



Obtenção de caldo bruto enzimático a partir de fungos lipolíticos para a produção de ésteres metílicos

Crude enzymatic broth from lipolytic fungi for the production of metylic esters

Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca Bessa¹, Danilo Luiz Flumignan², Amanda Oliveira Souza³, Mariana Costa Mello Gonçalves⁴, Carlos Frederico de Souza Castro⁵

RESUMO: Proveniente de matéria-prima vegetal ou animal, o biodiesel é um combustível renovável que nos últimos anos tem ganhado destaque como um possível substituto dos combustíveis fósseis, principalmente o diesel. O biodiesel é obtido mediante a transesterificação ou esterificação, em que as lipases que podem ser sintetizadas por meio de fungos lipolíticos são usadas como catalisadores. Assim sendo, a presente pesquisa teve por objetivo realizar a prospecção de enzimas lipolíticas em fungos e utilizar o caldo enzimático bruto para produzir biodiesel. O crescimento dos fungos foi realizado em meio mineral contendo uma única fonte de carbono: o azeite de oliva extra-virgem. O caldo bruto foi analisado por espectrofotometria, utilizando o *p*-NPB como substrato para quantificar as lipases. O caldo bruto produzido foi utilizado sem nenhuma modificação na presença de diferentes proporções de um planejamento central composto de óleo de soja e metanol para a produção de ésteres metílicos que foram analisados em cromatografia gasosa. Os fungos *Paecilomyces formosus* (Sakag. & Tada & Samson) I, *Paecilomyces formosus* II e *Aspergillus tubingensis* Mos. Produziram, respectivamente, uma atividade lipolítica específica de 9,268 U g⁻¹, 7,032 U g⁻¹ e 6,447 U g⁻¹ e, a partir do caldo bruto usado diretamente para a produção de biodiesel, foi possível alcançar valores de 41,60% de ésteres metílicos, concluindo que as lipases desses fungos são ativas e que quando aplicadas diretamente por meio do caldo bruto é possível realizar a transesterificação obtendo valores promissores até maiores que alguns encontrados na literatura, sendo uma lipase de grande potencial industrial.

Palavras-chave: Energia renovável. Enzimas. Fermentação submersa. *Paecilomyces formosus*.

ABSTRACT: Biodiesel, derived from vegetal and animal prime matter, is a renewable fuel that has recently been highlighted as a possible replacement for fossil fuels, especially diesel. Biodiesel is obtained by transesterification or esterification, where lipases which may be synthesized by lipolytic fungi used as catalysts. Current research analyzes the prospection of lipolytic enzymes in fungi and employed crude enzymatic broth to produce biodiesel. The growth of fungi occurred in a mineral medium with a single carbon source: extra-virgin olive oil. Crude broth was analyzed by spectrophotometry using *p*-NPB as substrate to quantify lipases. Crude broth produced was employed without any modification with different proportions of a central plan composed of soybean and methanol for the production of methyl esters analyzed in gas chromatography. Fungi *Paecilomyces formosus* (Sakag. & Tada & Samson) I, *Paecilomyces formosus* II and *Aspergillus tubingensis* Mos. respectively produced a specific lipolytic activity of 9.268 U g⁻¹, 7.032 U g⁻¹ and 6.447 U g⁻¹. From the crude broth directly used for the production of biodiesel, a rate of 41.60% of methyl esters was obtained. Results show that the fungi's lipases are active and, when applied directly in the crude broth medium, transesterification is possible with greater rates than those reported in the literature. In fact, the lipase has relevant industrial potential.

Keywords: Renewable energy. Submersed fermentation. *Paecilomyces formosus*. Enzymes.

¹ Mestre em Agroquímica pelo Programa de Pós-graduação em Agroquímica (PPGAq) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFG), Rio Verde (GO), Brasil.

² Docente do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso (IFMT), Campus Cuiabá (MT), Brasil.

³ Docente temporária no Colégio Estadual Alfredo Nasser, Novo Brasil (GO), Brasil.

⁴ Gerente de pesquisa e docente permanente de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFG), Rio Verde (GO). Doutora em Microbiologia Agropecuária - Unesp - Jaboticabal (SP), Brasil.

⁵ Docente Permanente do Programa de Pós-graduação em Agroquímica (PPGAq) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFG), Rio Verde (GO), Brasil.

Autor correspondente:

Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca Bessa: damarishadassa@hotmail.com

Recebido em: 04/09/2020

Aceito em: 02/07/2021

INTRODUÇÃO

Fungos são um grupo de espécies microbianas que possuem a capacidade de produzir diversas enzimas, como amilase, protease, pectinase, celulase e lipase e também podem ser sintetizadas por diversos tipos de espécies fúngicas (WÖSTEN, 2019). Alguns fatores influenciam na produção de lipases por micro-organismos, como o tipo de fonte de carbono utilizada, fonte de nitrogênio, os minerais para produzir o meio de crescimento desses micro-organismos, o pH desse meio, agitação, temperatura, entre outros (MENDEZ, 2019). As diferentes enzimas produzidas por fungos filamentosos podem ser aplicadas em várias áreas, como na fabricação de xarope de glicose, amaciantes, alimentos, reações de transesterificação, sendo catalisados por amilase, celulase, protease e lipase, nessa ordem (WÖSTEN, 2019).

A síntese de lipases por micro-organismos está relacionada à eficácia de acumulação de lipídeos pelos fungos. Szczesna-Antczak *et al.* (2018) estudaram o fungo *Mucor circinelloides* Tiegh e, por meio do aumento da sua capacidade de acumular óleo em relação ao seu peso seco, otimizaram o acúmulo de lipídeos com lipases intracelulares, conseguindo obter mais de 60% de lipídeos. As condições do meio de cultura também influenciam na produção de enzimas. Bancercz *et al.* (2016) demonstraram os mesmos resultados mediante a utilização do fungo *Rhizomucor variabilis* (Zheng & Chen). Os autores variaram temperaturas entre 4 e 25 °C, utilizando algumas fontes de carbono, cabendo destacar a maltose, que obteve 4 U mL⁻¹ de atividade volumétrica lipolítica, e a glicose, com uma atividade de 22,45 U mL⁻¹.

Para a verificação de presença de lipases em fungos filamentosos, sua quantificação pode ser feita utilizando substrato como palmitato de *p*-nitrofenil (*p*-NPP) (LOPES *et al.*, 2011), laurato de *p*-nitrofenil (*p*-NPL), butirato de *p*-nitrofenil (*p*-NPB), que são um dos métodos mais reconhecidos por Braga (2009), pois ele também demonstrou através de análises estatísticas que o método de maior precisão é o que utiliza *p*-NPB.

Com isso, as lipases produzidas por esses micro-organismos podem ser utilizadas na produção de biodiesel, que consiste em uma mistura de monoalquílicos de ácidos graxos, sendo um combustível sustentável, proveniente de matérias-primas renováveis, como álcoois e triacilgliceróis, geralmente produzido a partir de uma reação de catálise alcalina, isto é, a transesterificação (CANET *et al.*, 2017).

Algumas lipases de bactérias também já foram estudadas para a utilização na síntese de biodiesel. Os estudos de Abd-Alla *et al.* (2015) confirmam que a *Bacillus firmus* Rab. apresenta estabilidade em solventes orgânicos e suas enzimas se mostraram eficientes e de alto rendimento para a transesterificação. Existem estudos que utilizam enzimas brutas, para a

produção de biodiesel, como a lipase em pó de sementes utilizada por Kouteu *et al.* (2017), que obtiveram valores superiores a 95% de ésteres etílicos de ácidos graxos.

Outro estudo também demonstra a utilização de isoenzimas para catalisar reações com óleos não comestíveis, deve-se destacar que essas enzimas conseguiram alcançar valores de 95,3% de conversão em ésteres (KUO *et al.*, 2015), mas ainda não há estudos envolvendo fungos lipolíticos que utilizam o caldo enzimático bruto diretamente na produção de biodiesel sem qualquer modificação ou extração dessas enzimas. Essa alternativa pode contribuir para o aumento da sustentabilidade na síntese de biodiesel e na diminuição de custo da transesterificação.

Assim sendo, o presente trabalho tem por objetivo principal realizar a prospecção de enzimas lipolíticas em fungos e utilizar o caldo enzimático bruto para produzir biodiesel.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DO CALDO BRUTO ENZIMÁTICO

Três fungos foram utilizados nesse experimento: foram previamente coletados, isolados e identificados do bagaço de cana-de-açúcar por Lopes (2015), de duas destilarias, uma situada no interior do Estado de Goiás e outra no interior de Minas Gerais, em duas safras diferentes, uma em 2012 e outra em 2013. Esse isolamento foi realizado no laboratório de Microbiologia Agrícola, localizado no Instituto Federal Goiano, na cidade de Rio Verde, Goiás, Brasil e a identificação molecular foi realizada no Instituto Biológico de São Paulo, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil.

Os três fungos são: *Paecilomyces formosus* (isolado I), *Paecilomyces formosus* (isolado II) e *Aspergillus tubingensis* (isolado III) - coletados do bagaço de cana-de-açúcar - foram repicados em meio contendo BDA (batata, dextrose e ágar) (MORIN-SARDIN *et al.*, 2019), colocados em estufa (Bunker, NI 1525) a 28 °C, durante 7 dias. A escolha desses três fungos se deu pelo fato de terem sido as melhores cepas em produção de atividade específica lipolítica, conforme apontado por Bessa (2021). Posteriormente, foi preparado um meio mineral de acordo com Papanikolaou e Aggelis (2002), contendo 7 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 2,5 g L⁻¹ de Na₂HPO₄.7H₂O; 1,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,15 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O; 0,02 g L⁻¹ de FeCl₃.6H₂O; 0,06 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; 0,5 g L⁻¹ MnSO₄, H₂O e extrato de levedura com 0,5 g L⁻¹.

Todo o procedimento foi em triplicata, utilizando como única fonte de carbono o azeite de oliva a 1%. Os fungos foram cultivados em *erleynmeyers*, contendo 100 mL de meio mineral e a fonte de carbono e, em seguida, os frascos foram levados a uma mesa agitadora orbital (Solab, SL-180A), durante 8 dias sob agitação de 90 rpm em temperatura controlada entre 25 a 26 °C. Os caldos enzimáticos foram filtrados para separar a parte microbiológica e foram centrifugados (centrífuga Solab, SL-705) durante 10 minutos a 4000 rpm para que ocorresse a

separação de todos os particulados presentes no meio. O caldo bruto enzimático foi mantido sob resfriamento a 4 °C em geladeira.

2.2 QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A atividade lipolítica, o teor de proteínas e a atividade específica de lipases do caldo enzimático juntamente com os cálculos foram avaliados por meio de método colorimétrico, conforme Braga (2009) e Freitas (2017), baseado no procedimento *Enzymatic Assay of Lipoprotein lipase* (EC 3.1.134) com modificações que serão descritas nos tópicos a seguir.

2.2.1 Teor de proteínas

Para o teor de proteínas foi realizada uma primeira leitura em um espectrofotômetro UV-vis (Bel, UV-M51) (λ 260 nm), utilizando-se uma cubeta de quartzo de campo único e água destilada para zerar o equipamento. Em seguida, diluiu-se a amostra (caldo enzimático bruto) 10 vezes em água destilada e, então, a leitura foi realizada. Posteriormente, mudou-se o λ para 280 nm e o mesmo procedimento foi realizado, com os devidos registros dos valores obtidos.

O cálculo de teor de proteínas em mg de proteína por mL de enzima está presente no artigo e procedimento citados no tópico anterior.

2.2.2 Atividade volumétrica lipolítica e atividade específica de lipase

A atividade volumétrica lipolítica foi determinada utilizando uma solução tampão de fosfato de sódio de 100 mM com cloreto de sódio 150 mM e 0,5% (v/v) de triton, em pH 7,2 a temperatura ambiente, identificada como solução A. Em seguida, utilizando a solução A como solvente, foi preparada uma solução de *p*-NPB 50 mM, identificada como solução B, que é o substrato para a lipase. Depois, tomou-se uma cubeta de vidro, acrescentando-se água destilada, e no espectrofotômetro em um λ de 400 nm, zerou o equipamento, sendo as determinações realizadas em tempo de 0, 5, 15 e 30 minutos. Em outra cubeta de vidro foi acrescentada com uma pipeta volumétrica 900 μ L da solução A, 100 μ L do caldo enzimático, 10 μ L da solução B e mais 2000 μ L da solução A; a partir da homogeneização, fez-se a leitura nos tempos determinados, anotando-se os valores obtidos. A modificação do procedimento descrito na literatura foi na realização do branco, feito da seguinte forma: para o branco, realizou-se o mesmo procedimento, porém o caldo enzimático foi levado ao micro-ondas a 900 wats de potência, durante 5 minutos para a inativação das enzimas. Para o cálculo da atividade volumétrica lipolítica e atividade específica de lipase, está no artigo e procedimento já citado no tópico 2.2.

Na reação entre o butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB), ocorre a hidrólise do substrato realizada pela enzima, formando um cromóforo, um produto corado que pode ser quantificado por meio da absorvância em um determinado comprimento de onda, que depende do substrato a ser utilizado (BRAGA, 2009).

2.3 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

A transesterificação foi realizada com 45 g de óleo de soja comercial, que reagiu com metanol, e para o catalisador utilizou-se o caldo enzimático bruto produzido pelos fungos, com parâmetros estabelecidos na Tabela 1. Esses reagentes foram colocados em *erleynmeyers* em uma mesa agitadora orbital (Solab, SL-180A) com agitação a 100 rpm em temperatura ambiente durante 24 horas. Efeitos de fatores-chave na produção do biodiesel foram estudados com diferentes proporções molares de óleo metanol e variação enzimática em planejamento central composto com ponto central, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de delineamento experimental fatorial

Variáveis independentes	Faixas e níveis				
	-2	-1	0	1	2
Razão molar (óleo:álcool)	1:1,55	1:3	1:6,5	1:10	1:11,45
Quantidade de enzima (% v/v)	0,34	2	6	10	11,66

Fonte: Próprio autor

2.4 ANÁLISE DE ÉSTERES E ESTUDO ESTATÍSTICO

O produto formado foi avaliado em cromatógrafo gasoso com detector com ionização por chama, de acordo com a norma europeia (EN) 14103, utilizando uma coluna de polietileno glicol 30 m x 0.25 - 0.32 x 0.25, com o padrão interno C19, realizado no Instituto Federal de São Paulo, Campus Matão. Em seguida, foi realizado um estudo estatístico avaliando o quadro ANOVA e pelo teste de Tukey a ($\leq 0,05$). Os dados foram avaliados através do *Software Project for Statistical Computing* versão 3.5.0 de 2018. Posteriormente, foi realizada uma análise estatística de gráfico de pareto, gráfico de probabilidade normal e gráfico de contorno pelo programa Minitab.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três estirpes de fungos cresceram no meio mineral e foram capazes de produzir o caldo enzimático, utilizando como única fonte de carbono o azeite de oliva extravirgem. Na Tabela 2 é possível observar a quantificação da atividade lipolítica para cada fungo, o teor de proteínas (T. P.), atividade volumétrica (A. V.) e a atividade específica de lipases (A. E.).

Tabela 2. Quantificação de atividade lipolítica

Fungos	*T. P. (mg mL ⁻¹)	A. V. (U mL ⁻¹)	A. E. (U mg ⁻¹)
<i>Paecilomyces formosus</i> I	0,707	6,551	9,268
<i>Paecilomyces formosus</i> II	0,728	5,118	7,032
<i>Aspergillus tubingensis</i> III	0,572	3,685	6,447

Fonte: Próprio autor. *T. P.: Teor de proteínas; A.V.: Atividade volumétrica; A. E.: Atividade específica de lipases

A cepa com maior produção de lipases ativas foi *P. formosus* I, com 9,268 U mg⁻¹; seguido de *P. formosus* II e *A. tubingensis*. O valor de A. E. (atividade específica de lipases) é o de interesse da pesquisa, pois ele representa a capacidade enzimática de lipases que está presente no meio e são essas lipases que vão reagir como catalisadores. Não foi encontrado na literatura o uso das espécies *P. formosus* e *A. niger* para a A. E. utilizando o azeite de oliva como fonte de carbono para produzir lipases e a quantificação delas utilizando *p*-NPB, sendo este estudo o primeiro relato com tais dados.

A análise utilizando *p*-NPB é um procedimento de custo mais elevado, porém é um método de maior precisão, como apresentado por Braga (2009). Por meio desse substrato, ela quantificou lipases do fungo *Candida rugosa* (HW Anderson) Diddens & Lodder, em comparação a lipases comerciais (CALB, lipozyme TL IM e lipolase 100T). A lipase da *C. rugosa* apresentou uma atividade específica de 5,9 U m⁻¹; a lipozyme TL IM e lipolase, 100T 0,23 U mg⁻¹ e a lipase CALB 0,135 U mg⁻¹, demonstrando que o presente estudo conseguiu valores mais altos do que as lipases comerciais, como apontado na Tabela 2.

A afinidade da lipase em relação ao substrato também influencia na atividade específica, sendo que elas reagem com os resíduos de aminoácidos no sítio catalítico, conseguindo catalisar ésteres de cadeias mais curtas ou mais longas. Freitas (2017) demonstrou essa afinidade ao quantificar lipases de *Candida tropicalis* (Castell) Berkhout, que ao utilizar o substrato *p*-NPB não apresentou A. V. Por outro lado, ao utilizar o substrato laurato de *p*-nitrofenil (*p*-NFL) conseguiu obter 0,328 U mL⁻¹ de atividade volumétrica de lipases e ao utilizar o *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NFP) obteve 0,065 U mL⁻¹.

A fonte de carbono para a produção de lipases também influencia na atividade específica. Silva (2005) realizou um estudo com o fungo *Metarhizium anisopliaecom* Ilya, utilizando diferentes fontes de carbono, incluindo o azeite de oliva (1%) misturado com glicose a 1% e, em um período de 48 horas, conseguiu produzir 1,8 U mg⁻¹ de A. E. e, em 96 horas, o valor aumentou para 6,2 U mg⁻¹, seguido da proporção de 0,2% de glicose com 1% de azeite de oliva, obtendo 6,7 U mg⁻¹ de A. E. utilizando o *p*-NPB como substrato.

O fungo com maior produção de 41,60% de teor de éster foi o da cepa *P. formosus* II, nas condições de Razão Molar Óleo:Metanol (ROM) 1:6,5 e quantidade de enzima de 11,66% (v/v) de caldo enzimático bruto adicionado. Essa condição permitiu uma conversão de 41,60%,

observando que sua lipase é capaz de catalisar o substrato e é resistente ao metanol presente, sendo também a estirpe com a segunda maior produção de A. E., de 7,032 U mg⁻¹.

Uma pesquisa apresentada por Ferraz (2014) faz uma comparação da levedura *Sporidiobolus pararoseus* (Fell & Tallman) na esterificação a partir do extrato enzimático bruto, do extrato enzimático precipitado, do extrato enzimático bruto imobilizado e do extrato enzimático precipitado imobilizado, obtendo 27,24%, 24,87%, 42,31% e 24,69% de ésteres, respectivamente, que são valores próximos aos obtidos no presente estudo, tanto do extrato bruto quanto o imobilizado. O *P. formosus* II, que apresentou o maior valor de conversão de 41,60%, é maior que o bruto apresentado por Ferraz (2014), demonstrando que os resultados encontrados nessa pesquisa são promissores.

Realizou-se um estudo estatístico no qual foram analisados 3 fatores para a obtenção das relações que apresentam diferenças estatísticas entre si, a saber: fator 1 - Espécie fúngica; fator 2 - ROM; fator 3 - Enzima (%). Na Tabela 3, pode-se observar a análise de variância (ANOVA):

Tabela 3. Análise de variância da interação dos 3 fatores na produção de teores médios de ésteres

	*GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Espécie fúngica (EF)	2	72,96	36,48	8,3149	7,00E-04
ROM	4	21,19247	5,29812	1,2076	0,3176
Enzima	4	160,49188	40,123	9,1453	0
EF*ROM	8	212,11458	26,5143	6,0435	0
EF*Enzima	8	502,04125	62,7552	14,3039	0
Rom*Enzima	16	44,55375	2,78461	0,6347	0,8421
EF*ROM*Enzima	32	8,9725	0,28039	0,0639	1
Resíduo	57	250,075	4,38728		
Total	131	1272,4014			

Teste f (ANOVA). *GL: graus de liberdade entre e dentro dos grupos; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio dentro e entre os grupos; Fc: variância entre os grupos dividido pela variância dentro dos grupos; Pr>Fc: análise do F calculado em comparação com o F tabelado. ROM: razão molar óleo:metanol.

Fonte: Dados da pesquisa.

Com a tabela ANOVA (Tabela 3), percebe-se a existência de diferença entre os fungos e entre os tratamentos das enzimas, ao observar que o p-valor é menor do que 5%, sendo que para saber qual deles é diferente, faz-se necessário realizar uma comparação entre pares. Neste estudo, utilizou-se o teste de Tukey, já analisando o ROM apenas sem interação, não obtendo diferenças estatísticas, pois o p-valor é maior que 5%, demonstrando que não há evidência significativa para rejeitar a hipótese nula de homogeneidade. O coeficiente de variação foi de 9,77%, evidenciando que os dados possuem baixa dispersão e são dados homogêneos.

Ao analisar as taxas médias de transesterificação, pode-se observar que a um nível de 5% de confiança, houve diferença significativa quando comparados os fungos dentro de cada

nível: os níveis de ROM 1:6,5, 1:10 e 1:11,45, e os níveis de percentagem enzimática 0,34%, 2% e 11,66%, que podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Teste de Tukey dos desdobramentos dos fungos dentro dos níveis ROM e percentagem enzimática (Enz%)

Teste de Tukey			
Níveis (ROM)	Grupos	Tratamentos	Médias
1:6,5	a	<i>P. formosus</i> II	27,57 ± 2,77
	b	<i>A. tubingensis</i>	24,97 ± 2,68
	b	<i>P. formosus</i> I	23,76 ± 2,29
1:10	a	<i>P. formosus</i> I	26,52 ± 0,85
	a	<i>P. formosus</i> II	25,37 ± 1,48
	b	<i>A. tubingensis</i>	20,45 ± 1,62
1:11,45	a	<i>A. tubingensis</i>	27,55 ± 0,21
	ab	<i>P. formosus</i> I	24,40 ± 0,14
	b	<i>P. formosus</i> II	22,15 ± 1,63
Níveis (Enz%)			
0,34%	a	<i>A. tubingensis</i>	28,30 ± 0,14
	ab	<i>P. formosus</i> II	25,70 ± 0,99
	b	<i>P. formosus</i> I	21,85 ± 0,78
2%	a	<i>P. formosus</i> I	28,22 ± 0,85
	a	<i>P. formosus</i> II	27,95 ± 1,49
	b	<i>A. tubingensis</i>	18,77 ± 1,62
11,66%	a	<i>P. formosus</i> II	41,60 ± 2,83
	b	<i>A. tubingensis</i>	24,55 ± 2,40
	b	<i>P. formosus</i> I	24,45 ± 1,06

Teste de variância para valor-p, realizado através das médias em triplicata. Letras iguais não diferenciam pelo teste de Tukey a ($p = 5\%$). ROM: razão molar óleo:metanol; Enz%: percentagem enzimática.

Fonte: Dados da pesquisa.

Pode-se observar que para ROM 1:6,5 (Tabela 4), as lipases do fungo *P. formosus* II, apresentam o maior valor médio de teor de ésteres e estão presentes no grupo **a**, sendo estatisticamente diferente a um nível de 5% de significância das lipases dos outros dois fungos, que estão no grupo **b**, sem que estas apresentem diferenças entre si. Já com uma razão molar 1:10 óleo:metanol, as lipases do fungo *P. formosus* I apresentam o maior teor de ésteres, seguidas das lipases do fungo *P. formosus* II e ambos estão presentes no grupo **a**, ou seja, eles não são estatisticamente diferentes, mas apresentam uma diferença com as lipases do fungo *A. tubingensis*, que está presente no grupo **b** e possui a menor média. No nível 1:11,45, as lipases do fungo com maior média foi o *A. tubingensis*, que está no grupo **a** junto com o fungo *P. formosus* I, mostrando que não há diferença significativa entre eles, e no grupo **b** estão os fungos *P. formosus* I e II, que não diferem entre si. Além disso, pode-se perceber que à medida que se aumenta a ROM, a produção de ésteres pelas lipases do fungo *P. formosus* II diminui. Isso pode ser explicado por uma desativação parcial das lipases pelo aumento do metanol presente no

meio. Para os demais níveis (1:1,55 e 1:3) dos fungos dentro da ROM, não houve diferença estatística entre eles.

As lipases desses micro-organismos dentro do nível de 0,34% de enzima (Tabela 4) podem ser separadas em dois grupos. As lipases do fungo *A. tubingensis* conseguiram produzir o maior valor médio de teor de ésteres e estão no grupo **a** junto com o fungo *P. formosus* II, que não apresentam diferenças estatísticas; no grupo **b** estão os fungos *P. formosus* II e I, que não se diferem estatisticamente, porém o *P. formosus* I apresenta diferença do fungo *A. tubingensis*. No nível de 2% de enzima, o fungo *P. formosus* I a partir de suas lipases conseguiu obter o maior valor de teor de ésteres e está dentro do grupo **a** junto com o fungo *P. formosus* II, não apresentando diferença significativa entre eles, seguidos do fungo *A. tubingensis* que se está no grupo **b** com menor conversão.

No nível de 11,66% de enzima, tem-se a relação em que se obteve o maior teor de ésteres metílicos. As lipases do fungo *P. formosus* II estão no grupo **a**, sendo ele estatisticamente diferente dos demais fungos. As lipases desse fungo conseguiram catalisar o substrato em 41,60%, demonstrando que as lipases desse fungo são mais específicas para esse substrato do que os outros dois fungos, visto que as lipases são bastante específicas em relação a ligações que catalisam (CANET *et al.*, 2017). No grupo **b**, estão os fungos *A. tubingensis* e *P. formosus* I, que não se diferem estatisticamente. Nesse caso também é possível observar que as lipases do fungo *P. formosus* II, à medida que se aumenta a concentração de enzima, eleva-se o teor de ésteres. Para os níveis 6% e 10% de enzima, não houve diferença estatística entre os fungos.

Um estudo (KOUTEU *et al.*, 2017) que utilizou lipase em pó de sementes para produzir éster etílico, em parâmetros ideais com uma baixa atividade de água, e com uma ROM de 2:1 por 96 horas, obteve 95% de conversão em ésteres etílicos, se comparado a este trabalho a transesterificação ocorreu em um período de 24 horas, podendo obter um máximo de 41,60% de conversão em ésteres metílicos, utilizando um caldo enzimático líquido sem qualquer modificação.

Kuo (2015) utilizou isoenzimas de *Candida rugosa* para catalisar óleos não comestíveis, e em um período de 48 horas, realizando adição de metanol em período de 24 horas, conseguiu-se obter uma conversão de 95,3% em ésteres metílicos, esses dois estudos citados demonstram também que com maior tempo de transesterificação pode-se obter altos níveis de conversão, neste presente artigo é promissor observar em que um período bem menor de conversão é possível obter valores que se demonstram promissores, podendo ainda futuramente realizar parâmetros com maior tempo de duração de conversão e com menor quantidade de água, aumentando assim o seu rendimento.

Ao analisar, então, o fungo *P. formosus* II que apresentou uma tendência ao aumentar o ROM ou a Enzima (%), nota-se a curva de distribuição de probabilidade normalizada para os efeitos padronizados (Figura 1) e o gráfico de pareto que analisa em qual ponto os efeitos são estatisticamente significativos (Figura 2).

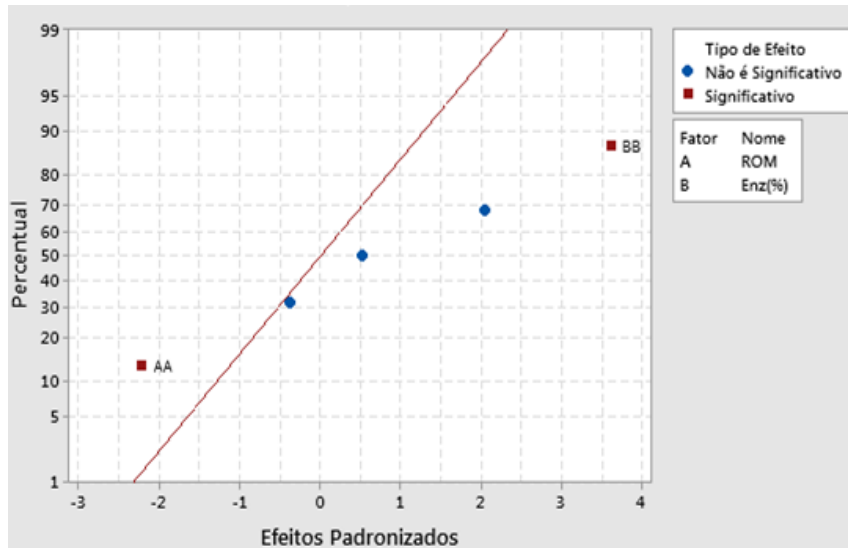


Figura 1. Gráfico normal dos efeitos padronizados ($p = 5\%$), a linha vermelha divide os efeitos negativos dos positivos.

*ROM: razão molar óleo:metanol; Enz(%): percentagem enzimática.

Fonte: Dados da pesquisa.

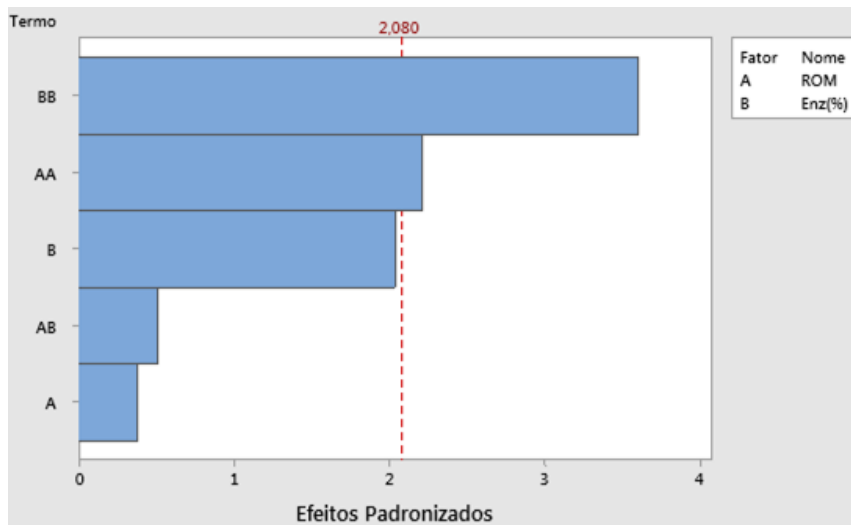


Figura 2. Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados ($p = 5\%$), das lipases do fungo *P. formosus* II.

*ROM: razão molar óleo:metanol; Enz(%): percentagem enzimática.

Fonte: Dados da pesquisa.

Todos os fatores e interações que são representados por um quadrado vermelho (Figura 1) foram significativos e esses se localizam afastados da linha central vermelha. Os efeitos posicionados próximo à linha foram representados por um círculo azul e correspondem à estimativa dos erros não sendo significativos. Na Figura 2, é possível observar que todos os efeitos que apresentam valores maiores que 2,08 - localizados à direita da linha tracejada - foram significativos. Observando as duas figuras pode ser inferido que o valor quadrático da enzima foi a variável mais importante no processo de obtenção de teor de ésteres pelas lipases

do fungo *P. formosus* II. O valor positivo do seu coeficiente significou que a produção de ésteres metílicos foi favorecida por valores de 11,66% de enzima. O segundo fator importante foi a relação quadrática da ROM, que demonstra que valores menores dessa interação, 1:6,5, conduzem a um valor maior de teor de ésteres. Essa interação entre percentagem de enzima e ROM pode ser observada na Figura 3 pelo gráfico de contorno, que na parte mais arroxeada demonstra as maiores conversões e na parte mais vermelha as menores.

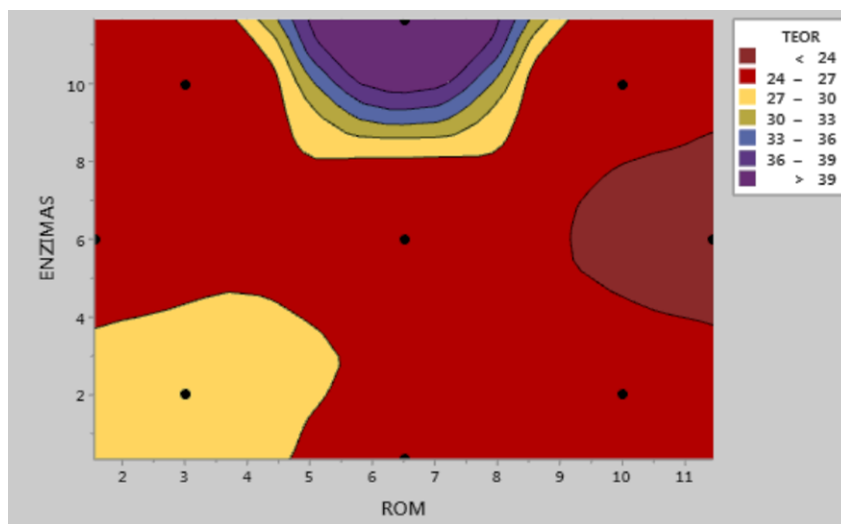


Figura 3. Gráfico de contorno da interação percentagem enzimática e ROM das lipases do fungo *P. formosus* II.

*Enzimas: em percentagem enzimática; ROM: razão molar óleo:metanol; Teor: teor de ésteres em percentagem (%).

Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 3 demonstra que no ponto 1:6,5 de ROM e 11,66% de enzimas consiste o maior ponto de conversão, e que na proporção em que a relação entre os dois fatores se torna mais central para o ROM, e mais alta para a percentagem enzimática, a conversão será maior e quanto maior a ROM, menor será conversão em ésteres metílicos.

As análises estatísticas demonstram que os ésteres metílicos produzidos a partir de lipases fúngicas podem modificar em relação a concentrações de enzimas e metanol que se acrescentam no meio. Nessa perspectiva, o estudo é promissor e a cepa *P. formosus* II pode ser estudada em diferentes temperaturas para obter maiores teores de ésteres, visto que uma reação de biodiesel ocorre em faixas de 40 °C a 60 °C, sendo que no presente estudo já se obteve uma boa conversão utilizando o caldo bruto em temperatura ambiente, podendo assim ter um aumento significativo se a temperatura for modificada.

4 CONCLUSÃO

As três estirpes de fungos, *Paecilomyces formosus* I e II e *Aspergillus tubingensis*, possuem lipases ativas e com alta atividade específica de lipases. E essas enzimas em extrato

bruto são capazes de catalisarem reações de transesterificação e conseguiram produzir biodiesel com valores elevados. Esse trabalho apresentou um estudo inovador com fungos pouco avaliados para este fim. Estudos posteriores podem otimizar as condições para aumentar o teor de ésteres e reduzir os custos e assim ter aplicabilidade na indústria.

REFERÊNCIAS

ABD-ALLA, M. H.; BAGY, M. M. K.; MORY, F. M.; HASSAN, E. A. Improvement of fungal lipids esterification process by bacterial lipase for biodiesel synthesis. **Fuel, Assiut**, v. 160, p. 196-204, 15 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.fuel.2015.07.080.

BANCERZ, R.; OSIŃSKA-JAROSZUK, M.; JASZEK, M.; JANUSZ, G.; STEFANIUK, D.; SULEJ, J. *et al.* New alkaline lipase from *Rhizomucor variabilis*: Biochemical properties and stability in the presence of microbial EPS. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Lublin, v. 63, n. 1, p. 67-76, fev. 2016. DOI: 10.1002/bab.1351.

BESSA, D. H. R. F. CASTRO, C. F. S.; SOUZA, A. O.; MENEZES FILHO, A. C. P.; 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. 396-406, 2021. DOI: <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2021v14n2e8069>.

BRAGA, A. C. **Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica***. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Minho, Braga, 2009.

CANET, A.; BENAIGRES, M. D.; VALERO, F.; ADLERCREUTZ, P. Exploring substrate specificities of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in biodiesel synthesis. **New Biotechnology**, Barcelona, v. 39, p. 59-67, 25 out. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.003>.

FERRAZ, L. I. R. **Aplicação de Lipases na Catálise de Reações de Interesse**. 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

FREITAS, M. F. M. **Produção de lipases por leveduras isoladas do bagaço de caju utilizando fontes alternativas de carbono e nitrogênio**. 2017. 104 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

KOUTEU, P. A. N.; BLIN, J.; BARÉA, B.; BAROUH, N.; VILLENEUVE, P. Solvent-Free biodiesel production catalyzed by crude lipase powder from seeds: effects of alcohol polarity, glycerol, and thermodynamic water activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 8683-8690, 07 set. 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03094.

KUO, T. C.; SHAW, J. F.; LEE, G. C. Conversion of crude *Jatropha curcas* seed oil into biodiesel using liquid recombinant *Candida rugosa* lipase isozymes. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 54-59, set. 2015.

LOPES, D. B.; FRAGA, L.P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase: to what

extent can this classification be applied accurately? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, p. 608-613, 2011.

LOPES, M. A. **Bioprospecção de fungos celulolíticos do cerrado brasileiro para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2015. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2015.

MENDEZ, D. B. **Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases com potencial de aplicação para a produção de biodiesel por catálise enzimática**. 2019. 48 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2019.

MORIN-SARDIN, S. M.; JANY, J. L.; ARTIGAUD, S.; PICHEREAU, V.; BERNAY, B.; COTON, E.; MADEC, S. Dataset of differentially accumulated proteins in *Mucor* strains representative of four species grown on synthetic potato dextrose agar medium and a cheese mimicking medium. **Data in Brief**, v. 11, p. 214-220, nov. 2019.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 43-49, 01 mar. 2002.

SILVA, W. O. B. **Lipases de *Metarhizium anisopliae*: Purificação parcial, regulação e secreção durante o processo de infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus***. 2005. 96f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SZCZĘSNA-ANTCZAK, M.; STRUSZCZYK-ŚWITA, K.; RZYSKA, M.; SZELAĞ, J. STAŃCZYK, Ł.; ANTCZAK, T. Oil accumulation and in situ trans/esterification by lipolytic fungal biomass. **Bioresource Technology**, Lodz, v. 265, p. 110-118, 01 out. 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.05.094

WÖSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion Biotechnology**, Utrecht, v. 59, p. 65-70, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2019.02.010>.