

COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DA ENZIMA LIPASE FRENTE A CATALISADORES HOMOGÊNEOS NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

João Victor Gomes Oliveira¹

RESUMO

Com a atual dependência energética, a procura por fontes alternativas de combustíveis tem se elevado, nesse ínterim a produção de biocombustíveis se torna uma possibilidade. A transesterificação que, quimicamente é definida como a conversão de compostos com funções ésteres em outros ésteres, garante a produção de biodiesel. O uso de catalisadores é essencial para a eficácia da reação por redução de tempo no processo de síntese. Neste trabalho, são apresentadas as características e o potencial de catalisadores enzimáticos de lipases aplicados na reação de transesterificação. Existem catalisadores homogêneos e heterogêneos. Os catalisadores homogêneos são mais utilizados a indústria, adotam formulações químicas e apresentam alto rendimento. Todavia, apresentam algumas desvantagens como menor grau de pureza, desvios de reações. O uso de enzimas valida a utilização de catalisadores enzimáticos que se mostram alternativas viáveis e sustentáveis. As lipases capazes de catalisar a hidrólise de triglicerídeos apresentam rendimentos 90% em conversão de biodiesel. Adaptações e modificações no sistema do catalisador, como aplicações de suporte, ainda possibilitam rendimentos maiores que 95% de conversão. A transesterificação via lipases mostra alto potencial, já que estas contêm poder catalítico e dá ao mercado produtos com maior grau de pureza.

Palavras-chave: Ésteres, hidrólise, rendimentos.

ABSTRACT

With the current energy dependence, the demand for alternative sources of fuel has risen, within this scenario the production of biofuels becomes targeted. Transesterification, which is chemically defined as the conversion of ester-like compounds into other esters, ensures the production of biodiesel. The use of catalysts is essential for the effectiveness of the time reduction reaction in the synthesis process. In this work, it is presented as resources and potential enzymatic catalysts of lipases applied in the transesterification reaction. There are homogeneous and heterogeneous catalysts, in which, homogeneous catalysts are of major use in industry using chemical formulations and have high yields, however presenting some disadvantages such as lower purity, reaction deviations. The use of enzymes validates the use of enzymatic catalysts that prove viable and sustainable alternatives. Lipases capable of catalyzing triglyceride hydrolysis yield 90% conversion to biodiesel. Adaptations and modifications to the catalyst system as support applications still enable yields greater than 95% conversion. Transesterification via lipases shows emerging high potential as they contain catalytic power and give the market higher purity products.

Keywords: Esters, hydrolysis, yield.

¹ Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Federal do Tocantins. E-mail: jvoliveira@mail.uft.edu.br

1 INTRODUÇÃO

A sociedade vive uma era de absoluta dependência energética, principalmente proveniente de fontes fósseis e que atuam como principal força motriz na geração de energia. A demanda energética, aliada a políticas mais sustentáveis, leva ao intenso desenvolvimento de fontes alternativas como o biodiesel. É crescente a busca por inovações de fácil acesso, inclusive sob o ponto de vista econômico, principalmente aquelas conhecidas como fontes sustentáveis que otimizam processos reacionais, proporcionando uma solução economicamente viável (SALEH et al., 2010; MARÍN-SUÁREZ et al., 2019).

Os biocombustíveis são bens energéticos de grande demanda no comércio mundial. Por serem alternativas de baixos impactos ambientais diminuem a alta dependência externa do petróleo. Há duas matrizes energéticas já estabelecidas no mercado, o etanol e biodiesel, que utilizam diferentes metodologias para sua obtenção. Para a produção de biodiesel utiliza-se a reação de transesterificação, que ocorre em meio a óleos de origem animal ou vegetal e álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol) (AGUIEIRAS et al., 2016).

A reação de transesterificação tem importância comercial e industrial, uma vez que seus produtos fazem parte do dia a dia de toda sociedade. Essa reação está presente em processos industriais, devido a sua versatilidade em obtenções de vários produtos, como por exemplo resinas alquímicas, como tintas “a óleo”, tereftalato de polietileno, biolubrificantes, biodiesel (MENEHETTI et al., 2013; KHIRATKAR, 2018; AFIFAH et al., 2019).

Do ponto de vista químico, a reação de transesterificação ocorre pela conversão de um composto com função éster em outro grupo éster. Os ésteres são importantes compostos orgânicos, provenientes de sínteses químicas ou extraídos por produtos naturais. A reação é também chamada de alcoólise, e é um processo relativamente simples (ÂNGULO et al., 2018; GOLLAKOTA et al., 2019; LIANG et al., 2019).

Para a produção do Biodiesel, são utilizadas diferentes vias de transesterificação, enzimática, ácida ou básica, decorrentes de substâncias denominadas catalisadores que aumentam a velocidade da reação química sem afetar o seu produto, além de reduzir a energia de ativação e garantir o produto reacional em menor tempo (KUMAR et al., 2018; MARTÍNEZ et al., 2019).

A reação de transesterificação pode ocorrer na presença de catalisadores homogêneos ou heterogêneos. Os homogêneos possuem caráter monofásico (única fase) e heterogêneos desempenham papel bifásico (duas ou mais fases) no final da reação (XU et al., 2018).

A catálise homogênea, embora muito utilizada industrialmente, vem perdendo espaço para a catálise heterogênea que apresenta grandes vantagens como a possibilidade de reaproveitamento do catalisador, produtos mais limpos, evitar rotas de saponificação e aumentos de rendimentos (LIANG et al., 2019).

Os catalisadores enzimáticos são tipos de catalisadores heterogêneos, uma inovação que tem como mecanismo principal rota realizada por enzimas. Destes catalisadores se destacam a Lipase,

enzima responsável por produzir essa catálise na transesterificação. As Lipases são classificadas como triacilglicerol acilhidrolases (TIAN et al., 2017).

O emprego de Lipases como catalisadores apresenta um grande potencial de aplicação industrial. Em reações de transesterificação, a enzima se destaca na produção de biodiesel mais limpo, no qual garante condições mais brandas e aumento da eficiência do processo (CHANG et al., 2013; JIN et al., 2019(a)).

Ademais, apesar de serem produzidas por animais e plantas, as enzimas comerciais são produzidas a partir de fontes microbianas que apresentam elevado custo de produção, quando comparado a outras hidrolases. O uso de Lipases modificadas geneticamente permite aos fabricantes a venda de enzimas com atividade enzimática mais elevada e custo mais acessível (BI et al., 2016; JIN et al., 2019(b)).

Este trabalho apresenta um estudo sobre as características das Lipases e seu potencial no uso da reação de transesterificação por meio de catálise heterogênea na produção de biodiesel.

2 TIPOS DE CATALISADORES

2.1 CATÁLISE HOMOGÊNEA

A catálise homogênea ocorre quando todos os compostos adicionados para a reação de transesterificação formam uma só fase (monofásico). Variam quanto ao seu uso como básicos ou ácidos, nomeados respectivamente, como catalisadores químicos homogêneos (CLARK et al., 2008; CAMINADE et al., 2019).

O mecanismo de transesterificação catalisado por bases é dado inicialmente pela mistura de um álcool com uma base forte, havendo a formação de um alcóxido e um catalisador protonado. O alcóxido ataca a carbonila do triglicerídeo, produzindo um complexo intermediário tetraédrico, havendo a formação de um ânion do diglicerídeo e um éster monoalquílico. Logo, o catalisador será desprotonado, regenerando a espécie ativa, reiniciando o ciclo com outra molécula de álcool (TEO et al., 2019).

Catalisadores básicos, possuem elevado rendimento comparado aos catalisadores ácidos, além da sua rapidez, em média 4.000 vezes mais velozes, apresentando também atividade em diversas temperaturas (entre 25 a 70°C), é de fácil manipulação e possui baixa corrosividade. Por tantas vantagens, ganharam uma maior preferência do setor industrial. Para que o processo de catálise alcalina em meio homogêneo tenha uma maior viabilidade processual, são necessários que o óleo vegetal utilizado tenha um baixo teor de ácidos graxos livres, evitando assim, que o catalisador seja consumido ao fim do processo, e que este possua uma baixa umidade (TACIAS-PASCACIO, 2019).

Por maior que seja a obtenção de monoésteres alquílicos, às etapas posteriores de purificação encarecem o processo, pois os monoésteres e a glicerina que são obtidos apresentam uma grande

quantidade de contaminantes que necessitam da adição de mais operações unitárias. Outra desvantagem do processo é a produção de sabões, podendo ser derivadas da neutralização de ácidos graxos livres, da saponificação dos glicerídeos ou da saponificação dos ésteres monoalquílicos. Uma alternativa encontrada para tentar amenizar este infortúnio é a adição de um excesso de catalisador básico, e o sabão que pode ser produzido, logo depois retirado com água (GEORGOGIANNI et al., 2009).

Entre os ácidos usados no processo de catálise ácida, os ácidos de Bronsted (doadores de prótons: HCL, HSO₄, etc.) são os mais utilizados. Essa técnica tem maior usabilidade quando o óleo a ser manipulado possui uma grande taxa de ácidos graxos livres e água. Para iniciar o mecanismo de transesterificação catalisado por ácidos, faz-se necessária a ativação da carbonila, fazendo com que fique passível do ataque nucleofílico do álcool (RONG et al., 2019).

Para o bom desenvolvimento da reação é preciso que a temperatura do processo seja próxima à temperatura de ebulição do álcool a ser usado. Logo, acontece um prototropismo intermolecular, deixando haver a eliminação do diglicerídeo. Finalizando com a protonação da carbonila do novo éster. A presença de água, pode gerar uma reação de hidrólise dos triglicerídeos ou do novo éster, levando a produção de ácidos carboxílicos que diminuem o rendimento dos ésteres (ARANA-PEÑA, 2019).

Existem vários elementos que interferem, influenciam na velocidade da transesterificação, exemplificando alguns deles temos: tipo de álcool, razão molar, efeito da temperatura e efeito da agitação. Tratando do álcool, quanto menor a cadeia, mais eficiente será. Metano é um álcool muito usado, por reduzir o período da reação, fazer a separação espontânea da glicerina dos ésteres metílicos, ter uma alta conversão dos triglicerídeos em ésteres, usado em poucas quantidades e tem um menor custo (SHAN, 2018).

Assim sendo, álcoois como metanol apresentam desvantagens como sua alta toxicidade, necessitando de proteções para manuseio, em contrapartida o termo sustentável empregado ao biodiesel não se adequa a utilização deste, pois é obtido de fontes não renováveis. Como o Brasil tem uma produção baixa de metanol, quando comparado ao etanol, a escolha se torna mais fácil. O etanol é ambientalmente mais correto e possui menor toxicidade sendo produzido por fontes renováveis (YANG et al., 2018).

A razão molar álcool/triglicerídeos é de grande importância, quando se trata do rendimento da reação. Para que o equilíbrio reacional movido a favor do produto, é fundamental que haja álcool em excesso, usando geralmente a proporção de 6:1 para uma máxima conversão. Porém, essas grandes razões molares podem trazer problemas na separação entre os éster e a glicerina (OLIVEIRA et al., 2019).

Vias físicas como temperaturas altas impulsionam a catálise homogênea, pois se tem uma maior economia de tempo. Efeitos da agitação também são pontos consideráveis em vista que uma boa homogeneização da mistura álcool/óleo é de extrema relevância para a eficácia da transesterificação.

Contudo, é preciso avaliar economicamente quanto a viabilidade ou não de gastos energéticos que demandam gastos adicionais ao produto (SU et al., 2019).

2.2 CATÁLISE HETEROGÊNEA

A catálise heterogênea caracteriza-se como catalisador facilmente isolado no final da reação. Existem algumas variedades como: básicos, ácidos, enzimáticos e ainda misturas de óxidos heterogêneos como: Zircônia Sulfatada, La_2O_3 (10 %)-MCM-41, $\text{Na}_2\text{O-SiO}_2$ e CaO , este último muito utilizado em indústrias requerendo, porém, uma elevada temperatura. Além disso, há a reutilização destes catalisadores em outras reações o que representa rendimentos maiores (KHIRATKARA et al., 2018).

Muitos catalisadores heterogêneos estão sendo estudados e desenvolvidos devido seu potencial em um processo com menor custo de recuperação e purificação do produto final e a possibilidade de diminuir o impacto ambiental. Além de facilitarem a separação da glicerina, consomem menos energia e são mais fáceis de serem removidos do meio reacional, são recicláveis e não produzem sabões (DE SOUSA, 2015).

Estudos apontam que a catálise enzimática na transesterificação de óleos vegetais consegue aumentar a velocidade da reação de 10^8 a 10^{12} vezes. O principal catalisador enzimático relatado para produções de biodiesel são as Lipases. Catalisadores enzimáticos possuem algumas características como: alta estabilidade em solventes orgânicos, ausência de cofatores, altamente específica, dentre outras especialidades, conforme a tabela 1 (SANTOS, 2016).

Autores como Sousa, et. al (2015) indicam vantagens do uso da catálise enzimática, no ponto de vista de bioprocessos, estes promovem: reações mais limpas; reciclo do catalisador; apresentam somente água e o glicerol como rejeitos da reação; não existe uma complexidade tecnológica como as outras; não apresentam corrosão dos aparelhos utilizados; catalisador ecologicamente correto; as reações que acontecem na transesterificação enzimática não precisam de condições especiais como atmosfera inerte; catalisadores não tóxicos e a obtenção dos catalisadores podem ser provenientes de diversas fontes.

Tabela 1. Principais vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático para a produção de biodiesel.

<i>Processos</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Químico	Simplicidade	Dificuldade de separação do catalisador
	Alto rendimento	Impossibilidade de reutilização do catalisador
	Curto tempo de reação	Dificuldade de utilização de etanol hidratado
Obtenção de produtos com menor grau de pureza		
Enzimático	Facilidade na separação do catalisador	Maior tempo de reação
	Obtenção de produtos com maior grau de pureza	Custo das enzimas
	Possibilidade de utilizar o etano hidratado na reação	Médio rendimento

Fonte: Adaptado referência (DE SOUZA, 2019).

A principal alternativa para impactar indústrias de biodiesel é trazer meios ainda mais sustentáveis para o balanço energético. Em contexto, as Lipases são catalisadores enzimáticos de referência e de alta performance.

3 LIPASES

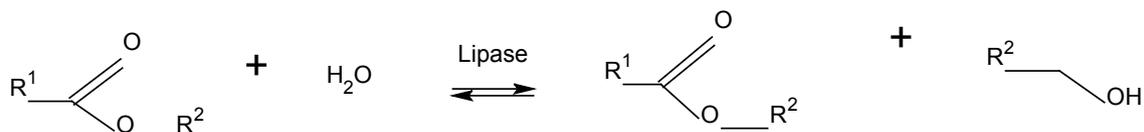
As Lipases pertencem à família das hidrolases (E.C. 3.1.1.3), têm forma monoméricas com massas moleculares entre 20 kDa a 95 kDa, pertencentes ao grupo das serino-hidrolases, pois os aminoácidos principais, presentes na sua tríade catalítica, possuem resíduos de serina, histidina e aspartato/glutamato (LEE et al., 2019; MARÍN-SUÁREZ et al., 2019).

Em estado natural, as enzimas Lipases têm importância bioquímica de catalisar a hidrólise na interface orgânico-aquosa de ligações éster-carboxílica liberando ácidos e álcoois orgânicos em meio aquoso, representado na figura 1 (a). A reação inversa, com restrição de água, promove a quebra de ligações ésteres de ácidos carboxílicos liberando diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (XIE et al., 2012).

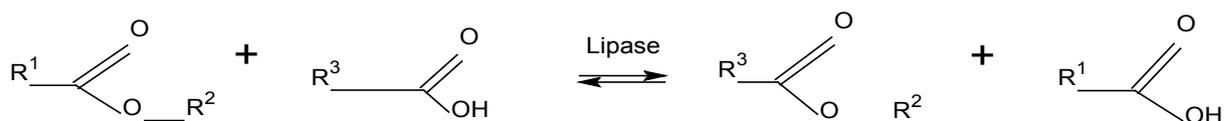
Assim, as lipases, catalisadores heterogêneos enzimáticos são grupos hidrolases, caracterizadas por sua enantioseletividade e regioseletividade que apresenta variadas aplicações industriais presentes em reações de esterificação, interesterificação, aminólises e lactonização. As lipases desviam sua rota bioquímica para o sentido de esterificação, bem como, tipos de transesterificação como acidólise, alcoólise, troca de éster, aminólise representado na figura 1 (b).

Figura 1. Rota química de lipases (a) Meio aquoso, (b) Meio com restrição de água.

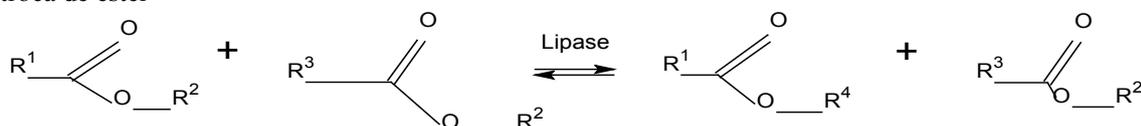
(a) hidrólise e esterificação



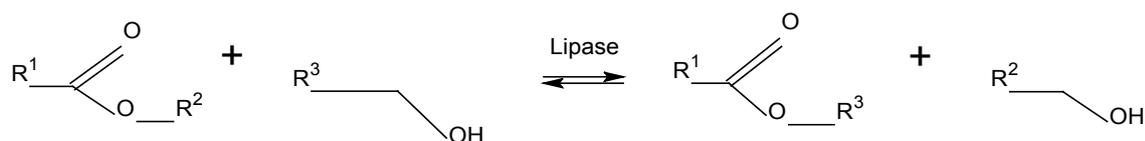
(b) acidólise



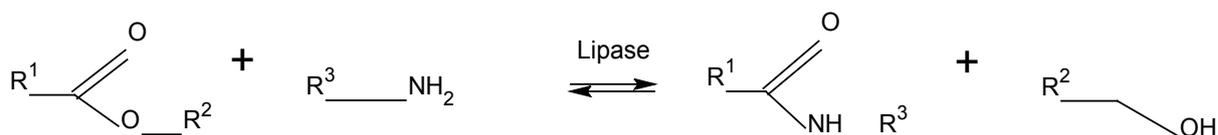
troca de éster



alcoólise



aminólise



A catálise de Lipases é análoga à serino-proteases, devido a esta possuir a mesma tríade que hidrolisa o substrato por formação de um intermediário tetraédrico que é estabilizado por interações aminocídicas que constituem o sítio ativo. Estes domínios conservados compõem a conformação característica dobra β - α nucleofílica (OLIVEIRA et al., 2019).

O mecanismo catalítico se inicia com um ataque de substituição nucleofílica do tipo 2 chamada usualmente S_N2 do átomo de oxigênio da serina do grupo -OH ao carbono carbonílico ativado do éster lipídico (substrato). Então o sítio ativo da enzima forma um tetraédrico transitório com a cadeia carbônica da ligação éster que será clivada. O tetraedro é estabilizado por ligações de H e grupo de -NH, entre o oxigênio negativamente carregado que está ligado ao grupo carbonílico. A histidina da tríade transfere prótons do grupo -OH da serina orientando o anel imidazol da histidina, neutralizando sua carga de forma parcial (GHALY et al., 2010; ALMEIDA, 2012; KIM et al., 2013).

Ulterior, o próton é doado ao oxigênio da ligação éster promovendo a formação de um

intermediário covalente na qual o álcool é liberado no meio. Subsequente, desacilação caracterizando hidrólise do intermediário covalente. A histidina da tríade ativa a molécula de água na qual retira-se um próton. O íon -OH formado, ataca o C carbonílico do grupo acil ligado a serina. Novamente, ocorre a formação de um intermediário tetraédrico transitório carregado negativamente no qual é estabilizado por uma característica da lipase sua cavidade oxianion. A histidina doa um próton ao oxigênio da serina ativa, que libera um componente acilcarboxílico. Portanto, regenera-se novamente a enzima para início da catálise de outra molécula do meio (RODRIGUES, 2010; ALMEIDA, 2012; NARWAL, 2013; MEHRASBI, 2017).

A enzima é descrita em caráter ácido e básico, constituindo o mesmo produto esterificado. Para verificação de Lipases verdadeiras, seja essa ácida ou básica, é disposto alguns critérios físico-químicos. A enzima ativa-se em interfase lipídeo-água, aumentando sua atividade quando ocorrer o fenômeno da emulsão perante o substrato triacilglicerol. Outra característica peculiar de Lipases é sua tampa chamada de *flap* que acoberta o sítio catalítico da enzima, o mecanismo funciona então, movendo-se de acordo com contato a interface do substrato (RODRIGUES, 2019).

4 USO NA INDÚSTRIA ENERGÉTICA DA ENZIMA LIPASE

A obtenção da Lipase para uso na indústria varia da fonte obtida, é visto que a atividade enzimática pode ocorrer em características físico-químicas diferentes, em que, o pH varia na faixa de 4 a 9; temperatura ambiente ou a 70°C . A possibilidade de reutilização das enzimas para a produção de biodiesel provam ser uma rota ecologicamente viável e alternativa promissora em relação a processos químicos (MEHRASBI, 2017).

É visto que, além do alto custo das enzimas puras, processos de extração e purificação das macromoléculas e sua instabilidade dificultam a recuperação desse biocatalisador, porém, uma vez utilizado, é possível fazer a reutilização de uma mesma enzima, diminuindo posteriores custos (KIM et al., 2013). Existem alguns bancos de microrganismos, dentre alguns existe a Embrapa Agroenergia que possui cepas produtoras de Lipases, além de parcerias entre a Embrapa e universidades desenvolvendo cepas com modificações genéticas.

Para otimizar a atividade enzimática e reutilizar as enzimas, a imobilização de enzimas em um suporte sólido tem sido visada, assim o processo dependeria das reações químicas realizadas entre o suporte e enzima. Ao utilizar enzimas imobilizadas, há o aparecimento de fases que facilitam a separação e remoção após o término da reação. Entre os métodos relacionados à imobilização, encontram-se baseados na hidrofobicidade, adsorção iônica, encapsulação das matrizes e ligação covalente. O uso de meio aquoso também potencializa a atividade enzimática (JAMBULINGAM et al., 2019).

Elencando fatores que dificultam o uso de Lipases, destaca-se a desativação da lipase em presença de metanol ou etanol e seu tempo para a obtenção do biodiesel, a lipase imobilizada

necessita ser purificada frente a seu suporte, uma vez que, impurezas podem ocasionar em: perda de atividade biocatalítica, redução da velocidade de reação e rendimento do produto (STOYTCHIEVA, 2012; RODRIGUES, 2019).

O uso de lipases na conversão de óleos em biodiesel tem se mostrado bastante eficiente quando enzimas de origem fúngica são utilizadas, estas têm tendência de possuir maior eficiência catalítica. Lipases imobilizadas proveniente de *Candida sp* possuem meia vida de mais de 200 horas, enquanto aquelas advindas de *Rhizaopus oryzae* são capazes de converter cerca de 90% de óleos ainda no primeiro ciclo de reação. Entre as lipases disponíveis no mercado encontram-se a Novozyme435 e lipozyme TMLIM (RIOS, 2018; HE, 2019).

O método de imobilização afeta diretamente nos resultados obtidos da conversão de óleos em biodiesel, variados métodos desenhados como lipases fixas em sílica (gran – T1, gran-C.a) e em lipases de *Candida Antarctica* imobilizadas em resina de macroporos de acrílico. (IMPS-30) que apresentam maiores eficiência catalítica. No entanto, com o decorrer dos ciclos, a tendência natural é de queda de rendimento, pois, apesar da atividade enzimática ser estável, a conversão cai de 99.9% para 87,4%. Dessa forma, pesquisadores têm estudado o uso de surfactantes e lipases em gel PVP e o polímero quitosana para reparar essa queda obtendo uma conversão e 95% (BADOEIDALFARD et al., 2019; DE MENESES, 2019; JAMBULINGAM et al., 2019; SARNO et al., 2019).

O uso de lipases no processo de obtenção do biodiesel em relação ao uso de catalisadores alcalinos se dá quando a taxa de separação do glicerol dos ésteres formados, além da própria matéria-prima. Ao empregar lipases no processo produtivo, há o aumento da possibilidade do uso de matéria-prima contendo altos níveis de ácidos graxos, já que estes, através da esterificação, podem ser diretamente convertidos em biodiesel mediante a ação de lipases (ARANA-PEÑA, 2019). Apesar de poder seguir duas rotas, o uso de lipases é mais eficiente quando usada a esterificação, visto que, ao realizar hidrólise e transesterificação, a taxa de conversão tende a ser mais lenta.

Estudos de Mukherjee e Gupta (2016) comprovaram que o uso de lipase de *Thermomyces lanuginosus* de baixo custo quando submetida a uma estratégia de bioimpressão teria a eficiência catalítica aumentada consideravelmente, utilizando como meio o próprio óleo – óleo de soja- e não um solvente orgânico, desse modo barateando o custo da produção. O emprego de lipases aliado a outras enzimas, como proteases e amilases, proporciona uma combinação hidrolítica capaz de potencializar a conversão ao reduzir cargas orgânicas, o que viabilizaria maior utilização de resíduos, como águas residuais ricas em gordura e teor de óleo para a produção de biodiesel (JAMBULINGAM et al., 2019). Dessa maneira, ao possibilitar a conversão, há também a biorremediação dessas águas residuais, para tal estirpes de *Staphylococcus pasteurii* como a COM-4 são visadas, apesar de não terem valores de atividades lipídicas documentadas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta demanda aliada a políticas mais sustentáveis leva a intensas pesquisas públicas e privadas para desenvolvimento de otimizações para produção de biodiesel. Portanto, a busca por inovações que aumentem a eficiência da síntese de Biodiesel, reação de transesterificação, tem despertado considerável interesse. O presente trabalho apresentou características de catalisadores da enzima Lipases, como uma estratégia simples e de alto rendimento e o seu potencial no uso da reação de transesterificação, por meio de catálise heterogênea na produção de biodiesel. As lipases apresentam alta estabilidade em solventes orgânicos, ausência de cofatores, altamente específica, evitando desvios de rotas reacionais. Esse catalisador apresenta-se seguro e aplicável para o mercado com rendimentos entre 90 a 95% em conversão de biodiesel. Os rendimentos garantidos pela enzima são maiores que catalisadores convencionais utilizados em indústrias como básicos e ácidos, por conta de sua possibilidade de reutilização.

REFERÊNCIAS

- AFIFAH, A. N. et al. Biolubricant production from palm stearin through enzymatic transesterification method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 148, p. 178-184, 2019.
- AGUIEIRAS, Erika CG et al. Investigation of the reuse of immobilized lipases in biodiesel synthesis: influence of different solvents in lipase activity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 3, p. 485-496, 2016.
- ALMEIDA, Alex Fernando de. **Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de Candida viswanathii**. 2012. 213 f. Tese - (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103979>>.
- ANGULO, Beatriz et al. Bio-lubricants production from fish oil residue by transesterification with trimethylolpropane. **Journal of cleaner production**, v. 202, p. 81-87, 2018.
- ARANA-PEÑA, Sara et al. New applications of glyoxyl-octyl agarose in lipases co-immobilization: Strategies to reuse the most stable lipase. **International journal of biological macromolecules**, 2019.
- BADOEI-DALFARD, Arastoo; KARAMI, Zahra; MALEKABADI, Saied. Construction of CLEAs-lipase on magnetic graphene oxide nanocomposite: An efficient nanobiocatalyst for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 278, p. 473-476, 2019.
- BI, Yicheng et al. Biosynthesis of oleyl oleate in solvent-free system by *Candida rugosa* lipase (CRL) immobilized in macroporous resin with cross-linking of aldehyde-dextran. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 1-5, 2016.
- CAMINADE, Anne-Marie; LAURENT, Régis. Homogeneous catalysis with phosphorus dendrimer complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 389, p. 59-72, 2019.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, Elisa d'Ávila et al. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

CHANG, Thomas Ming Swi. **Biomedical applications of immobilized enzymes and proteins**. Springer Science & Business Media, 2013.

CLARK, James H .; MACQUARRIE, Duncan J. (Ed.). **Manual de química verde e tecnologia** . John Wiley & Sons, 2008.

DE MENESES, Alessandra Cristina et al. Benzyl butyrate esterification mediated by immobilized lipases: Evaluation of batch and fed-batch reactors to overcome lipase-acid deactivation. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 50-57, 2019.

DE SOUSA, Gileno dos Santos et al. Catálise Enzimática: uma estratégia promissora na produção de biodiesel. **Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa**, v. 1, n. 1, 2015.

DHAWANE, Sumit H.; CHOWDHURY, Somnath; HALDER, Gopinath. Lipase immobilised carbonaceous catalyst assisted enzymatic transesterification of Mesua ferrea oil. **Energy Conversion and Management**, v. 184, p. 671-680, 2019.

EMBRAPA: **Enzimas promovem produção mais limpa de biodiesel**. 2016. <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/16390353/enzimas-promovem-producao-mais-limpa-de-biodiesel>>

ERICSSON, D. J. et al. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal Molecular Biology**, vol. 376, p. 109–119, 2008.

GEORGOGIANNI, K. G. et al. Transesterification of rapeseed oil for the production of biodiesel using homogeneous and heterogeneous catalysis. **Fuel processing technology**, v. 90, n. 7-8, p. 1016-1022, 2009.

GHALY, A. E. et al. Production of biodiesel by enzymatic transesterification. **Am J Biochem Biotechnol**, v. 6, n. 2, p. 54-76, 2010.

GOLLAKOTA, A. R. K.; VOLLI, Vikranth; SHU, Chi-Min. Transesterification of waste cooking oil using pyrolysis residue supported eggshell catalyst. **Science of The Total Environment**, v. 661, p. 316-325, 2019.

HE, Wen-Sen et al. *Candida* sp. 99-125 lipase-catalyzed synthesis of ergosterol linolenate and its characterization. **Food chemistry**, v. 280, p. 286-293, 2019.

JAMBULINGAM, Ranjitha; SHALMA, Madonna; SHANKAR, Vijayalakshmi. Biodiesel production using lipase immobilised functionalized magnetic nanocatalyst from oleaginous fungal lipid. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 245-258, 2019.

JIN, Wen-Bin; XU, Yan; YU, Xiao-Wei. Improved catalytic performance of lipase under non-aqueous conditions by entrapment into alkyl-functionalized mesoporous silica. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 364-370, 2019 (b).

JIN, Wenbin; XU, Yan; YU, Xiao-Wei. Preparation of lipase cross-linked enzyme aggregates in octyl-modified mesocellular foams. **International journal of biological macromolecules**, v. 130, p. 342-347, 2019 (a).

KHIRATKAR, Avinash Ganesh et al. Transesterification of castor oil using benzimidazolium based Brønsted acid ionic liquid catalyst. **Fuel**, v. 231, p. 458-467, 2018.

KIM, Sang Hyeon et al. Biodiesel production using cross-linked Staphylococcus haemolyticus lipase immobilized on solid polymeric carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, p. 10-16, 2013.

KUMAR, Dipesh et al. Cement wastes as transesterification catalysts for the production of biodiesel from Karanja oil. **Journal of cleaner production**, v. 183, p. 26-34, 2018.

LEE, Ja Hyun et al. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon. **Bioresource Technology Reports**, p. 100248, 2019.

LIANG, Yanan et al. Lithium doped TiO₂ as catalysts for the transesterification of bisphenol-A with dimethyl carbonate. **Molecular Catalysis**, v. 465, p. 16-23, 2019.

MARÍN-SUÁREZ, Marta et al. Reuse of immobilized lipases in the transesterification of waste fish oil for the production of biodiesel. **Renewable energy**, v. 140, p. 1-8, 2019.

MARTÍNEZ, Araceli et al. In-situ transesterification of Jatropha curcas L. seeds using homogeneous and heterogeneous basic catalysts. **Fuel**, v. 235, p. 277-287, 2019.

MEHRASBI, Mohammad Reza et al. Covalent immobilization of Candida antarctica lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. **Renewable energy**, v. 101, p. 593-602, 2017.

MENEGHETTI, Simoni P.; MENEGHETTI, Mario Roberto; BRITO, Yariadner C. A reação de transesterificação, algumas aplicações e obtenção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 63-73, 2013.

Mukherjee, J., & Gupta, M. N. (2016). Dual bioimprinting of Thermomyces lanuginosus lipase for synthesis of biodiesel. **Biotechnology Reports**, 10, 38-43

NARWAL, Sunil Kumar; GUPTA, Reena. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 4, p. 479-490, 2013.

OLIVEIRA, Aline F.; BASTOS, Reinaldo G.; LUCIMARA, G. Bacillus subtilis immobilization in alginate microfluidic-based microparticles aiming to improve lipase productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 110-120, 2019.

RIOS, Nathalia Saraiva et al. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: sources, properties and applications. **Process biochemistry**, 2018.

RODRIGUES, Rafael C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology advances**, 2019.

RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 15-32, 2010.

RONG, Mark K. et al. 1, 3-P, N hybrid ligands in mononuclear coordination chemistry and homogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 380, p. 1-16, 2019.

SALEH, Jehad; TREMBLAY, André Y.; DUBÉ, Marc A. Glycerol removal from biodiesel using membrane separation technology. **Fuel**, v. 89, n. 9, p. 2260-2266, 2010.

SANTOS, Maria Fernanda Vicente dos. **Produção de biodiesel por transesterificação utilizando catalisador heterogêneo (KOH/Al₂O₃)**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SARNO, Maria; IULIANO, Mariagrazia. Highly active and stable Fe₃O₄/Au nanoparticles supporting lipase catalyst for biodiesel production from waste tomato. **Applied Surface Science**, v. 474, p. 135-146, 2019.

SHAN, Rui et al. Catalysts from renewable resources for biodiesel production. **Energy conversion and management**, v. 178, p. 277-289, 2018.

STOYTCHIEVA, Margarita et al. Analytical methods for lipases activity determination: A review. **Current Analytical Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 400-407, 2012.

SU, Chia-Hung et al. Enzyme-assisted extraction of insect fat for biodiesel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 223, p. 436-444, 2019.

TACIAS-PASCACIO, Veymar G. et al. Comparison of acid, basic and enzymatic catalysis on the production of biodiesel after RSM optimization. **Renewable Energy**, v. 135, p. 1-9, 2019.

TEO, Siow Hwa et al. Efficient biodiesel production from *Jatropha curcus* using CaSO₄/Fe₂O₃-SiO₂ core-shell magnetic nanoparticles. **Journal of cleaner production**, v. 208, p. 816-826, 2019.

TIAN, Xingguo et al. A novel process of lipase-mediated biodiesel production by the introduction of dimethyl carbonate. **Catalysis Communications**, v. 101, p. 89-92, 2017.

XIE, Wenlei; WANG, Jianlong. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 373-380, 2012.

XU, Wenlong et al. Heterogeneous catalysts based on mesoporous metal–organic frameworks. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 373, p. 199-232, 2018.

YANG, Sae-Rom et al. Effects of ethanol in methanol fuel on the performance of membrane electrode assemblies for direct methanol fuel cells. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 66, p. 100-106, 2018.