofóbica (Figura 11), é a enzima extraída do microrganismo *Rhizopus* sp. Foram utilizadas as resinas DEAE-Sepharose e a FENIL-Sepharose, nos quais a lipase foi retida e, posteriormente, eluída pelos gradientes de sal utilizados, que foram cloreto de sódio e sulfato de sódio, respectivamente (PASTORE et. al., 2003).

Nas colunas de separação em permeação em gel, por sua vez, também conhecida como coluna de exclusão ou filtração molecular, a separação ocorre por diferença no tamanho das moléculas, usando geralmente fases móveis aquosas. A Figura 12 demonstra esse processo:

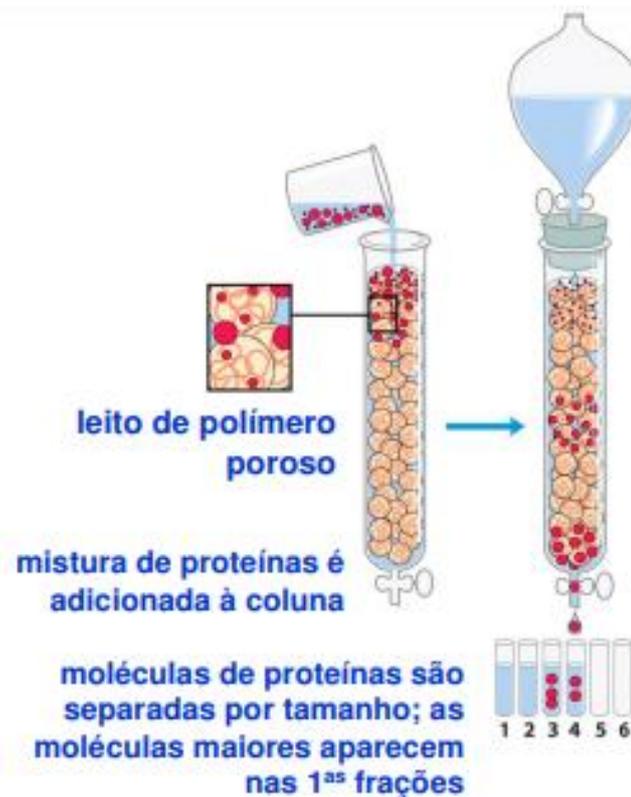


Figura 12: Separação por filtração em gel. Ilustra a passagem da proteína de tamanho maior e as proteínas de tamanho menor passando pela coluna posteriormente, representando a obtenção das partículas de interesse completamente separadas. Fonte: MARZZOCO, 2007.

A lipase obtida do fungo *Penicillium* sp. (DSM 23773) foi purificada por meio da utilização de cromatografias de exclusão molecular (Sephacryl® 100-HR) e troca iônica (Q Sepharose® HP), apresentando, no final dos experimentos, uma atividade de 308,73 U g⁻¹; a lipase apresentou-se estável térmicamente frente às outras enzimas produzidas por fungos filamentosos, com temperatura ótima de 45°C e pH de 5,5, apresentando maior atividade. Assim, é viável para aplicação na produção de biocombustível, biorremediação e interesterificação de óleos (DHEEMAN et. al., 2011).

A purificação das enzimas fúngicas é crucial para a sua completa caracterização bioquímica e determinação da sequência primária, assim como a correlação entre a sua estrutura e função (RAJENDRAN et. al., 2009).

No entanto, de acordo com a sua aplicação, nem todas as lipases precisam ser purificadas, sendo importante destacar que o método de purificação é, muitas vezes, inviável em determinadas aplicações industriais, pelo fato do alto custo do processo, uma vez que envolve etapas de pré-purificação e purificação por meio de métodos cromatográficos (KOBBLITZ e PASTORE, 2004).

1.8 Dosagem da atividade lipolítica

A dosagem da atividade da enzima é crucial em todas as etapas do processo de obtenção e purificação para certificação de sua eficiência. Um dos métodos utilizados é o titulométrico, por ser mais econômico, no qual se utiliza o NaOH ou outra base para titular a mistura, contendo os ácidos graxos produzidos na reação entre a mistura do sólido fermentado ou o extrato, que possui a lipase, com uma emulsão de óleo refinado. Esse método se baseia na ligação entre os ácidos graxos livres e os íons cobre II em meio orgânico, sendo possível avaliar o percentual de ácidos graxos convertidos a ésteres (ZANELLA, 2020).

A Figura 9 apresenta a verificação do pH da solução após titulação com emulsão de óleo de oliva para determinação da atividade lipolítica da enzima produzida pelo *Penicillium* sp. (ZANELLA, 2020).



Figura 13 Determinação da atividade lipolítica por meio de método titulométrico (ZANELLA, 2020).

Outro método utilizado é o espectrofotométrico, no qual se utiliza o p-NPP (p-nitrofenil palmitato) como substrato; a leitura da atividade lipolítica é realizada por meio de um espectrofotômetro a 410 nm, (AZEVEDO, 2020). Na Figura 10, segue a reação que ocorre durante o processo de hidrólise, empregando o p-NPP.

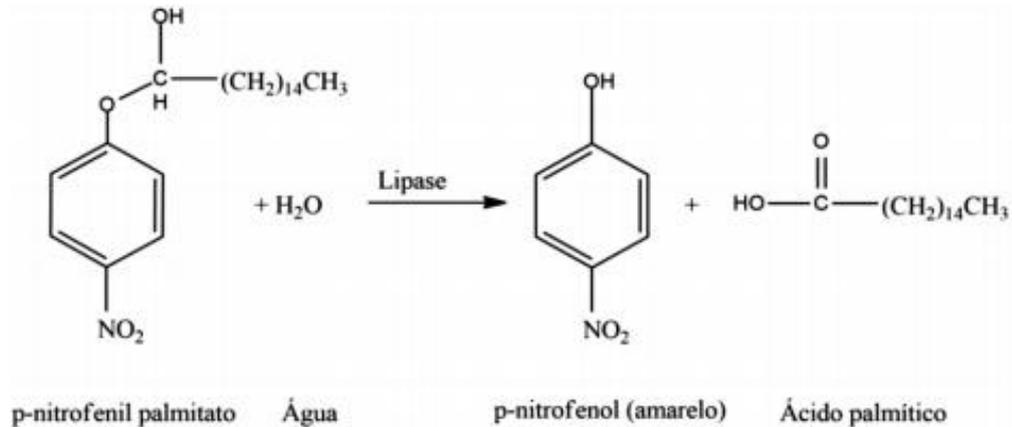


Figura 14 Reação de Hidrólise do substrato sintético p-NPP por lipase. Fonte: ROBERT, 2015.

A atividade lipolítica é calculada utilizando a seguinte equação 1 (ZANELLA, 2020):

$$\text{Eq. (1)} \quad A = \frac{\Delta V}{\Delta t} \times \frac{\text{NaOH} \times Fc \times 60 \text{ s}}{1000 \text{ ml} \times 1 \text{ min}}$$

Em que A - atividade enzimática (U gSS⁻¹ – Unidades por grama de substrato seco); ΔV - volume de NaOH utilizado na titulação (mL); Δt - tempo de hidrólise (s); NaOH - Molaridade da solução de hidróxido de sódio (mol L⁻¹); Fc - fator de correção do NaOH.

Assim, uma unidade de atividade lipolítica é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas, e o resultado é expresso em unidades totais por grama de material fermentado (ZANELLA, 2020).

1.9 Aplicações biotecnológicas das lipases

As lipases foram identificadas inicialmente em 1930; desde então, são utilizadas em diversos segmentos industriais e apresentam uma demanda mundial que tende a crescer cerca de 6,2%, anualmente, visto a sua aplicabilidade e importância em diferentes áreas (CORTEZ et. al., 2017).

Desde os anos 80, observa-se um aumento significativo do número de lipases disponíveis, devido, principalmente, aos estudos de clonagem e expressão das enzimas de microrganismos, assim como pela demanda crescente do uso de biocatalisadores com novas propriedades, relacionadas com temperatura, pH, especificidade e estabilidade (TREICHEL et. al., 2010). Guerrand (2017) apresenta as

principais aplicações das lipases de acordo com os diferentes setores industriais, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Aplicações industriais das lipases.

TIPO DE INDÚSTRIA		APLICAÇÃO
ALIMENTÍCIA	Laticínios	Atuam na hidrólise da gordura do leite
	Panificação	Aumentam o aroma e tempo de prateleira
	Cervejaria	Aceleram a fermentação em função dos lipídeos presentes
	Frigoríficos	Desenvolvem aroma e removem o excesso de gordura da carne
FARMACÊUTICA		Promovem a digestão de óleos e gorduras em alimentos Auxiliam na produção de misturas racêmicas
COSMÉTICA		Promovem a quebra de gorduras localizadas em procedimentos estéticos e síntese de compostos aromáticos e ativos presentes nos produtos cosméticos
MÉDICA		Dosagem de triglicérides em amostras de sangue
PAPEL		Auxiliam no tratamento de polpas de celulose
PRODUÇÃO DE DETERGENTES		Promovem a hidrólise de gorduras
BIORREMEDIAÇÃO		Decomposição e remoção de substâncias oleosas
PRODUÇÃO DE BIODIESEL		Promovem reações de transesterificação

Fonte: Adaptado de Guerrand, 2017.

As lipases são utilizadas em diferentes processos de biotransformação, ou biocatálise, visto que proporcionam maior especificidade, versatilidade, rendimento e redução do número de etapas do processo, além de o produto obtido não ser limitado ao metabolismo do biocatalisador. Atuam como reagentes ambientalmente favoráveis, já que podem ser realizados os processos enzimáticos, em condições mais amenas de temperatura de pH, transformando diversas substâncias (CORTEZ et. al., 2017).

As lipases são catalisadores eficientes de diversas reações de hidrólise, lactonização, esterificação e transesterificação, o que lhes proporciona inúmeras aplicações, como: indústria alimentícia, farmacêutica, tratamento de resíduos, produção de detergentes (SARMAH et. al., 2018).

O primeiro detergente utilizando enzimas foi criado em 1913, com tripsina de pâncreas do porco, mas, somente em 1963, foi comercializado pela empresa Novozymes (FERNANDES et. al., 2007).

A aplicação das lipases na produção de detergentes é evidente (HANSAN et. al., 2006) pois essas enzimas promovem a quebra das moléculas de gorduras (hidrólise) sem a necessidade de cofatores. Atualmente, o emprego de lipases tem aumentado na produção de detergentes como a Lipolase[®], uma preparação solúvel de lipases; outro exemplo é a da lipase de *Penicillium cyclopium*, citada por Huang et. al. (2019), pois, devido à estabilidade térmica da enzima, o detergente pode ser utilizado em baixas temperaturas.

A aplicação das lipases na área da saúde abrange desde a produção de medicamentos, como nos casos de deficiência de enzimas pancreáticas e indigestão, até a utilização em métodos diagnósticos desses distúrbios, assim como na avaliação da redução dos níveis de triglicerídeos, uma vez que as lipases são responsáveis pela hidrólise desses componentes (MONTEIRO e SILVA, 2009).

A aplicação das lipases na indústria cosmética cresceu significativamente nos últimos anos, pois auxiliam na limpeza de pele e cabelos além de participarem dos processos de queratinização da pele e proteção das fibras de elastina e colágeno. Atualmente têm-se destacado a aplicação das enzimas lipolíticas nos procedimentos de emagrecimento, uma vez que promovem a quebra das moléculas de gordura e podem ser utilizadas também como biocatalisador de reações para a produção de aromas (ANSORGE-SCHUMACHER, 2012; YVERGNAUX, 2017).

O emprego das lipases, na produção de biocombustíveis, como o biodiesel, tem ganhado notável importância econômica, social e tecnológica (CORTEZ et. al., 2017); isso devido à sua capacidade de transesterificar moléculas de ácidos graxos de elevada massa molar, utilizando-se de diferentes matérias-primas agropecuárias, que, por sua vez, são ricas em gorduras e óleos.

Portanto, após os processos de produção, separação e caracterização bioquímica, as lipases são aplicadas em diferentes segmentos industriais que estimulam estudos sobre elas. Isso conduz a ganhos econômicos devido às diversas aplicações e descoberta de enzimas com novas propriedades que podem ser futuramente exploradas. Ademais, possibilita ganhos ambientais consideráveis, uma vez que favorecem a preservação ambiental conforme sua capacidade de degradar compostos poluentes, fomentando, assim, a sua produção.

Verificando a importância das lipases em diversos setores agroindustriais, elaborou-se o artigo de revisão, apresentado no Capítulo 2, o qual enfatiza as aplicações mais atuais das lipases, obtidas do gênero *Penicillium* e possíveis novas aplicações.

1.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 589 – 595, 2003.

ABREU, D. C.A.; FIGUEIREDO, K. C. S. Separação de proteínas de uma solução salina por membrana de diálise de acetato de celulose. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 7, p. 1023 – 1033, 2017.

ALMEIDA, A. F.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties, and Potential Application. **BioMed Research International**, p. 1-10, 2013.

AMORIM, A.F. V. de **Métodos Cromatográficos**. 1ª ed. Ed. UECE, 2019.

ANSORGE-SCHUMACHER, A. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 1-16, 2012.

AROMA, M. H.; JAFELICCI, JR., M. Princípios e aplicações de processos de separação por membranas inorgânicas. **Ciência & Tecnologia**. v. 2, n. 1, p. 80 – 97, 2011.

AZEVEDO, W. M. de; OLIVEIRA, L. F. R. de, ALCÂNTARA, M. A., CORDEIRO, A. M. T. de M., DAMASCENO, K. S. F. da S. C., ASSIS, C. F. de, JUNIOR, F. C. de S. Turning cacaoy butter and wheat bran into substrate for lipase production by *Aspergillus terreus* NRRL-255. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**. p. 1-8, 2020.

BALAJI, S. The transferred translocases: An old wine in a new bottle. **Biotechnology Applied Biochemistry**., p. 1 – 24, 2021.

BARRIOS- GONZÁLES, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**. v.47, n.2, p. 175 – 185, 2012.

BESSA, D. H. R. F.; CASTRO, C. F. De S.; SOUZA, A. O.; FILHO, A. C. P. De M.; GONÇALVES, M. C. M.; Atividade específica lipolítica em fungos coletados do bagaço de cana-de-açúcar. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 2, p. 395-406, 2021.

BRADY, R.L.; et. Al. A Serine Proteases Triad Forms the Catalytic Center of a Triacylglycerol Lipase. **Nature**, v. 351, p. 767 – 770, 1991.

BUKATAYA, O.; O fungo *Penicillium*: estrutura, propriedades, aplicações. Disponível em: <http://pt.nextews.com/e143187d/> Acesso em: 09/09/2021.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Fungos associados a frutos e grãos de café – *Aspegillus* e *Penicillium*. Brasília: Embrapa, 2003.

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, n. 1, p. 85 – 96, 2017.

COSTA, R. J. da; **Avaliação do processo de extração de lipases de semente de trigo**. 2009, 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim.

DHEEMAN, D. S.; ANTONY-BABUB, S.; FRÍAS, J. M.; HENEHANA, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 DSM 23773. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.72, p. 256 – 262, 2011.

DOMSCH, K.H. GAMS, W., ANDERSON, T., TORANT-HADE, A. Compendium of soil fungi. **European Journal of Soil Science**, v. 59, p. 1007 – 1011, 2008.

FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4 ed., Springer, New York, 2000.

FEITOSA, I. C.; BARBOSA, J. M. de P.; ORELLANA, S. C.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum Technology**. v. 32, n. 1, p. 27 – 31. 2010.

FERNANDES, M. L. M.; et. Al.; Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 44, p. 8 -13, 2007.

FERREIRA, A. N., RIBEIRO, D. dos. S., SANTANA, R. A., FELIX, A. C. S., ALVAREZ, L. D. G., LIMA, E. de O., FREITAS, J. S. de, JUNIOR, G. L. V., FRANCO, M., NASCIMENTO JUNIOR, B. B. do. Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera*. **Chemical Engineering Communications**, v. 204, n.10, p. 1167 – 1173, 2017.

FERRAZ, C. A.; et. Al. Synthesis and characterization of a magnetic hybrid catalyst containing lipase and palladium and its application on the dynamic kinetic resolution of amines. **Molecular Catalysis**. v. 493, p. 1-11, 2020.

FUREBY, A. M.; LI, T.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of diglycerides by lipase catalized alcoholysis of triglycerides. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 20, n. 3, p. 198-206,1997.

FURINI, G.; BERGER, J. S., CAMPOS, J. A. M., VAN DER SAND, S. T., GERMANI, J. C. Production of lipolytic enzymes by bacteria isolated from biological effluent treatment systems. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, n. 3, p. 2955-2965, 2018.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.14, p. 241-253, 2018.

GILLOT, G.; JANY, J-L.; COTON, M.; LE FLOCH, G.; DEBAETS S.; ROPARS J.; LOPEZ-VILLAVICENCIO, M.; DUPONT, J.; BRANCA, A.; GIRAUD T.; COTON,

E. Insights into *Penicillium roqueforti* Morphological and Genetic Diversity. **Plos One**, v. 10, n. 6, p.1-21, 2015.

GONÇALVES, K. M. **Relação estrutura-atividade de lipases comerciais livres e em micelas reversas**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2013.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**. v. 24, n. 4, p.1-7, 2017.

GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKOVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOVA, N. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 923-930, 2011.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p.235 -251, 2006.

HUANG, L.; et Al. Improvement of the alkali stability of *Penicillium cyclopium* lipase by error-prone PCR. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 39, p. 91-97, 2019.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalysis: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315 – 351, 1999.

KEMPKA, A.P.; LIPKE, N.L.; PINHEIRO, T. da L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. de Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Erechim, v.31, n. 2, p. 119 -125, 2008.

KIELING, D. D.; JUNIOR, A. F. Enzimas – Aspectos Gerais. Universidade Federal de Santa Catarina, Disciplina de Engenharia Bioquímica, 2002.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp*¹. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 2, p. 287- 292, 2004.

LIMA, L. G. R.; GONÇALVES, M. M. M.; COURI, S.; MELO, V. F.; SANT'ANA, G. C. F.; COSTA, A.C. A. da Lipase Production by *Aspergillus niger* C by Submerged Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.62, p. 1-14, 2019.

MALDONADO, R. R.; **Produção, Purificação e Caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 2006.

MAROTTI, B. S.; CORTEZ, D. V.; GONCALVEZ, D. B.; CASTRO, H. F. de Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**. v.40, n. 4, p. 427 – 435, 2017.

MARZZOCO, A., TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**, 3ª ed. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. de Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência Tecnologia em Alimentos**. v. 29, n. 2, p. 440 – 443, 2009.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z. da; LIMA, V. M. G. de; GIESE, E.C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. de M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 32, n. 2, p. 213 – 234, 2011.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. do N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos, 2009, p. 9 – 23. Disponível em: http://ojs.rpqsenai.org.br/index.php/rpq_n1/article/view/83/70

MOURA, C. V. R.; NUNES, A. S. L.; MOITA NETO, J. M.; NERES, H. L. S.; CARVALHO, L. M. G.; MOURA, E. M. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.23, 2012.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B.W. α/β Hydrolase fold enzymes: the Family keeps growing. **Currentopinion in structuralbiology**, v. 9, n. 6, p. 732-737, 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Editora Artmed, 6ª ed., 2014.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93 – 99, 2006.

PASCOAL, A.; ESTEVINHO, L. M.; MARTINS, I. M.; CHOUPINA, A. B. Novel Sources and Functions of Microbial Lipases and Their Role in Infection Mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 104, p. 1 – 28, 2018.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. dos S.R. da; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp.¹. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n.2, p.135 – 140, 2003.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 52, n. 1, p. 207 – 219, 2009.

ROBERT, J. D. M. **Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida antarctica* em *Pichia pastoris*: Avaliação de meio de cultivo e aumento de escala**. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

RODRIGUES, M. L. F.; SILVA, E. A. da; BROBA, C. E.; OLIVEIRA, A. C. D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R. W.; SILVA, L.P.; RODRIGUES, M. L. F.; STUANI, B. T. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus communis* L.1. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**. v. 4, p. 129 – 145, 2015.

OLIVEIRA, A. C. D.; VARGAS, J. V. C.; RODRIGUES, M. L. F.; MARIANO, A. B. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v.15, n. 1, p. 19 – 26, 2013.

OLIVEIRA, F. C. **Proteção de lípases por *Penicillium roquefort* e sua aplicação na obtenção de aroma de queijo**. 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, F.; SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; PÉREZ-RODRIGUES, N.; DOMINGUEZ, J. M.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace: from flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor. **Bioprocess Biosyst Engineering**.v. 40, p. 1123 – 1132, 2017.

SANDOVAL, G. & MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, n. 3, p. 390 – 393, 2007.

SILVA, T. P.; et. Al.; Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**. v. 16, n.3, p. 745 – 756, 2017.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; RANI, Y. K.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C.; Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. **Biocatalysts and Bioreactor Design**. v. 34, n. 1, p. 5 -28, 2017.

SHU, C.; XU, C.; LIN, G. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**. v. 41, n. 3, p. 734 – 738, 2006.

SOARES, C. M., et. Al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotecnology**, v. 1, 77 - 79, 1999.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **Internacional Journal of Science and nature**, v. 3, n. 3, p. 480 – 486, 2012.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V. J. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182 -196, 2010.

TOMBINI, J. **Produção de lipase fúngica a partir de subprodutos do processamento de soja**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

TURATTI, D. F. M.; JUNIOR, W. G. M.; TERRASAN, C. R. F.; MORENO-PEREZ, S.; PESSELA, B. C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; CARMONA, E. C. Immobilization of Lipase from *Penicillium sp.* Section *Gracilenta* (CBMAI 1583) on Different Hydrophobic Supports: Modulation of Functional Properties. **Molecules**. v. 22, n. 339, p. 1 – 14, 2017.

VESCOVI, V.; **Extração, Purificação e Imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, 2012.

VOLPATO, G. **Produção, purificação e imobilização de lipases *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

WANDERLEY, M.P.; NEVES, E.; ANDRADE, C.J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista CITINO**. v.1, n.1, p. 44 – 50, 2011.

YEH, H.; HSU, C. Analysis of dialysis coupled with ultrafiltration through concurrently parallel-flow rectangular membrane modules. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 69, p. 90 – 94, 2013.

YVERGNAUX, F. Lipases: particularly effective biocatalysts for cosmetic active ingredients. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**. v. 24, n. 4, p. 1 – 4, 2017.

ZANELLA, R. A.; **Síntese enzimática do éster oleato de etila a partir de lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* produzidas por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2020.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. da S.; JUNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. de A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p.123 – 137, 2009.

CAPÍTULO 2

ARTIGO SUBMETIDO

PERIÓDICO: APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

QUALIS A3

Uma abordagem sobre a produção de lipases do gênero *Penicillium* e suas potenciais aplicações biotecnológicas

RESUMO: Lipases (triacilglicerol-acil hidrolases) representam um importante grupo de biocatalisadores de uso industrial, pois atuam em sistemas aquosos e não aquosos, catalisando reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. Desse modo, essas enzimas têm aplicabilidade na produção de alimentos, laticínios, fármacos, detergentes, biocombustíveis, bem como na indústria de química fina. Elas podem ser oriundas de vegetais e animais, entretanto, a principal fonte é a microbiana. Os fungos do gênero *Penicillium* são considerados bons produtores de lipases, algumas já comercializadas. Entretanto, é crescente o interesse por mais lipases desse gênero com elevada atividade e comercialmente viáveis. O presente trabalho aborda os métodos para a produção das lipases de *Penicillium*, enfatizando suas principais aplicações biotecnológicas nos últimos anos. Verificou-se que a fermentação em estado sólido é atualmente mais empregada em estudos de escala laboratorial em bancada do que a submersa, no caso de fungos filamentosos, evidenciando a preocupação ambiental e sustentabilidade em reaproveitar resíduos agroindustriais ou graxos como substratos, bem como na facilidade da aplicação direta do sólido fermentado em reações químicas de hidrólise e esterificação. A adição de lipases para melhorar a eficiência de tratamentos de efluentes domésticos ou industriais apresenta-se como uma alternativa promissora pela facilidade da reutilização do material fermentado no processo de hidrólise. Destaca-se também a produção de biocombustíveis catalisada por lipases, que visa tornar esse processo economicamente viável para a implementação em escala industrial, reduzindo a emissão de gases tóxicos e efluentes químicos, assim como gerando subprodutos mais puros, o que minimiza os impactos ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: biocombustíveis, biorremediação, enzimas, fermentação.

INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores que apresentam aplicações em diversificados ramos industriais, como no alimentício, farmacêutico e médico (1). O seu uso intensificou-se a partir do século XX, devido a fatores como desenvolvimento biotecnológico resultando em novas aplicações, isolamento de novas enzimas e aprimoramento das existentes pela engenharia de proteínas (2,3). O mercado global de enzimas foi avaliado em U\$ 9,9 bilhões, em 2019, e estima-se uma taxa de crescimento anual composta de 7,1% para o período de 2020-2027, impulsionada pelos setores de alimentos, bebidas e biocombustíveis (4).

O uso desses biocatalisadores como alternativa aos processos químicos tradicionais pode aumentar o rendimento da produção industrial, baixar custos, bem como minimizar os riscos ambientais, por se tratar de produtos de origem natural, biodegradáveis, reutilizáveis, sendo cada vez mais empregados nas tecnologias limpas (2; 3).

Dentre as classes de enzimas de uso industrial, destacam-se as lipases por apresentarem a característica única de catalisar as reações de hidrólise de triglicerídeos em ambientes aquosos e sintetizar essas moléculas em ambientes não-aquosos (4). São conhecidas mais de 4.000 enzimas, das quais 200 são utilizadas comercialmente, sendo que as lipases são o terceiro maior grupo de vendas no mundo, apresentando propriedades de quimiosseletividade, enantioespecificidade e regiosseletividade (3; 6; 7).

A produção de lipases pode ser realizada a partir de fontes vegetais ou animais, porém, a obtenção por microrganismos tem se destacado por ser um método mais econômico, de maior rendimento, sendo mais viável para a produção em larga escala além da facilidade de manipulação genética (7, 8).

As cepas de bactérias são intensamente utilizadas para produzir enzimas, no entanto, os fungos têm sido extensamente empregados atualmente, devido ao fato de produzirem enzimas extracelulares que são secretadas para o meio de cultivo com o intuito de buscar nutrientes para os microrganismos, facilitando o processo de recuperação (9).

Entre os principais fungos conhecidos para a produção de lipases, têm-se os filamentosos que necessitam de substratos simples para crescimento, além de produzirem proteínas em grande escala. Dentre os fungos mais utilizados, nesse sentido, estão os gêneros *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp* (10; 11). O gênero *Penicillium sp* é encontrado em solos e responsável por contágio pós-colheita em alimentos, causando a sua deterioração; entretanto, diversas espécies são utilizadas há tempos na fermentação de queijos (*P. roqueforti*, *P. camemberti*) e embutidos (*P. chrysogenum*, *Penicillium nalgiovense*, *P. commune*, *P. aurantiogriseum*, *P. olsonii*), as quais são classificadas como GRAS (*Generally recognized as safe*) pelo comitê Food and Drugs Administration (FDA) devido ao seu uso histórico (12; 13).

Esses fungos são intensamente empregados devido à sua versatilidade metabólica na produção e secreção de pigmentos coloridos, variadas enzimas incluindo as lipases, que desempenham papel importante, principalmente no processamento de alimentos, mas também em outros segmentos ainda em estudos, como na produção de biocombustíveis e na biorremediação de resíduos agroindustriais (7; 14).

No presente trabalho, fez-se o levantamento das principais aplicações das lipases produzidas pelos fungos do gênero *Penicillium*; demonstrou-se a sua importância para diversas áreas biotecnológicas, enfatizando-se a relevância da

aplicação dessas biomoléculas nas áreas de biorremediação e produção de biocombustíveis.

A pesquisa foi realizada baseando-se nas evidências cientificamente relevantes entre os anos de 2010 e 2020, com abordagem de artigos que apresentassem a produção e/ou aplicação das lipases do gênero *Penicillium*. Foram buscadas referências nas bases de dados Google Scholar, Pubmed, Scielo e Elsevier, utilizando as palavras-chave “lipase e *Penicillium*”, combinadas aos seguintes termos: fermentação submersa, fermentação em estado sólido, aplicação industrial, biocombustíveis, tratamento de resíduos, separação de misturas racêmicas e esterificação.

DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS LIPASES

As lipases, quimicamente conhecidas como glicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são enzimas pertencentes ao grupo das serinas, as quais catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, liberando os ácidos graxos correspondentes (monoglicerídeos, diglicerídeos) e glicerol (Figura 1) (15).

A eficiência da liberação dos ácidos graxos pode ser acompanhada por diversos métodos, dentre os quais se destacam os métodos colorimétricos que utilizam substratos sintéticos, como ésteres de ácidos graxos (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e esterato), e os titulométricos que utilizam a trioleína como substrato padrão. Desse modo, o azeite de oliva, que contém em média 70% de trioleína, é uma opção de baixo custo como substrato na dosagem da atividade lipolítica que comumente emprega a titulação por NaOH (16; 17).

As lipases pertencem ao grupo das serino hidrolases com tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina, histidina e um resíduo ácido (aspartato ou

glutamato). A estrutura primária dessas biomoléculas apresenta diferentes graus de homologia, contudo, a sequência pentapeptídica Gly-X-Ser-X-Gly é altamente conservada e posiciona o resíduo nucleofílico (Ser) no centro de uma curvatura acentuada, localizada no C terminal de uma das folhas beta, facilitando a abordagem pelo substrato (18).

O padrão conformacional das lipases apresenta o motivo α/β hidrolase; possui no seu interior uma cavidade hidrofóbica com uma “tampa” polipeptídica, a qual, em presença de interface polar/apolar, sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo, que justifica a atividade aumentada das lipases na interface óleo/água (19; 20). Essas proteínas são estáveis em sistemas aquosos e não aquosos, de maneira que catalisam as reações de esterificação e transesterificação, que são de grande interesse industrial (21; 22).

PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS

A produção de lipases como biocatalisadores industriais é realizada principalmente por meio de processos fermentativos empregando-se as técnicas de fermentação submersa (FS) ou em estado sólido (FES) (9). De forma geral, os fatores ambientais influenciam significativamente o crescimento e a produção da lipase fúngica, sendo o intervalo de pH entre 6,0 e 8,0 e da temperatura entre 20 e 30°C (15).

FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Método amplamente considerado, pois apresenta maior controle de pH e temperatura do processo empregando meio líquido, no qual os nutrientes são solúveis; contém carbono como fonte energética principal, a qual pode ser sintética, como glicose, maltose e xilose, ou natural, como o bagaço de cana, farelo de aveia e

óleo de soja (11; 23). A produção dependerá de: carbono, nitrogênio, sais inorgânicos, oxigênio e aeração, além da presença do indutor lipídico (Figura 2), que estimula ativamente a produção da lipase (15).

Isolados os fungos de materiais residuais de processos industriais e domésticos, utilizou-se o *Penicillium solitum* para produzir lipase por fermentação submersa, avaliando o efeito da peptona, Tween 80, tributirina e óleo de oliva como substratos, por 14 dias, a 25°C (24).

Dentre as metodologias utilizadas para otimizar a produtividade de lipases, está a tecnologia transgênica. Modificou-se geneticamente a cepa industrial do *P. expansum* PE12, inserindo um fragmento da sequência da lipase desse fungo, denominado Ppel, um forte promotor da transcrição, que demonstrou ser positivamente regulado por azeite de oliva e inibido pela glicose (25).

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Essa fermentação emprega como substrato um meio insolúvel, um material sólido que funciona como suporte físico e fonte de nutrientes, podendo ser um sólido natural, como resíduos agroindustriais, ou um suporte inerte, como resinas poliméricas ou poliuretano (26; 27; 28).

Principalmente, para fungos filamentosos, a FES é conveniente, pois proporciona condições ambientais semelhantes ao seu habitat natural. Em comparação com a submersa, apresenta vantagens, como maior produtividade por volume de fermentação, diminuição de contaminação devido à baixa umidade do meio e aplicação direta do sólido fermentado em reações de hidrólise e esterificação (29).

A umidade, porcentagem de água livre no meio, atividade hidrolítica, pH e temperatura são fatores determinantes durante o processo da fermentação no estado

sólido (Figura 3), pois influenciam diretamente o crescimento dos microrganismos e a síntese de metabólitos (30).

A utilização de resíduos agroindustriais, como bagaços de frutas, vegetais, tortas de sementes oleaginosas e farelos de grãos, na forma de substratos na FES, diminui os custos de produção e recuperação das lipases do meio fermentativo, gerando produtos de maior valor agregado, além de reduzir o impacto ambiental. Resíduos alimentares podem ser empregados puros ou acrescidos de indutores de diferentes teores de carbono e nitrogênio (31). Após uma revisão sistemática, constatou-se que o número de publicações científicas sobre o tema cresceu somente a partir de 2009, provavelmente, devido ao maior interesse no reaproveitamento dos resíduos (32).

Os fungos filamentosos, particularmente os do gênero *Penicillium*, são frequentemente empregados nesse tipo de fermentação. O uso de farelo de soja para a produção de lipases de *Penicillium verrucosum*, evidenciado por Kempka (2008) (33), demonstrou que a produção da enzima foi mais eficiente a 27,5°C e umidade igual a 55%, apresentando atividade ótima (40 U gSF⁻¹) entre 30 e 45°C com pH 7,0, portanto, viáveis nas indústrias cosméticas e na medicina.

Adicionado ao farelo de trigo, resíduos graxos, como substrato para a produção de lipase de *Penicillium chrysogenum* SNP5 via FES, obtiveram melhores resultados com incubação por 7 dias na temperatura de 30°C. Após a extração da enzima em ampla faixa de pH, a atividade ótima de 40,7 U mL⁻¹ foi alcançada em pH 8,0. Obteve-se uma enzima aplicável na biorremediação de resíduos caseiros de óleo de cozinha e na produção de biocombustíveis, demonstrando que o uso de graxas como substrato aumenta a especificidade da lipase para clivar esses resíduos (34).

Utilizando como substrato resíduos tóxicos oriundos da produção de biodiesel a partir de sementes de mamona, empregou-se a FES para obter duas lipases de *P. simplicissimum* (155 U g⁻¹), após 96 h de fermentação (35).

As sementes de gergelim, linhaça e girassol foram utilizadas separadamente como substratos, para a produção de lipase de *Penicillium* sp, na qual se utilizou o padrão de temperatura e umidade durante a fermentação em estados sólido, respectivamente, 24°C e 60%, durante o período de 120 horas. A maior atividade lipolítica (16 U g⁻¹) foi no material fermentado das sementes de girassol após 96 horas de fermentação (17).

A torta de sementes de colza, um subproduto da fabricação do óleo, foi utilizada como meio fermentativo para 26 fungos de diferentes espécies, no entanto, foi o *Penicillium camemberti* que apresentou maior produção de lipases, a qual foi maximizada variando-se a porcentagem de carbono e nitrogênio do substrato. A adição de lactose, cloreto de cálcio e 80% de umidade revelou um pico de produção após 48 horas de FES, a 25°C aumentando a produção 11,2 vezes (150 U g⁻¹) em comparação à torta sem suplementação (36).

Embora a maioria das lipases fúngicas com aplicações biotecnológicas sejam extracelulares, alguns gêneros de fungos filamentosos, dentre eles, o *Penicillium*, são capazes de reter essas enzimas nos micélios, órgãos responsáveis pela sustentação das hifas e absorção dos nutrientes. Avaliou-se a capacidade de 10 espécies de *Penicillium* produzirem lipases ligadas ao micélio, com o intuito de utilizá-las na produção de ácidos graxos livres a partir de variados óleos vegetais. Os três principais produtores de lipases evidenciados foram: *P. janthinellum*, *P. purpurogenum* e *Penicillium italicum*, este último, após incubado a 30°C, por 72 horas, apresentou a produção de lipase com maior atividade hidrolítica, aproximadamente 200 U g⁻¹ (37).

Devido às múltiplas variáveis experimentais envolvidas nos processos de FS ou FES, estudos de planejamento experimental são descritos para avaliar individualmente o efeito dos parâmetros utilizados com o intuito de otimizar a produção. Um planejamento fatorial de níveis mistos foi utilizado para otimizar a produção de lipases de *P. chrysogenum*, avaliando-se pH, tempo de fermentação e mistura de substratos. As melhores condições foram obtidas em 72 horas de fermentação, pH ótimo entre 6,0 e 7,0 e atividade enzimática igual a 26,4 U g⁻¹ (38).

A Tabela 1 apresenta diversas espécies de *Penicillium* produtoras de lipases, relacionando os substratos da produção e a respectiva atividade lipolítica. Ademais, destaca a lipase obtida do *Penicillium expansum*, que apresentou atividade igual a 2.100 U g⁻¹ (25).

Algumas lipases de *Penicillium* estão disponíveis comercialmente, como a G[→] Amano 50, obtida de *P. roqueforti*, R[→] Amano obtida de *P. camemberti* (Amano Enzyme Inc., Japan) e a LVK, obtida de *P. expansum* (Shenzhen Leveking Bioengineering Co., Ltd, China) (37).

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LIPASES

Embora as lipases tenham sido descobertas no final do século XIX, o seu amplo potencial biocatalítico foi identificado em 1930 e, desde então, são utilizadas em diversos segmentos industriais (39).

Desde os anos 80, observa-se um aumento significativo do número de lipases disponíveis, devido, principalmente, aos estudos de clonagem e expressão das enzimas de microrganismos, assim como pela demanda crescente do uso de biocatalisadores com novas propriedades, relacionadas principalmente à especificidade e estabilidade frente à temperatura e pH (40). O valor estimado para o

mercado das lipases microbianas é de \$ 590,2 milhões, em 2023, com um crescimento anual de 6,8%, no período de 2018-2023 (41).

O interesse nas lipases deve-se a diversos fatores, a saber: sua propriedade de solubilidade em água e capacidade de catalisar as reações com substratos lipofílicos, bem como sua relativa estabilidade em solventes orgânicos (42).

As vantagens dos catalisadores biológicos em relação aos químicos ou convencionais extrapolam a especificidade e versatilidade, pois apresentam maior rendimento e redução do número de etapas, atuando como reagentes ambientalmente favoráveis devido às condições mais amenas do processo (43).

O potencial catalítico das lipases é empregado basicamente em dois tipos de reações: hidrólise e esterificação. A hidrólise de gorduras pode ser empregada nas biotransformações de diversos setores industriais: alimentício, no desenvolvimento de sabores; químico ambiental, no tratamento de efluentes residuais, no farmacêutico e na hidrólise estereo específica. A reação inversa, denominada esterificação, é utilizada na química fina para síntese de compostos intermediários terapêuticos e na alimentação para aromatização e emulsificação (3; 44).

Algumas lipases do gênero *Penicillium* têm sua utilização descrita há mais de 20 anos, entretanto, novas aplicabilidades foram descobertas, conforme mostra a Tabela 2.

No processamento de alimentos, o uso de lipases acelera a formação de ácidos graxos livres de cadeia curta, favorecendo a produção de aroma em produtos lácteos; por exemplo, a hidrólise da gordura do leite produz compostos característicos de aromas em queijos (10). As espécies de *Penicillium* são há muito tempo utilizadas na produção de queijos; por exemplo, as lipases do *Penicillium roqueforti* atuam nas etapas do amadurecimento dos queijos azuis, conferindo-lhes as suas características aromáticas (41; 45).

Ao catalisar as reações inversas de esterificação e/ou transesterificação, são empregadas na fabricação de margarinas a partir de óleos vegetais, síntese de emulsificantes, transformação de lipídios, laticínios, cervejarias, produção de condimentos e molhos (16).

Na busca de metodologias mais eficientes para a obtenção de suplementos alimentares poli-insaturados, foi imobilizada a lipase de *Penicillium sp.* seção *Gracilenta* (CBMAI 1583) em diferentes suportes hidrofóbicos e testaram na hidrólise do óleo de peixe, fonte de Ômega 3 (46). No geral, a enzima imobilizada foi mais resistente ao pH e temperatura, de maneira que apresentou atividade hidrolítica aumentada em relação à enzima livre, na coluna phenil-Sepharose. Ainda, demonstraram que as propriedades catalíticas dessa lipase podem ser direcionadas de acordo com o suporte selecionado. Os ácidos graxos poli-insaturados obtidos podem ser utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica (46).

Na área da saúde, é evidente o uso das lipases na indústria farmacêutica, na qual catalisam reações de hidrólise estereo-específicas sobre substratos pró-quirais e atuam na resolução de misturas racêmicas; por exemplo, a lipase de *Penicillium expansum* utilizada na separação de misturas de ibuprofeno, purificada 81,2 vezes ($85,94 \text{ U g}^{-1}$) (47). Esse alto grau de purificação enzimática para a utilização nessa área gera custos operacionais mais significativos em comparação com outros setores.

Adicionalmente, encontram-se lipases obtidas de outras fontes que catalisam a síntese de compostos intermediários terapêuticos, como o éster lactona, obtendo a pancreatina, utilizada no tratamento da insuficiência pancreática exócrina, assim como na produção de medicamentos que melhoram a digestão. Outro uso importante na medicina se refere à utilização em métodos diagnósticos, por exemplo, em doenças digestivas e pancreáticas, bem como na avaliação dos níveis de triglicerídeos (48), uma vez que as lipases são responsáveis pela sua hidrólise (49).

A utilização de desengordurantes, baseados em enzimas, torna a indústria de detergentes uma das principais consumidoras de lipases (50; 51), tendo-se o exemplo da aplicação da lipase recombinante obtida do *Penicillium cyclopium*, estável entre pH 8,0 e 10, a 30°C, que, por sua vez, apresenta a vantagem de se manter estável a baixas temperaturas e pHs alcalinos (52).

A degradação ambiental, por conta do aumento na produção de resíduos industriais, comerciais e domésticos, pode ser minimizada pelo reaproveitamento desses componentes, bem como por meio da biorremediação. Nesse sentido, a produção de biodiesel catalisada por lipases é uma alternativa sustentável e ecologicamente viável.

BIORREMEDIAÇÃO

Na biorremediação, o uso de lipases no pré-tratamento de efluentes nas indústrias alimentícias, particularmente na agropecuária e laticínios, desperta interesse devido à capacidade de essas hidrolisarem óleos e materiais graxos. Os lipídios figuram entre os maiores poluentes ambientais decorrentes de resíduos industriais, devido à formação de filmes oleosos na superfície aquática, que prejudica a difusão de oxigênio na água (10).

Nesse processo biotecnológico, são empregados agentes biológicos que podem ser plantas, microrganismos ou enzimas, com o objetivo de eliminar poluentes ambientais ou reduzi-los a compostos de baixa toxicidade, reduzindo a contaminação do meio ambiente, assim como obtendo produtos com maior valor agregado (53).

O uso de lipases é uma alternativa para a redução de danos ao meio ambiente, pois a produção de enzimas economicamente viáveis favorece o desenvolvimento de metodologias para o tratamento de efluentes, assim como, devido ao seu alto

potencial de biodegradação, reciclam grandes quantidades de matéria orgânica que geralmente são insolúveis na natureza.

Lipases de *P. chrysogenum* vêm sendo empregadas na biorremediação de resíduos graxos industriais e domésticos. Graxa residual pré-tratada com diversas lipases comerciais foi utilizada como fonte de carbono para a FES do *Penicillium chrysogenum*, a fim de identificar a degradação máxima de ácidos graxos presentes no substrato. O processo foi otimizado por meio de quatro variáveis: concentração de esporos, período de tempo, quantidade de graxa produzida e FeCl₂ (mM). Obtiveram-se 6,6 mg g⁻¹ de ácido graxo a partir de 10 g de graxa pré-tratada, em 16 dias, evidenciando o uso dessas enzimas nos processos de biodegradação de subprodutos agroindustriais (10;14).

Essa espécie também se mostrou eficiente em hidrolisar resíduos de óleo de cozinha, com a obtenção de 22% de ácidos graxos, tornando a lipase uma boa opção para a biorremediação e uso na produção de biocombustíveis sendo uma alternativa ecológica que segue os princípios da química verde (54).

Isoladas as espécies, *P. janthinellum*, *P. chrysogenum*, *P. camemberti*, *P. charlesi*, *P. oxallicum*, *P. italicum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. purpurogenum* e *P. roquefort*, foram selecionados os fungos *P. janthinellum*, *P. purpurogenum* e *P. italicum*, que produziram lipases com características semelhantes em relação ao pH (6,0 – 8,0) e temperatura (40°C) da atividade; foi avaliada a capacidade desses na hidrólise de óleos utilizados na alimentação. Identificou-se uma hidrólise do óleo de canola de 63,5% e 79,9%, respectivamente, para os fungos *P. jantthinellum* e *P. italicum*, enquanto, para o *P. purpurogenum*, a hidrólise do óleo de coco foi de 66,8% (37).

A pré-hidrólise lipolítica de resíduos de óleo e gordura pelas lipases melhoram a eficiência da remoção e aceleram o processo de degradação, enquanto a produção

de biodiesel, mediada por lipase, a partir de resíduos de óleo de cozinha, permite uma transformação biotecnológica sobre o processo químico convencional (55).

BIOCOMBUSTÍVEIS

Uma das principais aplicações das lipases, atualmente, é o seu uso na produção de biocombustíveis, como o biodiesel, que se refere a uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, tendo ampla aplicabilidade na substituição do óleo diesel convencional, produzido a partir de origem fóssil; da mesma forma, apresenta, além disso, uma alternativa com características químicas adequadas (biodegradável e não tóxico), menos poluente, tecnicamente competitivo e possibilidade de uso de diferentes plantas para produção regional, de acordo com a matéria-prima disponível (56).

O uso de lipases, como catalisadores heterogêneos, para a produção de biodiesel, apresenta-se como uma alternativa ecologicamente viável e uma proposta promissora para aplicação em diferentes processos químicos. Atualmente, a transesterificação é a reação mais utilizada, na qual uma molécula de triacilglicerídeo é convertida em ésteres de ácidos graxos por meio da reação com três moléculas de álcool, que podem ser: etanol, butanol, propanol e metanol, este último sendo o mais utilizado. A Figura 4 ilustra as três etapas que envolvem essa reação (29; 57).

Comumente, são utilizados catalisadores básicos nesse processo, porém, a utilização de lipases tem sido investigada por apresentar alternativa mais ecológica, no entanto, o alto custo das enzimas e a atividade reduzida na presença do metanol são limitações à implementação industrial da catálise enzimática. Na transesterificação convencional, são utilizados solventes orgânicos, como o n-hexano, no meio reacional, todavia, a substituição por líquidos iônicos (sais que permanecem líquidos à temperatura ambiente) aparece como uma alternativa limpa, pois aumenta

a atividade lipolítica e a especificidade da enzima, como demonstrado por Yang (2009) (21), que avaliou a atividade de transesterificação da lipase do *Penicillium expansum*, utilizando líquidos iônicos e hexano; assim, foi possível verificar maior rendimento da atividade lipolítica no líquido iônico, podendo ser útil para a produção de biodiesel.

A lipase do *P. expansum* também foi utilizada para catalisar a produção de biodiesel a partir do óleo de milho, usando, como solventes, um líquido iônico e um solvente orgânico (terc-butanol). Após a otimização de ambos os sistemas, em relação aos parâmetros de quantidade de enzima, razão molar metanol/óleo, temperatura e volume de solvente, verificou-se que a conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos foi de 86% para o líquido iônico e 52% para o terc-butanol. Os pesquisadores também observaram a resistência dessa lipase à desnaturação por metanol quando incubada em hexano ou em líquido iônico, apresentando boa atividade e estabilidade para ambos os solventes. Esses resultados são promissores, pois demonstram que, para essa enzima, o metanol não contribui para a inibição da atividade e pode ser utilizado na transesterificação (58).

O potencial da lipase *P. chrysogenum*, como biocatalisador na hidrólise de resíduos de óleo de cozinha, foi demonstrado obtendo-se ácidos graxos de 18 carbonos, evidenciando-se a utilidade da enzima para a produção de biocombustíveis (54).

A evolução da aplicação das lipases do gênero *Penicillium*, nas diferentes áreas, é ilustrada na Figura 5. Verifica-se que essas aplicações são decorrentes dos avanços da biotecnologia, bem como pela busca do desenvolvimento sustentável e preservação ambiental. A área biotecnológica apresenta diversos estudos dessas enzimas, demonstrando intenso uso nos processos de tratamento de resíduos e na produção de biocombustíveis.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir, com o presente trabalho, que, apesar da crescente utilização e aplicação das lipases de *Penicillium*, em diferentes setores industriais, verificou-se que há carência de novos estudos na área da saúde, possivelmente, devido à exigência de aprovação por órgãos competentes, bem como pela necessidade de enzimas altamente puras que encareceriam o processo. Entretanto, o avanço do emprego das lipases destaca-se na catálise da produção de biocombustíveis e no processo de decomposição de resíduos agroindustriais, representando a maior parte dos estudos mais recentes, que envolvem lipases produzidas pelo gênero *Penicillium*. A adição dessas enzimas melhora a eficiência dos processos de biodegradação, além de efetivar-se como uma alternativa promissora para o tratamento de efluentes e produção de produtos com alto valor agregado, como o biodiesel.

REFERÊNCIAS CONFORME REGRAS DA REVISTA

1. Moura CVR, Nunes ASL, Moita NJM, Neres HLS, Carvalho, LMG, Moura EM. 2012. Synthesis and characterization of polyesters from glicerol by product of biodiesel production. J. Braz. Chem. Soc. 23: 1226.
2. Salihu A, Alam ZM, Abdulkarim IM, Salleh HM. 2012. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. Resources, Conservation and Recycling. 58:36 – 44.
3. Messias JM; Costa BZ, Lima VMG, Giese EC, Dekker RFH, Barbosa AM. 2011. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas. 32: 213-234.
4. GRAND VIEW RESEARCH COMPANY. Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Industrial Enzymes, Specialty Enzymes), By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases), By Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. 2020, p. 1 – 4. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry/methodology> Acesso em:16/03/2020.
5. Manoel EA, Santos JCS, Freire DMG, Rueda N, Fernandez-Lafuente R. 2015 Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. Enzyme and Microbial Technology. 71: 53-57.
6. Priji P, Sajith S, Faisal, PA, Benjamin, S. 2016. Microbial lipases–Properties and Applications. Journal Microbiology and Biotechnology Food Sciences. 6: 799-807.

7. Menna M, Zehra A, Dubey MK, Aamir M, Upadhyay RS. 2018. Chapter 9 - *Penicillium* Enzymes for the Food Industries. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. 167-186.
8. Pastore GM, Costa VSR, Koblitz MGB. 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp.¹. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 23: 135-140.
9. Fernandes P, Carvalho F. 2016. Enzymes in Food Processing. Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production. 173–199.
10. Colla LM, Reynehr CO, Costa JAV. 2012. Aplicações e produção de lipases microbianas. Revista CIATEC – UPF. 4: 1-14.
11. Cortez DV, Castro HF, Andrade GSS. 2017. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. Química Nova. 40: 85-96.
12. Takahashi JA, Lima GS, Santos GF, Lyra FH, Silvahughes AF, Gonçalves FAG. 2017. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. Revista Virtual de Química. 9: 1-32.
13. Kanmani P, Aravind J, Kumaresan K. 2015. An insight into microbial lipases and their environmental facet. International Journal of Environmental Science and Technology. 12: 1147-1162.
14. Kumari A, Ahmad R, Negi S, Khare SK. 2017 Biodegradation of waste grease by *Penicillium chrysogenum* for production of fatty acid. Bioresource Technology. 226: 31–38.
15. Rajendran A, Palanisamy A, Thangavelu V. 2009. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. Brazilian Archives of Biology and Technology. 52: 207-219.
16. Messias J M, Costa BZ, Lima VMG, Giese EC, Dekker RFH, Barbosa AM. 2011. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas. 32: 213-234.
17. Rodrigues MLF, Silva EA, Broba CE, Oliveira ACD, Kruger C, Raimundo RW, Silva LP, Stuaní BT. 2015. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus communis* L.1. Revista Brasileira de Energias Renováveis. 4: 129- 145.
18. Jaeger KE, Dijkstra BW, Eetz MT. 1999. Bacterial biocatalyst: Molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications as lipases. Annual Reviews in Microbiology. 53: 315-351.
19. Costa VEU, Amorim HLN. 1999. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. Química Nova. 22: 863-873.
20. Sarmah N, Revathi D, Sheelu G, Rani YK, Sridhar S, Mehtab V, Sumana C. 2017. Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. Biocatalysts and Bioreactor Design. 34: 5-28.
21. Yang RL, Li N, Li RF, Smith TJ, Zong MH. 2010. A highly regioselective route to arbutin esters by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. Bioresource Technology. 101: 1–5.
22. Oliveira ACD, Vargas JVC, Rodrigues MLF, Mariano AB. 2013. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. 15: 19-26.
23. Feitosa IC, Barbosa JMP, Orellana SC, Lima ASL, Soares CMF. 2010. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. Acta Scientiarum Technology. 32: 27-31.

24. Chinaglia S, Chiarelli, LR, Maggi M, Rodolfi M, Valentini G, Picco AM. 2014. Biochemistry of lipolytic enzymes secreted by *Penicillium solitum* and *Cladosporium cladosporioides*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 78: 245-254.
25. Zhang T, Peng Y, Yu Q, Wang J, Tang K. 2014. Characterization of the 5 flanking region of lipase gene from *Penicillium expansum* and its application in molecular breeding. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 61: 493-500.
26. Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44:13–18.
27. Thomas L, Larroche C, Pandey A. 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 81:146–161.
28. Ohara A, SANTOS JG, Angelotti JAF, Barbosa PPM, Dias FFG, Bagagli MP, Sato HH, Castro RJS. 2018. A multicomponent system based on a blend of agroindustrial wastes for the simultaneous production of industrially applicable enzymes by solid-state fermentation. *Food Science and Technology*. 38: 131-137.
29. Mehrasbi RM, Mohammadi J, Peyda M, Mohammadi M. 2017. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on coreshell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. *Renewable energy*. 101: 593-602.
30. Dantas EM, Aquino LCL. 2010. Fermentação em Estado Sólido de Diferentes Resíduos para a Obtenção de Lipase Microbiana. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 12: 81 – 87.
31. Geoffry K, Achur RN. 2018. Screening and Production of Lipase from Fungal Organisms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14: 241–253.
32. Santos PS, Solidade LS, Souza JGB, Lima GS, Braga Jr ACR, Assis FGV, Leal PL. 2018. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*. 4: 1-8.
33. Kempka AP, Lipke NR, Pinheiro TLF, Menoncin S, Treichel H, Freire DMG, Di Luccio M, Oliveira D. 2008. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 31: 119–125.
34. Kumar S, Katiyar N, Ingle P, Negi S. 2011. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. *Bioresource Technology*. 102: 4909-4012.
35. Godoy MG, Gutarra MLE, Castro AM, Machado OLT, Freire DMG. 2011. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 38: 945–953.
36. Boratynski F, Szczepańska E, Grudniewska A, Gniłka R, Olejniczak T. 2018. Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. *Scientific Reports*. 8:1-9.
37. Marotti BS, Cortez DV, Goncalvez DB, Castro HF. 2016. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. *Química Nova*. 40: 427- 435.
38. Toscano L, Montero G, Stoytcheva M, Gochev V, Cervantes L, Campbell H, Zlatev R, Valdez B, Perez C, Gil-Samaniego M. 2013 Lipase Production Through Solid-State Fermentation using Agro-Industrial Residues as Substrates and Newly Isolated Fungal Strains. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 27: 4074-4077.

39. Daiha KG, Angeli R, Oliveira SD, Almeida RV. 2015. Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting. *PLoS ONE*. 10: 1-20.
40. Treichel H, Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JV. 2010. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technology*. 3: 182-196.
41. Chandra P, Enespa, Ranjan S, Arora PK. 2020. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*. 19: 1-42.
42. Koblitz MGB, Pastore GM. 2004. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp*¹. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24: 287-292.
43. Hasan F, Shah AA, Hammed, A. 2004. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbial Technology*. 9: 235–251.
44. Gutarra MLE, Godoy MG, Maugeri F, Rodrigues MI, Freire DMG, Castilho LR. 2009. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 100: 5249–5254.
45. Rabie AM. 1989. Acceleration of blue cheese ripening by cheese slurry and extracellular enzymes of *Penicillium roqueforti*. *Dairy Science and Technology -Lait – Elsevier*. 69: 305–314.
46. Turatti DFM, Junior MWG, Terrasan CRF, Moreno-Perez S, Pessela BC, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Carmona EC. 2017. Immobilization of Lipase from *Penicillium sp*. Section *Gracilenta* (CBMAI 1583) on Different Hydrophobic Supports: Modulation of Functional Properties. *Molecules*. 22: 1-14.
47. Lianghua T, Liming X, Min S, Huaying G. 2007. Purification and Application of a Lipase from *Penicillium expansum* PED-03. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 142: 194–199.
48. Siqueira LP, Lima RMM, Filho JLL, Shinohara NKS, Pimentel MCB, Silva MPC. 2009. Desenvolvimento de um biosensor eletroquímico para determinação de triglicerídeos. Tese de Mestrado - Universidade Federal de Pernambuco. 1-68.
49. Monteiro VN, Silva RN. 2009. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*. 3: 9-23.
50. D'Souza NM, Mawson AJ. 2005. Membrane cleaning in the dairy industry: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45: 125-134.
51. Hasan F, Shah AA, Hameed A, Javed S. 2010. Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*. 9: 4836-4844.
52. Huang, L, Zheng D, Zhao Y, Ma J, Li Y, Xu Z, Shan M, Shao S, Guo Q, Zhang J, Lu F, Liu Y. 2019. Improvement of the alkali stability of *Penicillium cyclopium* lipase by error-prone PCR. *Electronic Journal of Biotechnology*. 39: 91–97.
53. Lacerda F, Navoni JA, Amaral VS. 2019. BIORREMEDIAÇÃO: educação em saúde e alternativas à poluição ambiental. Instituto Federal do Rio Grande do Norte. 1-77.
54. Kumar S, Negi S. 2014. Transformation of waste cooking oil into C-18 fatty acids using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* through solid state fermentation. *3 Biotech*. 1-5.
55. Kumar S, Mathur A, Singh V, Nandy S, Khare SK, Negi S. 2012. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresource Technology*. 120: 300-304.
56. Salum TFC, Pighinelli ALMT, Damaso MCT. 2013. Produção de biodiesel por catálise enzimática. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). *Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos*. Embrapa Agroenergia. 257-276.

57. Oliveira JVG. 2019. Comparação do potencial da enzima lipase frente a catalisadores homogêneos na reação de transesterificação para produção de biodiesel. *Revista Integralização Universitária*. 13:158 - 171.
58. Zhang KP, Lai JQ, Huang ZL, Yang Z. 2011. *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. *Bioresource Technology*. 102: 2767 – 2772.
59. Fernandes, M. L. M. 2007. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. Dissertação de Doutorado – Universidade Federal do Paraná.

FIGURAS

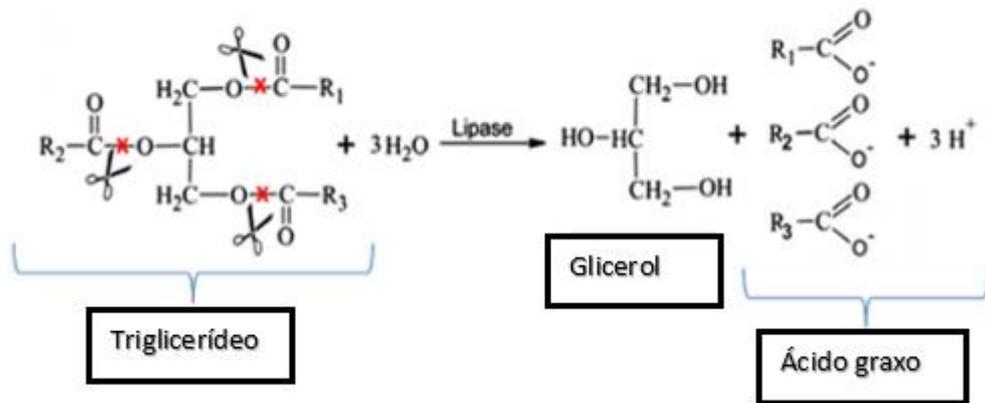


Fig 1 Reação de lipólise para obtenção de ácidos graxos.

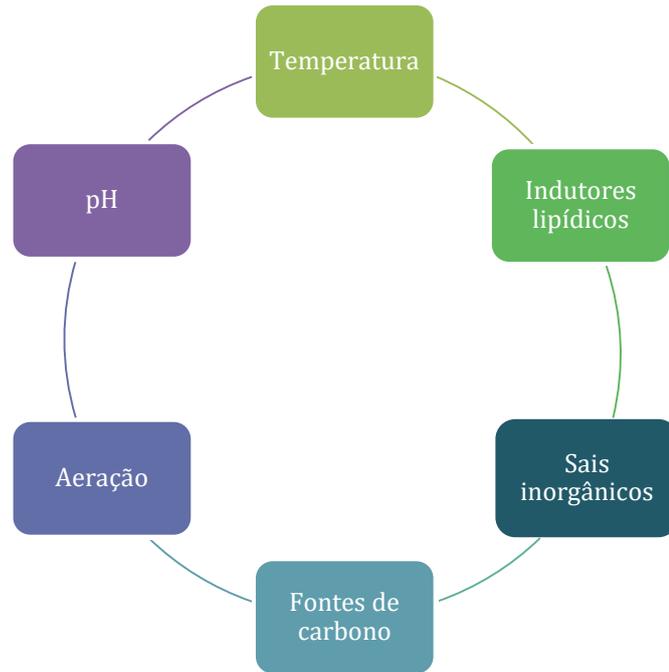


Fig 2 Fatores que influenciam a fermentação submersa (FS).

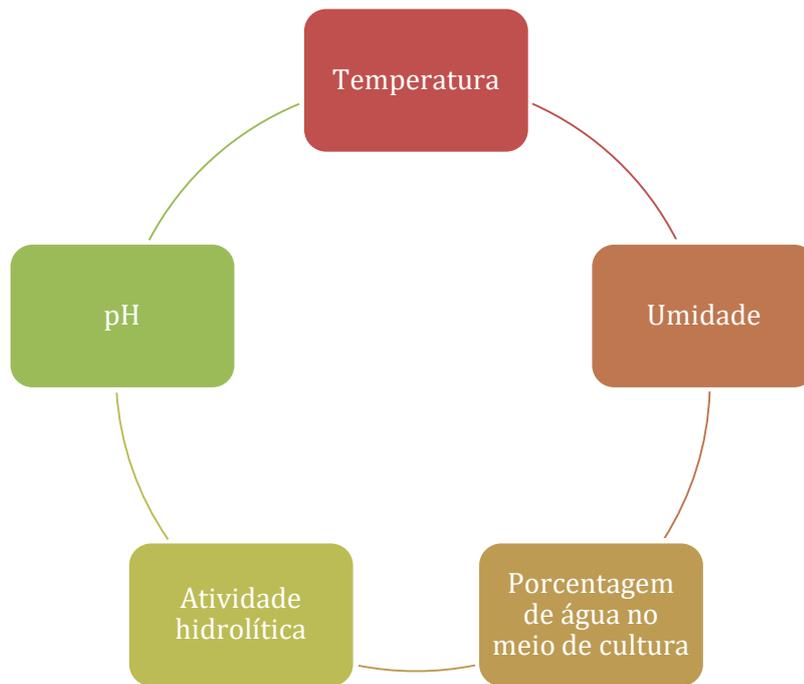


Fig 3 Fatores que influenciam na fermentação em estado sólido (FES).

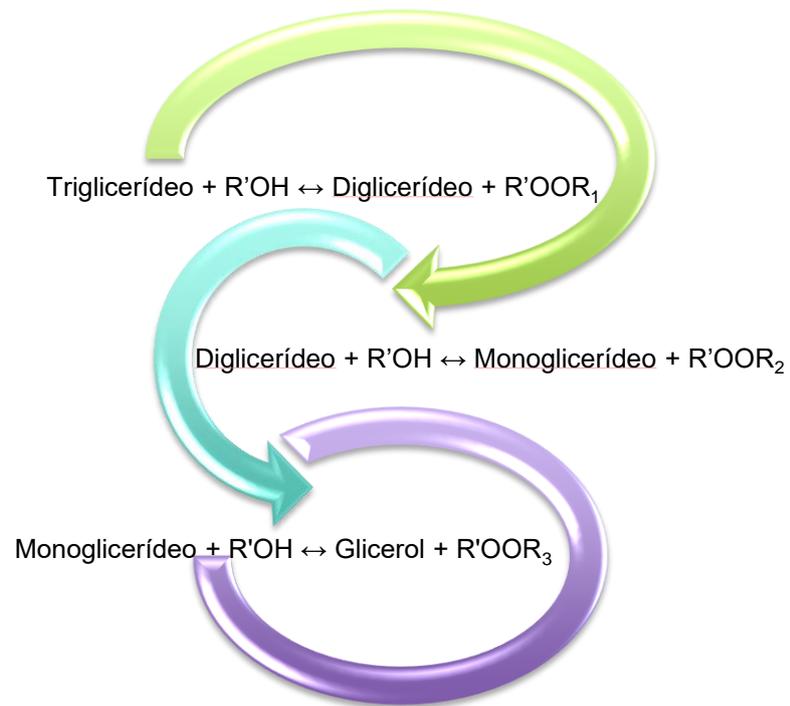


Fig 4 Transesterificação para obtenção do biodiesel.

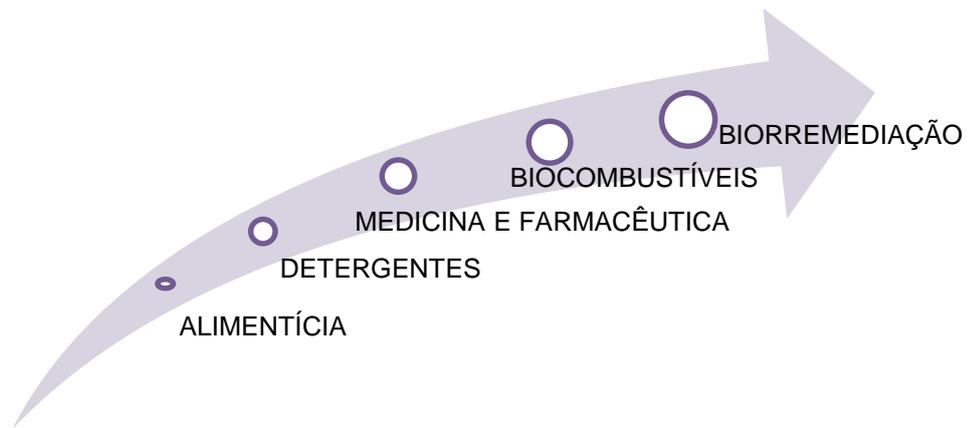


Fig 5 Evolução da aplicação das lipases obtidas do *Penicillium* sp.

Tabelas

Tabela 1: Lipases obtidas do gênero *Penicillium* e suas atividades lipolíticas relacionadas ao substrato.

ESPÉCIES	SUBSTRATO	ATIVIDADE LIPOLÍTICA	REFERÊNCIA
<i>P. expansum</i> PE12	Azeite de oliva	2.100 U g ⁻¹	(17)
<i>Penicillium</i> sp.	Sementes de gergelim, linhaça e girassol	16 U g ⁻¹	(25)
<i>P. chrysogenum</i>	Farinha de trigo	40,7 U g ⁻¹	(34)
<i>P. simplicissimum</i>	Resíduos tóxicos de sementes de mamona	155 U g ⁻¹	(35)
<i>P. camemberti</i>	Colza	150 U g ⁻¹	(36)
<i>P. janthinellum</i> , <i>P. purpurogenum</i> <i>P. italicum</i>	Azeite de oliva	200 U g ⁻¹	(37)
<i>P. chrysogenum</i>	Mistura de sementes	26,4 U g ⁻¹	(38)

Tabela 2: Potenciais aplicações de lipases obtidas de diferentes espécies de *Penicillium*.

ESPECIES	APLICAÇÕES	REFERENCIAS
<i>P. chrysogenum</i>	Pré-tratamento de efluentes obtidos da indústria alimentícia	(14)
<i>P. simplicissimum</i>	Produção de biocombustíveis	(35)
<i>P. italicum</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>P. purpurogenum</i>	Pré-tratamento de efluentes obtidos da indústria alimentícia	(37)
<i>P. janthinellum</i>	Esterificação e Transesterificação	(37)
<i>Penicillium</i> sp.	Produção de suplementos alimentares poli-insaturados	(46)
<i>P. cyclopium</i>	Produção de detergentes	(52)
<i>P. chrysogenum</i>	Tratamento de efluentes	(55)
<i>P. expansum</i>	Produção de biocombustível	(58)