

## ESTUDO SOBRE O COMPARTAMENTO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA SOBRE: A MANIPULAÇÃO DA DOSAGEM DO ÁLCOOL E A INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE BIOCATALISADOR<sup>1</sup>

Ellen Oliveira Santos<sup>2</sup>, Kátia Iro Altidis Mota<sup>3</sup>

### RESUMO

O crescente interesse por fontes alternativas de energia tem impulsionado a busca por processos mais sustentáveis de produção de biocombustíveis. Entre eles, destaca-se a utilização de biocatalisadores microbianos, especialmente fungos filamentosos, como estratégia promissora para superar limitações dos catalisadores químicos. Neste estudo, avaliou-se o potencial do fungo *Penicillium roqueforti* na síntese enzimática de biodiesel a partir de óleo de soja. O cultivo foi conduzido em meio líquido suplementado com nutrientes específicos, e a atividade lipolítica foi monitorada por titulação. Ensaio adicionais investigaram a influência da concentração celular e da adição de metanol e etanol na atividade enzimática. Os resultados indicaram que 1 mL de células livres apresentou desempenho satisfatório, sem ganhos proporcionais ao aumento da concentração. Verificou-se ainda que ambos os álcoois reduziram a atividade lipídica, sendo o metanol mais prejudicial. Contudo, a adição fracionada em pequenas quantidades atenuou a desativação enzimática, sugerindo uma estratégia viável para manter a estabilidade do biocatalisador. Esses achados evidenciam o potencial de *P. roqueforti* como biocatalisador microbiano, reforçando sua aplicabilidade em sistemas de produção de biodiesel.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biocombustíveis, Biodiesel, Fungos Filamentosos, Lipase, *Penicillium roqueforti*

STUDY ON THE BEHAVIOR OF LIPOLYTIC ACTIVITY ON: MANIPULATION OF ALCOHOL DOSAGE AND THE INFLUENCE OF THE AMOUNT OF BIOCATALYST

### ABSTRACT

The growing interest in alternative energy sources has driven the search for more sustainable biofuel production processes. Among these, the use of microbial biocatalysts, especially filamentous fungi, stands out as a promising strategy to overcome the limitations of chemical catalysts. This study evaluated the potential of the fungus *Penicillium roqueforti* in the enzymatic synthesis of biodiesel from soybean oil. Cultivation was conducted in a liquid medium supplemented with specific nutrients, and lipolytic activity was monitored by titration. Additional tests investigated the influence of cell concentration and the addition of methanol and ethanol on enzyme activity. The results indicated that 1 mL of free cells showed satisfactory performance, with no gains proportional to increasing concentration. It was also found that both alcohols reduced lipid activity, with methanol being the most detrimental. However, fractional addition in small quantities attenuated enzymatic deactivation, suggesting a viable strategy for maintaining biocatalyst stability. These findings highlight the potential of *P. roqueforti* as a microbial biocatalyst, reinforcing its applicability in biodiesel production systems.

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

<sup>2</sup> Graduanda em Engenharia Ambiental- Bolsista IC UESB. 201912281@uesb.edu.br

<sup>3</sup> Docente titular UESB Itapetinga. kmota@uesb.edu.br

**KEYWORDS:** Biofuels, Biodiesel, Filamentous Fungi, Lipase, *Penicillium roqueforti*

## INTRODUÇÃO

A crescente demanda por fontes de energia renováveis tem impulsionado a busca por alternativas sustentáveis aos combustíveis fósseis. Nesse cenário, o biodiesel destaca-se como uma opção promissora, sendo tradicionalmente obtido pela transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com catalisadores químicos (MOTA, 2019; SUAREZ et al., 2007). Baseando na fontes alternativas para produção futura de biodiesel o estudo da utilização de catalisadores enzimáticos, em especial as lipases, apresenta-se como alternativa viável à catálise química, oferecendo vantagens como condições brandas de operação (temperatura e pressão), menor geração de subprodutos e maior facilidade na recuperação do biodiesel e do glicerol (HAMA et al., 2018). Esse processo pode empregar lipases purificadas, extratos enzimáticos ou células microbianas inteiras produtoras de lipase, sendo esta última abordagem considerada economicamente mais viável por eliminar etapas de extração e purificação (MOTA, 2019).

O desenvolvimento do catalisador depende do micro-organismo a ser utilizado como fonte de lipase. Destacam-se fungos filamentosos e leveduras, cujas enzimas geralmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação e reduz custos de produção (GEOFFRY et al., 2018; MEHTA et al., 2017). Estratégias recentes incluem a utilização de lipases associadas ao micélio de fungos filamentosos (LIMA et al., 2019; MAROTTI et al., 2017) e de células íntegras imobilizadas (ANDRADE et al., 2014; BHARATHI et al., 2019; CARVALHO et al., 2015), buscando superar limitações técnicas e econômicas do processo enzimático. Apesar disso, a presença de álcoois de cadeia curta, como metanol e etanol, pode inativar células imobilizadas, o que torna essencial o desenvolvimento de técnicas de imobilização mais eficientes (MOTA, 2019).

Espécies pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Rhizomucor* são reconhecidas como importantes produtoras de lipases com aplicações industriais (CORTEZ et al., 2017). Contudo, o gênero *Penicillium roqueforti*, é tradicionalmente empregado na produção de queijos azuis (LEISTNER, 1990), e se destaca pela capacidade de secretar enzimas extracelulares como lipases, proteases e celulases (SILVA, 2022). No entanto, esse fungo filamentoso tem elevado potencial biotecnológico para ser usado na produção de biocatalisador em óleo vegetal e representa uma alternativa promissora, tanto para reduzir os custos associados ao uso de enzimas purificadas quanto para superar limitações dos processos químicos.

Diante desse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial

de *P. roqueforti* como biocatalisador microbiano na síntese enzimática de biodiesel a partir de óleo vegetal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O fungo filamentoso alimentício *Penicillium roqueforti* foi cultivado em meio líquido preparado de acordo com He et al. (2016), com modificações, contendo 3% de óleo de soja refinado, 7% de extrato de levedura, 0,05% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1% de  $KH_2PO_4$  e 0,1% de  $KNO_2$  em 1 L de solução. A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio esterilizado e inoculado com  $10^8$  esporos, incubados a 30 °C e 175 rpm.

A atividade lipolítica foi determinada por titulação, segundo o método adaptado de Leal (2000). Para isso, 0,2 mL de amostra foram coletados diariamente e adicionados a uma emulsão composta por 5% de goma arábica em tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L) e 10% de azeite de oliva virgem, emulsificada por 5 min. As reações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 18 mL da emulsão e 0,2 mL da amostra, incubados a 35 °C e 180 rpm por 20 min. Os controles (brancos) continham apenas a emulsão, sendo posteriormente acrescidos de 0,2 mL da amostra após a incubação. A reação foi interrompida pela adição de 5 mL de solução etanol/acetona (1:1) e a titulação realizada com NaOH 0,04 mol/L, utilizando fenolftaleína 3% como indicador, cuja viragem foi caracterizada pela coloração rosa (Mota, 2019).

Após a identificação da condição de maior produção de biocatalisador, ensaios foram conduzidos em reatores contendo 9,65 g de óleo de soja e 5% de água, suplementados com 1 mL de células livres. As reações de metanólise e etanólise foram realizadas em triplicata por 72 h, a 30 °C e 175 rpm. Para avaliar a influência do biocatalisador na ausência de álcoois, foram também testadas concentrações de 2 e 3 mL de células livres, mantendo-se as mesmas condições de incubação (Mota, 2019, adaptado).

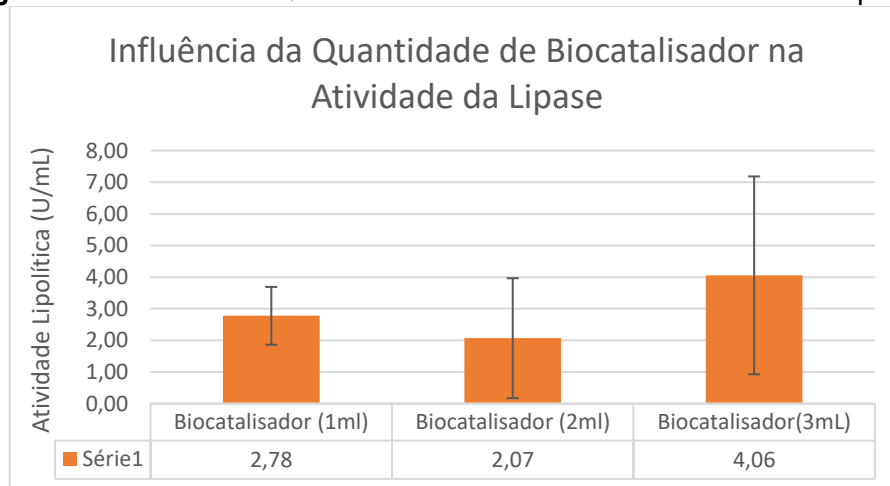
Posteriormente, novos experimentos foram realizados com a mesma composição do meio reacional (9,65 g de óleo de soja e 5% de água), suplementada com 1 mL de células livres, submetida à adição de álcoois. As estratégias de adição de metanol ou etanol foram: (i) adição única de 3 mol (1,32 mL de metanol e 1,59 mL de etanol) ou de 6 mol (2,64 mL de metanol e 3,18 mL de etanol); (ii) três adições sucessivas de 3 mol (0,44 mL de metanol e 0,53 mL de etanol) ou de 6 mol (0,88 mL de metanol e 1,06 mL de etanol), a cada 3 h; (iii) seis adições sucessivas de 3 mol (0,22 mL de metanol e 0,26 mL de etanol) ou de 6 mol (0,44 mL de metanol e 0,53 mL de etanol), a cada 6 h (Mota, 2019, adaptado).

A quantificação do biocatalisador foi realizada a partir da análise das médias e dos desvios-padrão, sendo observadas a influência do biocatalisador com adição de várias maneiras e sem a presença de álcool.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise foi realizada para determinar a produção de lipase correlacionada com a influência da quantidade de biocatalisador, conforme indicado na (Figura 1).

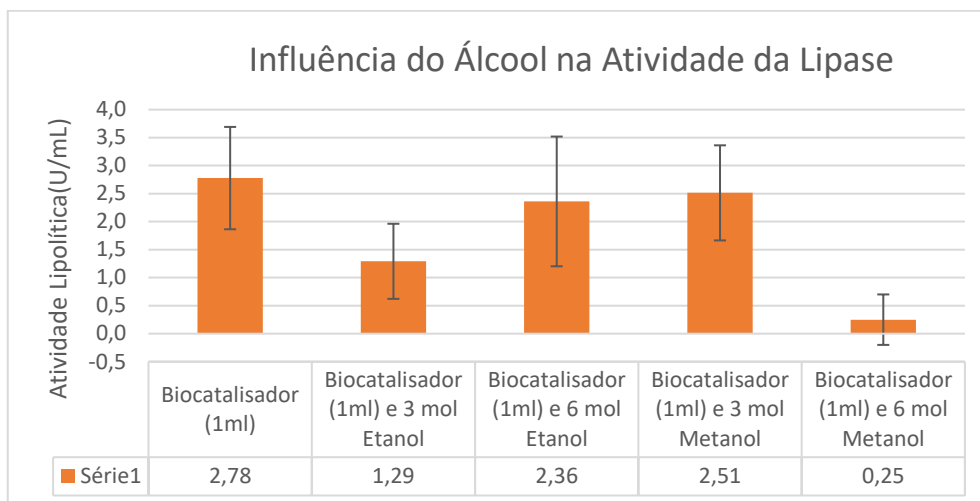
**Figura 1:** Influência da Quantidade de Biocatalisador na Atividade Lipolítica



Fonte: (Oliveira, 2025)

Na análise do efeito da concentração de biocatalisador, verificou-se que a adição de 1 mL de células livres promoveu resultados satisfatórios em relação à atividade lipolítica. Contudo, ao duplicar a concentração para 2 mL, não foi observada uma duplicação proporcional na atividade, sugerindo que a resposta não seguiu uma relação linear entre a quantidade de biocatalisador e a atividade da lipase. Quando a concentração foi triplicada, houve incremento da atividade, porém acompanhado de elevado desvio-padrão. Este fato indica maior variabilidade nos resultados, comprometendo a confiabilidade e a reprodutibilidade do processo. Assim, a utilização de volumes superiores a 1 mL de biocatalisador não se mostrou vantajosa, uma vez que aumentaria o consumo do recurso sem ganhos significativos de eficiência.

**Figura 2:** Efeito da Adição de Metanol e Etanol na Atividade da Lipase



Fonte: (Oliveira, 2025)

Quanto à influência dos álcoois (Figura 2), verificou-se que tanto o metanol quanto o etanol provocaram redução da atividade lipídica, independentemente da estratégia de adição. Esse efeito pode ser atribuído à toxicidade desses solventes para os microrganismos e à elevada sensibilidade das lipases à presença de álcoois, o que pode resultar em rápida desativação do biocatalisador (Chen et al., 2001). Entretanto, a magnitude da redução variou de acordo com o modo de adição. A aplicação sucessiva dos álcoois em pequenas quantidades reduziu a intensidade da inibição enzimática, corroborando os achados de (Kaieda et al. 1999), que destacam a importância do fracionamento das adições para mitigar a desativação da lipase.

Em especial, observou-se que concentrações mais elevadas de metanol exerceram maior impacto negativo sobre a atividade lipídica em comparação ao etanol. Tal comportamento pode estar relacionado ao efeito desnaturante do metanol, que promove a perda de estabilidade estrutural da enzima. Apesar disso, mesmo na presença de álcoois, a atividade da lipase foi mantida em níveis detectáveis, sugerindo que a estratégia de adição sucessiva pode ser considerada promissora para preservar a funcionalidade do biocatalisador em sistemas de metanólise e etanólise.

## CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES

A avaliação do fungo filamentoso *Penicillium roqueforti* evidenciou seu potencial como biocatalisador na produção de biodiesel, especialmente pela capacidade de secretar lipases ativas em meio oleoso. A concentração de 1 mL de células livres apresentou melhor desempenho, demonstrando que o aumento do volume celular não resulta, necessariamente, em maior eficiência catalítica. Observou-se ainda que a presença de metanol e etanol interfere negativamente na atividade lipolítica, sendo o metanol mais agressivo à estabilidade enzimática. Entretanto, a adição gradual dos álcoois mostrou-se uma estratégia eficaz para reduzir os efeitos inibitórios, permitindo maior preservação da

atividade da lipase. Esses resultados reforçam a viabilidade do uso de *P. roqueforti* em processos biotecnológicos, apontando caminhos para o desenvolvimento de sistemas enzimáticos mais robustos e sustentáveis na produção de biodiesel.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, G. S.; CARVALHO, A. K.; ROMERO, C. M.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 37, n. 12, p. 2539–2548, 2014.
2. BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, p. 101368, 2019.
3. CARVALHO, A. K.; FARIA, E. L.; RIVALDI, J. D.; ANDRADE, G. S.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. *Industrial Crops and Products*, v. 67, p. 287–294, 2015.
4. CHEN, M. I. B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. J. *Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 16, p. 53, 2001.
5. CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; 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.
6. GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 14, p. 241–253, 2018.
7. HAMA, S.; NODA, H.; KONDO, A. How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiple feedstocks. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 50, p. 57–64, 2018.
8. HE, Q. et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* ly6 onto loofah sponge as a whole-cell biocatalyst for biodiesel production. *BioResources*, v. 11, n. 1, p. 850–860, 2016.
9. KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; NODA, H.; NOMOTO, F.; OBTSUKA, K.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 88, 1999.
10. LEAL, M. C. M. R. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. 2000. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.
11. LEISTNER, L. Mould-fermented foods: Recent developments. *Food Biotechnology*, v. 4, p. 433–441, 1990.
12. MOTA, Kátia Iro Altidis. Produção de biodiesel utilizando células livres e células imobilizadas do *Aspergillus* sp VD3-E isolado no efluente da indústria de laticínio. 2019.
13. SUAREZ, Paulo A. Z.; MENEGHETTI, Simoni M. Plentz; MENEGHETTI, Mario R.; WOLF, Carlos R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais

poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 667–676, 2007.

14. SILVA, Letícia Noemi Brizio da. Identificação e caracterização filogenética de genes codificantes de lipases no gênero *Penicillium*. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

