

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
(PPGBIOTEC)

**INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR UM
CONSÓRCIO BACTERIANO ISOLADO DA
BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA**

WALDOMIRO RODRIGUES MAGALHÃES NETO

MANAUS

2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
PPGBIOTEC**

WALDOMIRO RODRIGUES MAGALHÃES NETO

**INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR UM CONSÓRCIO
BACTERIANO ISOLADO DA BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração

Orientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Edson Junior do Carmo

MANAUS

2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M188i Magalhães Neto, Waldomiro Rodrigues
Investigação da produção de lipases por um consórcio bacteriano isolado da biodiversidade amazônica / Waldomiro Rodrigues Magalhães Neto. - 2025.
78 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Edmar Vaz de Andrade.
Coorientador(a): Edson Junior do Carmo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2025.

1. Óleo residual de fritura. 2. Microrganismo. 3. Lipase. 4. Meio ambiente. 5. Poluição ambiental. I. Andrade, Edmar Vaz de. II. Carmo, Edson Junior do. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título

WALDOMIRO RODRIGUES MAGALHÃES NETO

**INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR UM CONSÓRCIO
BACTERIANO ISOLADO DA BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas,
como parte do requisito para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 29 de Abril de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr, Edmar Vaz de Andrade
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Jefferson Ferreira dos Santos
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Enedina Nogueira de Assunção
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

Neste espaço venho dispor de poucas palavras a qual desejo exprimir gratidão, até porque não existe tamanha gratidão a finalização deste trabalho se não fosse por cada pessoa ao meu lado fornecendo amor, paciência, colo, ombro, afago, abraço e uma mesa para comermos e desabafar.

Cada momento me fez construir uma mente melhor para que pudesse continuar até aqui, em cada momento pude ser livre e mesmo preso, pude continuar a pensar.

Para qualquer pessoa que deseja realizar este tipo de trabalho saiba que sozinho é difícil de caminhar, mas um grupo consegue te empurrar, então é sempre importante escolher as pessoas corretas ao seu lado e esta experiência de quase “doutorado” me fez ver a sorte que tenho, a sorte que sou e a sorte que existirá ao longo do tempo. Esta que me espere em caminhos ainda mais longos e árduos, mas sempre muito bem acompanhado.

Obrigado pela minha melhor companhia que está ao meu lado todo dia, meu namorado Matheus Lôbo, este sabe o quanto chorei, reclamei, vivi intensamente para chegar até aqui. Meus amigos Tássia, Daniele, Victor e Jennifer como vocês me ouviram, ajudaram e tiveram toda a paciência. Toda a gratidão a família Lôbo que me encoraja nesse caminho, aos meus pais que iniciaram toda essa saga, um grande abraço as minhas avós que entendem como foi complicado esses tempos e juntos carregaremos esse conhecimento e experiência de viver a ciência no Brasil.

Obrigado ao grupo LAPROT por ter me acolhido e recebido com todas as ajudas, risos, aprendizados e puxões de orelha necessários. Como também ao orientador Edmar e Edson que tiveram muita paciência neste caminho.

Obrigado a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas pela bolsa contribuída nestes tempos de muito estudo e foco.

RESUMO

Os microrganismos produzem diversos bioprodutos como as enzimas que são biocatalisadores, moléculas altamente específicas, menos poluentes quando comparadas aos catalisadores químicos e encontram rotas de ativação menos energéticas, acelerando as reações químicas. Os microrganismos podem ser encontrados naturalmente no solo ou em ambientes aquáticos, podendo, inclusive, serem cultivados em laboratório para a avaliação dos maiores potenciais das atividades enzimáticas. A lipase é uma enzima que hidrolisa ésteres de ácidos graxos, incluindo os triglicerídeos que são os principais componentes dos óleos, formando ácidos graxos livres e glicerol. Estes hidrolisados são compostos mais simples e menos prejudiciais ao meio ambiente. Sabendo que o óleo residual de fritura representa um importante poluente ambiental, esta dissertação objetivou selecionar bactérias isoladas da biodiversidade amazônica capazes de utilizar o óleo residual de fritura como fonte de carbono, que em abordagens futuras, poderão ser aplicadas em biorremediação. Inicialmente, a partir do genoma descrito destas bactérias, investigou-se a presença de genes codificadores de lipases. A anotação genômica pela ferramenta RAST possibilitou identificar prováveis genes de degradação lipolítica, rotas metabólicas por KEGG, por meio da plataforma KBase e resistência a antibiótico por CARD com apenas 1 resultado de resistência pela bactéria *Pseudomonas* sp. A produção de lipases a partir de óleo residual de fritura foi avaliada por atividade enzimática com pNPP e peso das proteínas por SDS-PAGE. As melhores produções lipolíticas foram da *Pseudomonas* sp. e do consórcio bacteriano, 226 U/L e 259 U/L respectivamente. , A separação de proteínas possibilitou a detecção na faixa de massa molecular esperada na *Pseudomonas* sp. e *A. seifertii*.

Palavras – chave: Óleo residual de fritura; microrganismos; lipase; meio ambiente; poluição ambiental.

ABSTRACT

Microorganisms produce a variety of bioproducts, such as enzymes, which function as biocatalysts—highly specific molecules that are less polluting when compared to chemical catalysts and operate through lower-energy activation pathways, thereby accelerating chemical reactions. These microorganisms can be naturally found in soil or aquatic environments and can also be cultivated under laboratory conditions to evaluate their enzymatic activity potential. **Lipase** is an enzyme that hydrolyzes fatty acid esters, including triglycerides, the primary components of oil resulting in the formation of free fatty acids and glycerol. These hydrolysates are simpler compounds and less harmful to the environment. Considering that waste frying oil constitutes a significant environmental pollutant, this dissertation aimed to select bacteria isolated from Amazonian biodiversity capable of utilizing waste frying oil as a carbon source, which, in future approaches, may be applied in bioremediation strategies. Initially, based on the genome sequences of these bacteria, the presence of lipase-coding genes was investigated. Genomic annotation performed using the **RAST** tool enabled the identification of potential genes related to lipolytic degradation, metabolic pathways through **KEGG** via the **KBase** platform, and antibiotic resistance genes via **CARD**, with only one resistance result detected in *Pseudomonas sp.* Lipase production from waste frying oil was evaluated through enzymatic activity assays using **pNPP** as substrate and by protein profiling via **SDS-PAGE**. The highest lipolytic activities were observed in *Pseudomonas sp.* and the bacterial consortium, with activities of **226 U/L** and **259 U/L**, respectively. Protein separation further allowed detection of bands within the expected molecular weight range in *Pseudomonas sp.* and *A. seifertii*.

Keywords: Waste frying oil; microorganisms; lipase; environment; environment pollution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reações catalisadas por lipases. O sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese). (Paques e Macedo, 2006; Luz, 2014).	12
Figura 2: Esquema da estrutura convencional representativa da lipase. As α -hélices e as folhas- β são representadas pelas espirais vermelhas e flechas vermelhas, respectivamente. A localização da tríade catalítica é indicada pelas esferas azuis (Ser-Asp / Glu-His). As linhas compreendem as interligações entre as folhas- β e as α -hélices, estas a partir da $\beta_3 - \beta_8$ (Akram et al., 2023).	14
Figura 3: Estruturação molecular no formato 3D da enzima lipase da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Observando diferentes perspectivas: A “tampa” está sendo representada em verde e laranja. (a) Representação das conformações α -hélices e folhas- β . (b) Perspectiva da superfície da molécula. (c) Sobreposição das perspectivas (a) e (b). (d) Corte transversal da estrutura (c) podendo compreender o contorno e a profundidade do sítio catalítico. (e) e (f) Demonstração do sítio catalítico visto por uma perspectiva superior, com a serina catalítica em vermelho (Glogauer, 2011).	16
Figura 4: Mecanismo catalítico proposto para lipases. (Jaeger et al., 1999; Luz, 2014).	18
Figura 5: Reações catalisadas por lipases do tipo não específica (CHEN; SHI, 1989).	23
Figura 6: Reações catalisadas por lipases do tipo 1,3 específica (CHEN; SHI, 1989).	23
Figura 7: Acilação utilizando lipase enantioselectiva no phenethanol (Chen e Shi, 1989).	23
Figura 8: Lipase na etapa de acilação seletiva de enantiômero óptico de anidro em meio com solvente orgânico (3) e hidrólise no diéster em meio aquoso (4). Observado assim a interferência do meio ao tipo de molécula que a lipase tende a manifestar a ação catalítica (CHEN; SHI, 1989).	24
Figura 9: Estratégia experimental do projeto resumida em 4 etapas macro e suas respectivas subetapas.	31
Figura 10: Área de coleta dos consórcios bacterianos. Porto do Ceasa, Rio Negro, Manaus-AM. Consórcios A1, A2, A3 e A4 coletados em 31 de agosto de 2018 (após derramamento de óleo na região). Consórcio A5 coletado em 15 de novembro de 2015.	32

Figura 11: Gráfico de mapa de calor da bactéria A-313 que possui coloração mais forte para os mais próximos de identificados e os mais claros para os mais distantes.	40
Figura 12: Gráfico de mapa de calor da bactéria A-314 que possui coloração mais forte para os mais próximos de identificados e os mais claros para os mais distantes.	41
Figura 13: Gráfico de mapa de calor da bactéria A-316 que possui coloração mais forte para os mais próximos de identificados e os mais claros para os mais distantes.	42
Figura 15: Sequência de metabolismos e foco no segmento de ácidos graxos de cadeia curta e conversões alcólicas das bactérias.	51
Figura 16: Gráfico de resistência a antibióticos de cada linhagem. O verde são os identificados semelhantes, amarelos são sequências próximas de existentes e vermelho são não identificados.	53
Figura 17: Triplicata de crescimento do consórcio bacteriano A3, no lado esquerdo (A) e a linhagem <i>Pseudomonas</i> sp. (A-316) a direita (B).	55
Figura 18: Triplicata de crescimento bacteriano com a linhagem <i>A. xylosoxydans</i> (A314) (A) e <i>A. seifertii</i> (A313) (B).	55
Figura 19: Gráfico de crescimento bacteriano das linhagens, <i>A. seifertii</i> (A313), <i>A. xylosoxydans</i> (A314), <i>Pseudomonas</i> sp. (A316) e o consórcio bacteriano.	56
Figura 20: Curva Padrão de paranitrofenol com concentrações conhecidas.	57
Figura 21: Gráficos comparativos de crescimento bacteriano e atividade enzimática para cada linhagem e consórcio bacteriano.	60
Figura 22: Atividade enzimática de todas as linhagens e consórcio num único gráfico.	62
Figura 23: Gel de SDS-PAGE – (A) <i>A. seifertii</i> nos poços 2, 3 e 4 e <i>A. xylosoxydans</i> nos poços 6,7 e 8. (B) Consórcio bacteriano nos poços 2, 3 e 4 e <i>Pseudomonas</i> sp nos poços 6, 7 e 8. Em ambos os géis apresentam o padrão no poço 1.	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação das enzimas e suas funções catalíticas segundo IUB (Adaptado de Lehninger, 2014).....	9
Quadro 2: Aplicação comercial de cada tipo de lipase proposta pela marca Novozymes (Luz, 2014).....	25
Quadro 3:Aplicações das lipases conforme a reação catalisadora.....	26
Quadro 4: Atividade enzimática calculada para cada linhagem e consórcio em U/L...	58
Quadro 5: Comparação das faixas de massa molecular das bandas proteicas obtidas neste estudo com dados de linhagens semelhantes descritas na literatura.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros ótimos de lipases conforme a fonte bacteriana, fúngica, vegetal e animal.....	20
Tabela 2:Representação dos subsistemas identificados pelo RAST do consórcio bacteriano.....	46
Tabela 3: Genes a quais apresentaram resultados sobre resistência a metais pesados.	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BH	Bushnell Hass
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
RAST	Anotação Rápida utilizando Tecnologia de Subsistemas
KEGG	Encilopédia de Genes e Genomas de Kyoto
LB	Lurie-Bertani
CNPJ	Cadastro Nacional de Pessoas Jurídicas
Pnpp	Para-nitrofenilpalmitato
pNP	Para-nitrofenol
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
APS	Persulfato de amônia
TEMED	
PAGE	Poliacrilamida
CDB	Convenção sobre a Diversidade Biológica
SCOP	Structure Classification of Protein

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. BIOPROSPECÇÃO	6
2.2. ENZIMAS	7
2.3. LIPASES E CARACTERÍSTICAS GERAIS	10
2.4. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAL DA LIPASE	13
2.5. MECANISMO CATALÍTICO	17
2.6. FONTES DE LIPASE	19
2.7. PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	21
2.8. ESPECIFICIDADE E AS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS	22
2.9. PANORAMA DE APLICAÇÃO DE LIPASES EM MATRIZES OLEOSAS	27
3. OBJETIVO	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	31
4.1.1 Resultados Anteriores	31
4.1.2 Microrganismos selecionados	33
4.2 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÔMICA	33
4.3 ANOTAÇÃO GENÔMICA E OBSERVAÇÃO DE ROTAS METABÓLICAS	33
4.4 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	34
4.5 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA	34
4.6 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LIPASE PELAS BACTÉRIAS	34
4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASE	35
4.8 CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASE	35
4.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	36
4.10 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS	36
4.11.1 Eletroforese em SDS-PAGE não desnaturante e não redutor	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 DADOS DE BIOINFORMÁTICA	38
5.2 ANÁLISE COMPARATIVA DO CRESCIMENTO BACTERIANO ISOLADO E EM CONSÓRCIO	54
5.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	57
5.4 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE	63
6. CONCLUSÃO	66

7.	PRETENSÕES FUTURAS	67
8.	REFERÊNCIAS:	68

1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas pertencentes à classe das serina hidrolases (E.C. 3.1.1.3) e desempenham um papel fundamental no metabolismo de lipídios, catalisando a hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres na interface óleo-água. Além disso, possuem a capacidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação, o que as torna extremamente versáteis para aplicações industriais. Essa flexibilidade catalítica é atribuída à sua estrutura única, que permite atuar tanto em meios aquosos quanto não aquosos, diferenciando-as de outras enzimas como as esterases (Shart e Elkhailil, 2020) (Pastore; Costa; Koblitz, 2003).

As lipases são amplamente utilizadas em diversas indústrias devido à sua especificidade e eficiência. Na indústria alimentícia, elas são empregadas na modificação de gorduras e óleos para melhorar a textura e o sabor dos alimentos (Liu *et al.*, 2025). Na indústria farmacêutica, essas enzimas são aplicadas na síntese de compostos bioativos e medicamentos (Degórska *et al.*, 2024). No setor químico, destacam-se na produção de biodiesel por meio da transesterificação de óleos vegetais (Passos *et al.*, 2024), enquanto na indústria de detergentes, são utilizadas para remover manchas de gordura (Golani, 2024). Além disso, sua aplicação na oleoquímica permite a produção de compostos de alto valor agregado, como ésteres e surfactantes (Gomes *et al.*, 2006).

Um dos aspectos mais relevantes desta enzima, segundo Gomes *et al.*, (2006), é sua contribuição para a solução de problemas ambientais. Elas desempenham um papel crucial na biorremediação, sendo capazes de degradar resíduos oleosos e gordurosos presentes em águas residuais e solos contaminados. Esse processo reduz significativamente o impacto ambiental causado por poluentes orgânicos persistentes. Além disso, pode ser protagonista na produção de biodiesel oferece uma alternativa sustentável aos combustíveis fósseis, diminuindo as emissões de gases do efeito estufa (Karaman *et al.*, 2024). Assim, as lipases não apenas promovem avanços industriais, mas também contribuem para a mitigação de problemas ambientais globais (Vaz e Choupina, 2012).

A utilização de óleos em fritura é uma prática comum em cozinhas industriais e domésticas, porém, o descarte incorreto desse resíduo pode trazer sérios problemas

ambientais. O óleo residual de fritura é considerado um resíduo poluente devido à sua alta toxicidade e baixa degradabilidade, o que pode causar impactos negativos ao meio ambiente, como a contaminação de solos e corpos d'água. Diante disso, a utilização de microrganismos que conseguem degradar este tipo de material é extremamente prospectada. Em comuns, estes tipos de microrganismos são produtores de enzimas lipolíticas, as lipases.

Considerando o elevado volume de produção de óleos vegetais, somente no Brasil já se registra a estatística de que, em 2020, foram produzidas 8,791 milhões de toneladas. Os impactos ambientais decorrentes do descarte inadequado desses resíduos, após o consumo e uso, podem ser significativos, o que reforça a necessidade de que mais estudos sejam direcionados para a busca urgente de métodos capazes de degradar esse material em menor tempo, a fim de mitigar os danos irreversíveis ao meio ambiente.

Sabendo que este quesito ambiental e resíduoário pode ser apenas mitigado, pretende-se demonstrar a produção de lipases por bactérias isoladas da biodiversidade do Amazonas, tendo como fonte de carbono o óleo residual de fritura. Além de agregar valor a este resíduo poluente, estas enzimas contribuirão para a proposição de novos produtos biotecnológicos com impacto no cenário industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bioprospecção

A Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), 1992, é um marco para o Brasil referente às políticas ambientais, econômicas e técnicas sustentáveis conforme o uso de recursos advindos da biodiversidade. Além disso, o Brasil possui uma estimativa de 15 a 20 % de toda a biodiversidade mundial e em meio a essa estimativa, existe uma proporção de riqueza desconhecida a qual deve existir uma biodiversidade de espécies ainda a serem descobertas.

A bioprospecção é o processo de busca, identificação e análise de organismos ou materiais biológicos com potencial para desenvolver produtos e processos úteis para o ser humano. É uma abordagem interdisciplinar que envolve biologia, química, genética, biotecnologia, entre outras áreas (Luz, 2014; Li, et al, 2018; Peixoto, 2021; Santos, 2021).

A importância da bioprospecção está no fato de que a biodiversidade é uma fonte inestimável de recursos para o desenvolvimento de novos produtos e processos. Através da bioprospecção, é possível identificar e estudar as propriedades biológicas e químicas de organismos e materiais biológicos, com potencial para uso em áreas como medicina, agricultura, alimentação, energia, biotecnologia, entre outras (Abreu, 2008; Peixoto, 2008; Sousa, 2012; Peixoto, 2021; Santos, 2021).

Esta abordagem também pode ser importante para a valorização dos recursos naturais e para a geração de renda para as comunidades locais, especialmente em países em desenvolvimento que possuem uma rica biodiversidade. No entanto, é importante que a bioprospecção seja realizada de forma responsável e ética, respeitando a propriedade intelectual e os conhecimentos tradicionais das comunidades envolvidas, e garantindo a conservação da biodiversidade (LI, et al, 2018; Peixoto, 2021; Santos, 2021).

Uma forma de garantir a bioprospecção responsável é através da implementação de acordos internacionais, como o Protocolo de Nagoya, que regula o acesso e a repartição de benefícios decorrentes da utilização dos recursos genéticos e conhecimentos tradicionais associados. Além disso, existem diversas iniciativas de pesquisa e

desenvolvimento em bioprospecção que buscam aliar a inovação tecnológica à sustentabilidade ambiental e social, como o uso de tecnologias limpas e processos ecologicamente amigáveis, e a valorização dos conhecimentos e práticas culturais locais (Luz, 2014; Li, et al, 2018; Peixoto, 2021; Santos, 2021).

Assim, a bioprospecção é uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novas soluções tecnológicas e de produtos inovadores, com potencial para gerar benefícios econômicos, sociais e ambientais. Neste contexto, a bioprospecção vem sendo desenvolvida para obtenção de diversos produtos de alto interesse e possuem constante crescimento no mercado, apenas o mercado de lipases tende a ter o crescimento de 8,8% até 2028 com faturamento de 961,85 milhões de dólares (Zambare, et al, 2021; Akram, et al, 2023).

2.2. Enzimas

As enzimas são conhecidas pela humanidade desde o final do século 17 conforme os estudos relacionados a secreções do estômago com a digestão de carne nos seres humanos (Paques; Macedo, 2006). O termo “enzima” vem do grego *em*, (em) + *zyme*, (levedura), de maneira que o nome enfatiza que a substância está sendo produzida pela levedura (Gomes, 2007; Borkhar, et al, 2009). Mesmo que depois tenha sido comprovado que não era uma levedura que estava associada à produção das secreções digestivas, este termo utilizado pela primeira vez pelo fisiologista alemão Wilhelm Kunhe foi mantido (Barbosa, et al, 2010).

As enzimas são biomoléculas, predominantemente de natureza proteica, que atuam como catalisadores biológicos em reações químicas. Elas são essenciais para a manutenção da vida, pois aceleram reações que, na ausência delas, ocorreriam em velocidades extremamente lentas (Garrido, et al, 2018; Barros, 2019; Souza, 2019). O principal mecanismo pelo qual as enzimas atuam é a diminuição da energia de ativação necessária para que uma reação química ocorra, permitindo que processos metabólicos essenciais sejam realizados de maneira eficiente (Bharati; Rajabakshmi, 2019; Chandra, et al, 2020; Zavarise; Pinotti, 2020).

Uma característica definidora das enzimas é sua especificidade em relação aos substratos, ou seja, cada enzima é projetada para atuar sobre um tipo específico de

molécula. Essa especificidade é determinada pela estrutura tridimensional da enzima, que permite a interação com o substrato de forma precisa (Glogauer, 2011; Sayali, et al, 2013; Luz, 2014; Oliveira, et al, 2014; AGUIAR, Et Al, 2018; LI, et al, 2018). Além disso, as enzimas não são consumidas durante as reações; após catalisar uma reação, elas permanecem inalteradas e podem ser reutilizadas repetidamente (Barros, 2019; Souza, 2019). Essa propriedade é fundamental para a eficiência das reações bioquímicas nos organismos vivos.

As enzimas também podem ser classificadas com base em suas funções e tipos de reações que catalisam. Por exemplo, as hidrolases atuam na quebra de ligações covalentes pela adição de água, enquanto as ligases promovem a formação de novas ligações entre moléculas. (Oliveira, 2014; Garrido et al., 2018) Outra categoria importante são as ribozimas, que são moléculas de RNA com atividade catalítica. Essas características tornam as enzimas componentes cruciais em processos biológicos e industriais, permitindo a realização de reações complexas sob condições controladas e contribuindo para a biotecnologia e a medicina (Aguiar, 2018; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

Estas biomoléculas são produzidas por diversos organismos vivos, desde os seres mais simples como as bactérias unicelulares até os mais complexos como animais e vegetais. E assim participam e atuam em processos metabólicos intra e extracelular, sendo chamados, portanto, de catalisadores biológicos, em oposição aos catalisadores químicos (Adetunji; Olamiran, 2021; Pimentel, et al, 2021;).

Como supracitado, essas proteínas com capacidade catalítica aceleram e controlam a velocidade de reações químicas específicas, sem serem consumidas no processo. A Tabela 1 elenca as classes de acordo com suas funções catalíticas, sendo esta classificação reconhecida internacionalmente pela União Internacional de Bioquímica (IUB) (Lehninger, 2014); McDonald & Tripton, 2023.

Essas moléculas são essenciais para a vida, pois participam de diversos processos biológicos, como a digestão de alimentos, a produção de energia, a síntese de proteínas e a replicação do DNA. Além de enzimas proteicas, alguns RNAs e DNAs também possuem atividade catalítica. Em geral, estas participam em processos de manutenção do material genético e atividade gênica (Barros, 2019; Souza, 2019; Pimentel, et al, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

CLASSES	FUNÇÕES CATALÍTICAS
1. Oxirredutases	Catalisam reações de oxidação-redução
2. Transferases	Enzimas que mediam a transferência de grupos funcionais de uma molécula a outra
3. Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise
4. Liasas	Catalisam reações de quebra de ligações, formando dupla ligação ou ainda catalisar a adição de grupos a duplas ligações
5. Isomerasas	Catalisam reações de mudança intramolecular em que um substrato é transformado em um produto isômero
6. Ligases	Catalisam a ligação covalente de moléculas com simultânea quebra de uma ligação de alta energia
7. Translocases	Catalisam o transporte de íons e moléculas através de membranas celulares

Quadro 1: Classificação das enzimas e suas funções catalíticas segundo IUB (Adaptado de Lehninger, 2014)

Barros (2019) explica que as enzimas proteicas possuem uma estrutura tridimensional específica, que é determinada pela sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica. Essa estrutura é fundamental para a atividade catalítica da enzima, pois é nela que ocorre a interação com o substrato, ou seja, a molécula que sofre a reação catalisada. Além disso, Pimentel et al., (2021) ressalta que as enzimas são altamente

reguladas, promovendo coordenação e controle das reações químicas, evitando desperdício de energia e reações indesejadas. (Souza, 2019; Bharati; Rajabakshmi, 2019; Chandra, et al, 2020; Zavarise; Pinotti, 2020; Adetunji; Olamiran, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

As enzimas são utilizadas em diversas aplicações industriais, como a produção de alimentos, bebidas, medicamentos, detergentes, biocombustíveis, entre outros. Além disso, as enzimas têm sido utilizadas em processos biotecnológicos, como a engenharia metabólica, que permite a modificação genética de organismos para a produção de moléculas de interesse. Embora as enzimas sejam altamente eficientes e específicas em suas funções, elas são sensíveis a fatores ambientais, como a temperatura, o pH, a concentração de substrato e a presença de inibidores ou ativadores específicos. Portanto, é importante entender as propriedades e limitações das enzimas para sua aplicação em diferentes processos industriais e biotecnológicos (Paques, Macedo, 2006; Gomes, 2007; Borkhar, et al, 2009; Barbosa, et al, 2010; Chandra, et al, 2020; Zavarise; Pinotti, 2020; Adetunji; Olamiran, 2021; Pimentel, et al, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

2.3. Lipases e características gerais

As lipases são enzimas hidrolíticas que catalisam a quebra de ésteres de ácidos graxos em glicerol e ácidos graxos livres (Oliveira, et al, 2014; Aguiar, et al, 2018). Os parâmetros utilizados para classificá-las eram conforme o fenômeno de ativação interfacial e a presença de uma “tampa” hidrofóbica, recobrando o sítio catalítico (Paques, Macedo, 2006; Barbosa, et al, 2010), porém esse critério pela tampa acabou sendo inadequado, pois nem todas as lipases se encaixavam nessa característica (Glogauer, 2011; Sayali, et al, 2013; Luz, 2014). Sendo assim, as lipases foram definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise (e síntese) de acil ésteres de cadeia longa que possuem comprimento de 10 átomos de carbono como os triacilgliceróis (Zavarise; Pinotti, 2020; Adetunji; Olamiran, 2021; Ren, 2021). São usados como substrato padrão de teste analítico e as lipases também conseguem degradar componentes de cadeia menor que 10 átomos de carbono comparados às esterases (Rigo, 2021; Santos, 2021).

A enzima lipase consegue catalisar reações inversas à hidrólise em condições mínimas ou até mesmo ausência de água, sendo estas reações de esterificação e transesterificação e todas essas reações podem ser exemplificadas conforme a Figura 1.

Pode-se observar que o sentido direto, direita para esquerda, representando a hidrólise, mostra o produto resultante da reação, já o sentido inverso, esquerda para direita, mostra a síntese.

Aqui já se percebe a multifuncionalidade das catálises da lipase pois a hidrólise pode ocorrer em diversas moléculas. A esterificação, interesterificação e transesterificação que transformam, incluem, ou reestruturam ésteres, respectivamente, em outras moléculas, é um exemplo clássico. Estas reações são bem difundidas nas indústrias de combustíveis, aromatizantes e alimentícia (Suganuma; Kataoka; Uehara, 2024).

Outras moléculas que participam das catálises são as dos álcoois, na alcoolise, os ácidos orgânicos, na acidólise e as aminas, na aminólise (Mouad et al., 2016). Nestas reações encontra-se, majoritariamente, reações de simples troca, em que um radical assume o posto da água deslocada, ou de dupla troca, quando há radicais mais complexos na reação, como pode se ver em dialcoois e triaminas.

Já a lactonização é a reação onde se obtém lactonas, moléculas de ésteres cíclicos de ácidos orgânicos – anel com grupo carbonila ($C=O$) - cuja preparação tradicional envolve catálise ácida, durante a condensação de álcool com ácido carboxílico (Uno et al., 2020).

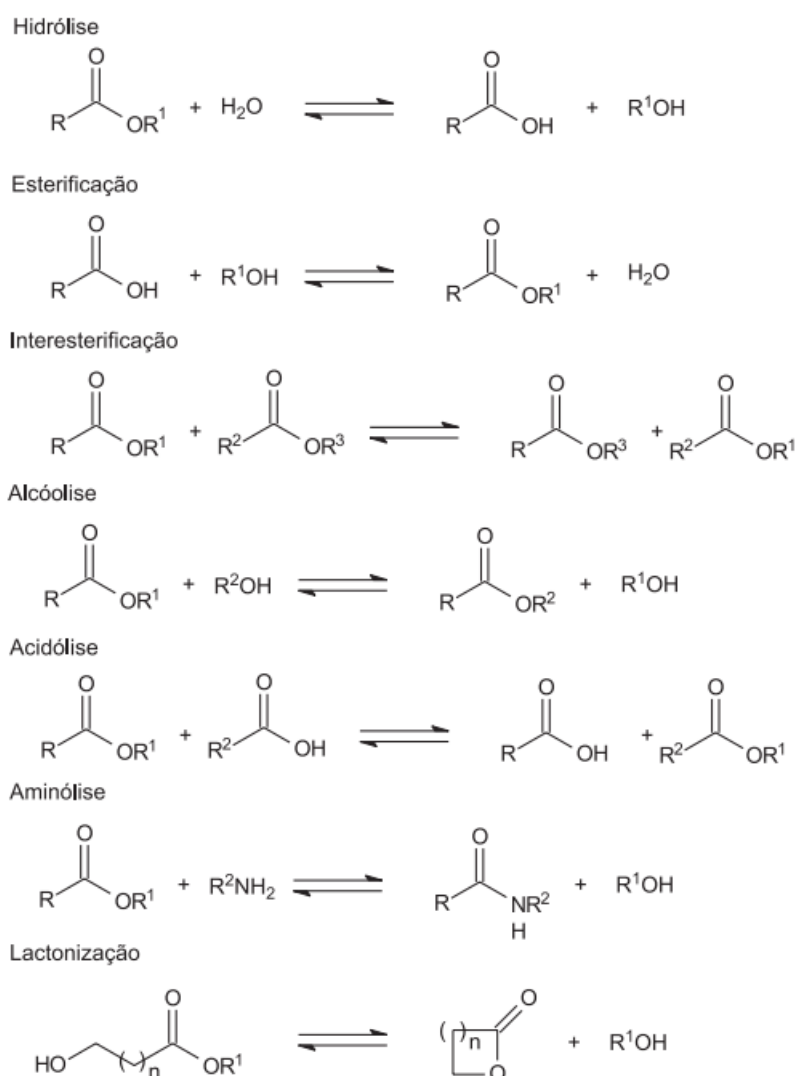


Figura 1: Reações catalisadas por lipases. O sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese). (Paques e Macedo, 2006; Luz, 2014).

As lipases são produzidas por uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais e possuem algumas características gerais que podem ser incluídas em 6 aspectos seguintes (Paques, Macedo, 2006; Gomes, 2007; Luz, 2014; Oliveira, et al, 2014; Aguiar, et al, 2018; Li, et al, 2018; Garrido, et al, 2018; Adetunji; Olamiran, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021):

1. Especificidade de substrato: As lipases têm uma alta especificidade de substrato e só podem quebrar ésteres de ácidos graxos com cadeias carbônicas específicas.

2. Reação reversível: A reação catalisada pela lipase é reversível, o que significa que ela pode catalisar a hidrólise e a síntese de ésteres de ácidos graxos.
3. Necessidade de cofatores: Algumas lipases requerem cofatores, como íons metálicos ou coenzimas, para a sua atividade catalítica.
4. Tolerância a solventes orgânicos: As lipases são capazes de trabalhar em meios orgânicos, o que lhes confere uma ampla aplicabilidade em processos industriais.
5. Estabilidade térmica: Algumas lipases são termoestáveis e podem manter sua atividade catalítica em altas temperaturas, o que as torna úteis em processos industriais de alta temperatura.
6. Função emulsificante: As lipases têm uma função emulsificante, permitindo que elas interajam com as gorduras e reduzam a tensão superficial entre as fases lipídicas e aquosas.

2.4. Características Estrutural da Lipase

As lipases são enzimas que possuem uma estrutura tridimensional característica, composta por uma região catalítica e uma região não-catalítica. A região catalítica é responsável pela atividade enzimática, enquanto que a região não-catalítica pode desempenhar diferentes funções, como a estabilização da estrutura tridimensional, a regulação da atividade enzimática e a interação com outras moléculas ou proteínas (Jaeger e Eggert, 2002; Luz, 2014; Lee, et al, 2015; Khan, et al, 2017; Sandoval, et al, 2017; Casas-Godoy, et al, 2018; Sarmah, et al, 2018; Enespa e Devendra, 2022).

A região catalítica das lipases é composta por um sítio ativo, que é responsável pela interação com o substrato e pela catálise da reação química. Esse sítio ativo geralmente é composto por um conjunto de resíduos de aminoácidos, como serina, histidina e ácido aspártico, que formam um triângulo catalítico, fundamental para a atividade da enzima. Conforme a base de dados desenvolvida por Murzin e colaboradores (1995), chamada SCOP – Structure Classification Of Protein (Classificação Estrutural de Proteínas), agrupa as proteínas conforme níveis hierárquicos como classe, dobra, superfamília e família. A classe é determinada

conforme a estrutura secundária e definida conforme as ligações das α -hélices e as folhas- β (Jaeger e Eggert, 2002; Luz, 2014; Lee, *et al.*, 2015; Khan, *et al.*, 2017; Sandoval *et al.*, 2017; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Sarmah *et al.*, 2018; Enespa e Devendra, 2022).

Além disso, a região catalítica das lipases pode apresentar diferentes domínios, como o domínio alfa/beta-hidrolase, o domínio dobrado beta e o domínio alpha-beta. Esses domínios contribuem para a estabilização da estrutura tridimensional da enzima e para a interação com outras moléculas ou proteínas. Essas estruturas variam conforme a fonte produtora da enzima, mas a família α/β hidrolases serve como padrão geral de estrutura convencional para a representação de lipases, conforme pode ser visto na figura 2 (JAEGER e EGGERT, 2002; Luz, 2014; Lee, *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2017; Sandoval *et al.*, 2017; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Sarmah *et al.*, 2018; Enespa e Devendra, 2022).

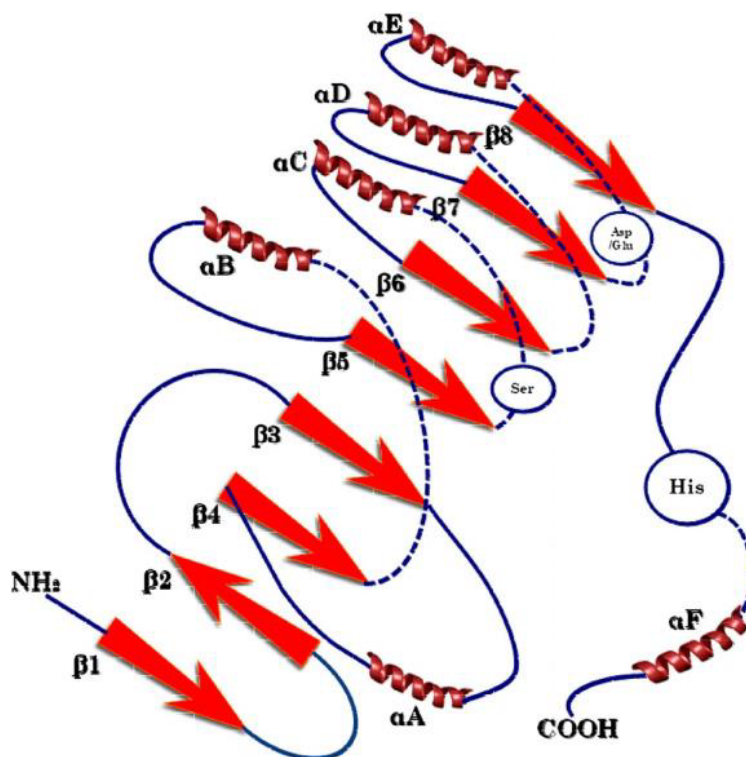


Figura 2: Esquema da estrutura convencional representativa da lipase. As α -hélices e as folhas- β são representadas pelas espirais vermelhas e flechas vermelhas, respectivamente. A localização da triada catalítica é indicada pelas esferas azuis (Ser-Asp / Glu-His). As linhas compreendem as interligações entre as folhas- β e as α -hélices, estas a partir da $\beta_3 - \beta_8$ (Akram *et al.*, 2023).

A região não-catalítica das lipases pode apresentar diferentes estruturas, como os domínios de ligação ao substrato, que são responsáveis pela interação da enzima com

membranas celulares e com os lipídeos, os domínios de ancoragem à superfície, que ancoram a enzima na superfície da membrana celular, e os domínios regulatórios, que podem ativar ou inibir a atividade enzimática. Além disso, as lipases são geralmente compostas por uma única cadeia polipeptídica, mas também podem formar complexos multienzimáticos ou oligoméricos, que contribuem para a regulação da atividade enzimática e para a interação com outras proteínas (Casas-Godoy *et al.*, 2018; Sarmah *et al.*, 2018; ENESPA e DEVENDRA, 2022).

A “tampa” é uma característica estrutural de muitas lipases e normalmente é composta por uma α -hélice que cobre o sítio ativo na ausência de um substrato. Uma maneira dessa tampa se mover para deixar o sítio ativo exposto da enzima é o contato com a interface água-lipídio, promovendo o consumo do substrato. Pela figura 3, observa-se a estrutura molecular em 3D da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* mostrando as conformações de α -hélices, folhas- β , a “tampa” e o sítio ativo (Jaeger e Eggert, 2002; Luz, 2014; Enespa e Devendra, 2022).

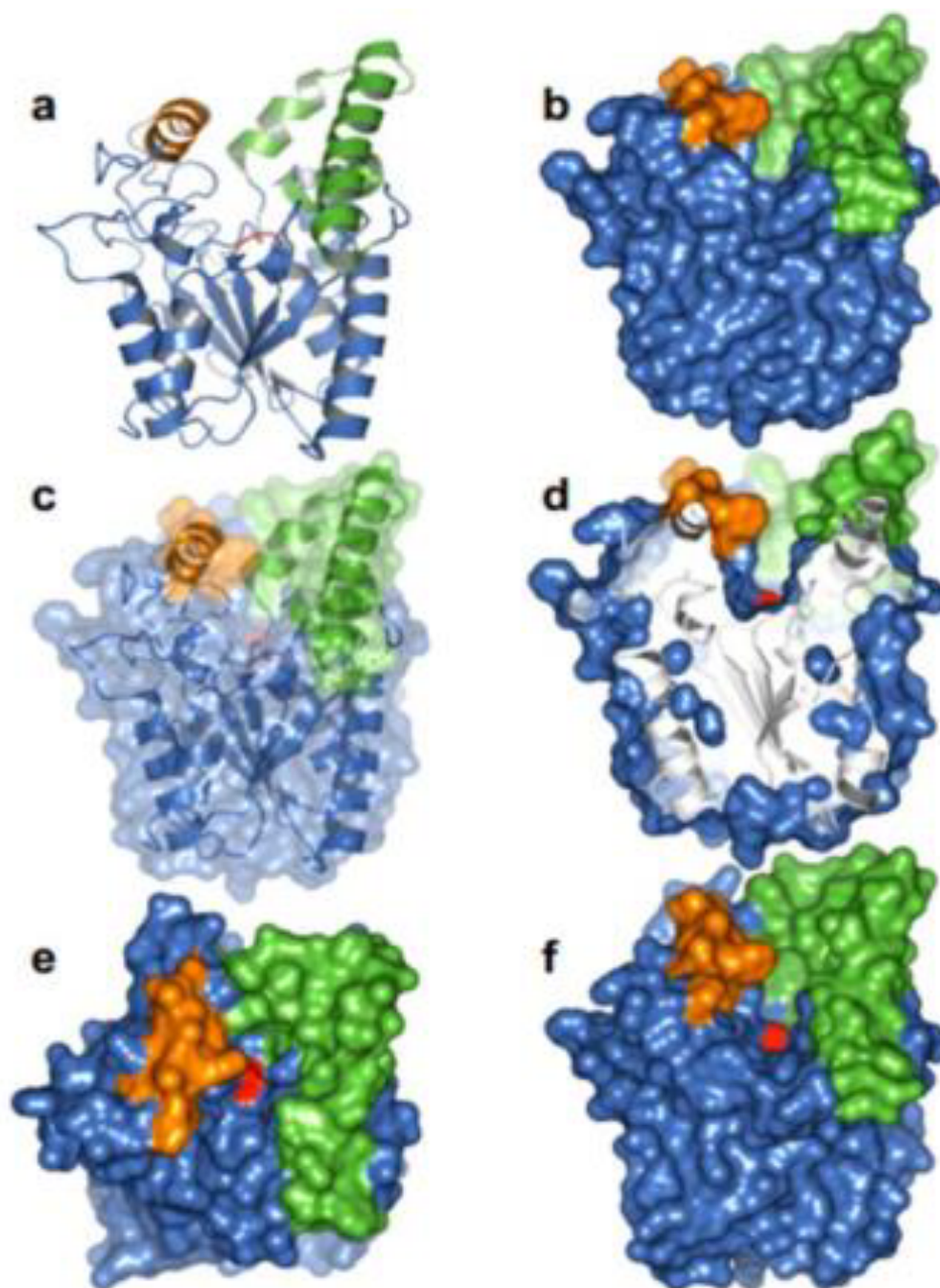


Figura 3: Estruturação molecular no formato 3D da enzima lipase da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Observando diferentes perspectivas: A “tampa” está sendo representada em verde e laranja. (a) Representação das conformações α -hélices e folhas- β . (b) Perspectiva da superfície da molécula. (c) Sobreposição das perspectivas (a) e (b). (d) Corte transversal da estrutura (c) podendo compreender o contorno e a profundidade do sítio catalítico. (e) e (f) Demonstração do sítio catalítico visto por uma perspectiva superior, com a serina catalítica em vermelho (Glogauer, 2011).

A compreensão dessa estrutura é fundamental para o estudo da atividade enzimática e para a sua aplicação em diferentes processos biotecnológicos, incluindo os de escalas industriais.

2.5. Mecanismo Catalítico

Como visto, as lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de ácidos graxos e alcóois, que são encontrados em triglicerídeos, fosfolipídios, colesterol esterificado e outros lipídeos. O seu sítio ativo é composto pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu (Luz, 2014; Lee *et al.*, 2015). Esta tríade é semelhante ao observado em serino proteases, devido a essa semelhança o mecanismo catalítico para lipases segue o modelo proposto para a quimiotripsina, uma serino protease que possui o mecanismo catalítico envolvendo três etapas principais: acilação, isomerização e desacilação (Sandoval *et al.*, 2017; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Sarmah *et al.*, 2018).

Na etapa de acilação, a lipase interage com o substrato e forma um complexo enzima-substrato. O substrato é posicionado no sítio ativo da enzima e o grupo hidroxila da serina da tríade catalítica atua como nucleófilo, atacando o carbono do grupo carbonila do substrato. Isso resulta na formação de um intermediário acil-enzima. Na etapa de isomerização, o intermediário acil-enzima sofre uma mudança conformacional, levando à sua isomerização para uma forma mais estável. Isso permite a exposição do grupo carbonila do substrato para o próximo passo da reação (Luz, 2014; Lee *et al.*, 2015; Sandoval *et al.*, 2017; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Sarmah *et al.*, 2018).

Na etapa de desacilação, a água é adicionada ao complexo enzima-substrato, que leva à hidrólise do éster, resultando na liberação do ácido graxo livre e do glicerol. A água é ativada por um segundo resíduo de serina no sítio ativo da enzima, que age como um ácido, doando um próton para a molécula de água, gerando um íon hidroxila, que atua como um nucleófilo e ataca o carbono do intermediário acil-enzima. Isso resulta na liberação do ácido graxo e na regeneração da enzima (Luz, 2014; Lee *et al.*, 2015; Sandoval *et al.*, 2017; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Sarmah *et al.*, 2018).

Em resumo, o mecanismo catalítico das lipases envolve a formação de um complexo enzima-substrato, a acilação do substrato, a isomerização do intermediário acil-enzima e a desacilação do éster, resultando na liberação do ácido graxo livre e do glicerol e esse processo catalítico pode ser observado pela figura 4.

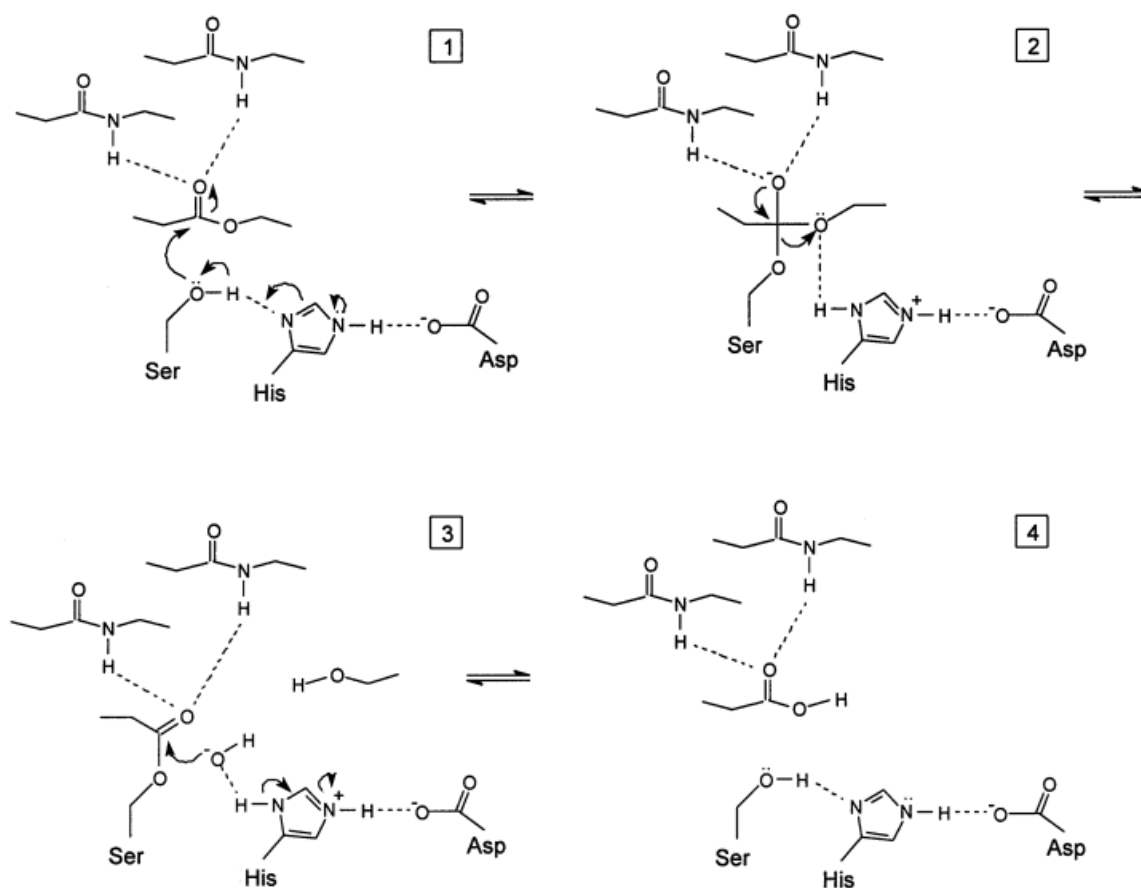


Figura 4: Mecanismo catalítico proposto para lipases. (Jaeger et al., 1999; Luz, 2014).

Este mecanismo é mais difundido, proposto por Jaeger, em 1996, elucidado por Luz (2014) envolvendo quatro passos principais que descrevem a hidrólise de ligações éster em triacilgliceróis:

Em [1], o primeiro passo do mecanismo, a serina, um dos aminoácidos da tríade catalítica, é ativada por desprotonação. Essa ativação acontece num meio aquoso, onde a histidina adquire caráter de base, aceitando o próton da hidroxila da serina. Esta desprotonação aumenta a nucleofilicidade do oxigênio da serina, tornando-o mais reativo, atacando a carbonila do grupo éster, no substrato. Forma-se, então um intermediário tetraédrico, onde a serina se liga à carbonila do complexo acil-enzima.

No segundo passo [2], o intermediário tetraédrico se estabiliza por interações com grupo amida dos resíduos de aminoácidos adjacentes. Nesta fase, o anel imidazólico da histidina se protona, imbuindo-se de energia positiva, estabilizando o

intermediário, negativamente carregado pela hidroxila. Este estado intermediário é crucial para a transição entre os estados de ligação e liberação dos produtos da reação.

Já na terceira etapa [3], a ligação entre serina e o grupo acil do substrato se rompem. Essa ruptura culmina na liberação de um álcool. A enzima agora está na forma de um complexo acil-enzima, onde o grupo acil permanece ligado à serina.

Finalmente, na parte [4] da reação, um segundo ataque nucleofílico ocorre, através do íon hidroxila (OH^-) do meio aquoso, já mencionado. Este ataque promove a liberação de um ácido graxo e na regeneração da forma ativa da lipase. A enzima termina se regerando e os produtos liberados no meio.

2.6. Fontes de Lipase

As lipases podem ser encontradas em uma variedade de fontes, incluindo organismos microbianos, tais como bactérias, fungos e leveduras. Alguns microrganismos são particularmente bons produtores de lipases e são frequentemente utilizados na produção comercial de enzimas. Entre as plantas produtoras de lipases, estão a mamona, milho, soja e amendoim. Nos animais que possuem enzimas lipolíticas, estas são localizadas nos tecidos, incluindo o pâncreas, intestinos, fígado e tecido adiposo (Chandra *et al.*, 2020; Zavarise e Pinotti, 2020; Adetunji e Olamiran, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

Além dessas fontes naturais, as lipases também podem ser produzidas por meio de engenharia genética em sistemas de expressão heteróloga, utilizando microrganismos ou células animais para produzir grandes quantidades de enzima em escala comercial. A Tabela 2 apresenta exemplos de lipases obtidas por fontes bacterianas, fúngicas, vegetais e animais e suas características bioquímicas.

As propriedades de especificidade, termoestabilidade e o pH ótimo varia conforme a fonte de obtenção da enzima (Garrido *et al.*, 2018; Ren, 2021). Visando a área econômica no processo industrial, as lipases produzidas por microrganismos obtidas por meio de fermentação são mais compensadoras e rentáveis por causa da grande quantidade de produto em tempo relativamente curto (Barros, 2019; Chandra *et al.*, 2020; Rigo, 2021;), não dependência de condições ambientais e geográficos

sazonais e gasto reduzido no uso de matérias primas de origem natural e/ou resíduos de outros processos. (Adetunji e Olamiran, 2021; Santos, 2021).

Organismo/ Espécie	Origem da lipase	pH	Temp (°C)	Massa Molecular (kDa)	Referência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteriana	6,9 - 8,0	30 - 60	29 - 30	(Borkar et al., 2009); (Mobarak-Qamsari; Kasra-Kermanshahi; Moosavi-Nejad, 2011); (Bisht; Yadav; Dammwal, 2013); (Noormohamadi et al., 2013); (Zouaoui; Abboui; Ghalem, 2012); (Harmansyah et al., 2018); (Aktar e Saha, 2023)
<i>Thermobifida fusca</i>	Bacteriana	6,0 - 8,0	36,5 - 60	30 - 34	(Rhee et al., 2005); (Zaimudin et al., 2019); (Atanasova et al., 2023)
<i>Bacillus sp.</i>	Bacteriana	7,0 - 10,0	20 - 75	20 - 33	(Barbosa et al., 2012); (Bora e Bora, 2012); (Iqbal e Rehman, 2015); (Yasemin; Arabaci; Güvenmez, 2017); (Shart e Elkhail, 2020); (Demirkan; Aybey Çetinkaya; Abdou, 2021); (Akhter et al., 2022)
<i>Aspergillus sp.</i>	Fúngica	5,0 - 9,0	30 - 70	~ 37	(Milan et al., 2007); (Farias, 2013); (Reinehr, 2015); (Macedo e Pastore, 1997); (Martins, 2021)
<i>Candida rugosa</i>	Fúngica	6,5 - 8,0	30 - 50	36 - 45	(Castro et al., 2004); (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004);
<i>Rhizopus oryzae</i>	Fúngica	5,6 e 7,0	50	37,5	(Koblitz e Pastore, 2006); (Zavarise e Pinotti, 2021);
<i>Citrus sinensis</i>	Vegetal	6,0 - 10,0	20 - 70	não especificado	(Delgado, 2014)
<i>Carica papaya</i>	Vegetal	8,0	45	40	(Paques e Macedo, 2006)
<i>Triticum aestivum</i>	Vegetal	8,0	45	não especificado	(Paques e Macedo, 2006)
<i>Homo sapiens</i>	Animal	8,0	37	45 - 50	(Costa e Amorim, 1999)
<i>Sus scrofa</i>	Animal	8,9	30 - 60	não especificado	(Bagi; Simon; Szajáni, 1997)
<i>Bos taurus</i>	Animal	6,5	40	50	(Sundheim; Zimmer; Astrup, 1983)

Tabela 1: Parâmetros ótimos de lipases conforme a fonte bacteriana, fúngica, vegetal e animal.

As lipases vegetais estão presentes nos tecidos de reserva alimentar que possuem grande quantidade de triacilgliceróis. Logo a lipase hidrolisa os triacilgliceróis em ácidos graxos e gliceróis, que por meio de reações biológicas, posteriormente serão convertidos em fonte de energia e açúcares solúveis. Este processo possui tamanha importância na etapa de germinação que é a etapa de maior necessidade de energia para o desenvolvimento do embrião. Durante a germinação gerará fontes de carbono que por proporcionar alta demanda energética irá construir a estrutura da muda fotossinteticamente ativa. Dentre as várias lipases vegetais a temperatura ótima varia entre 25 a 60 °C e a massa molecular varia de 40 a 143 kDa.

As lipases animais são raramente estudadas uma vez que as microbianas conseguiram melhor destaque, mas quando estudadas e isoladas, foram obtidas de insetos, peixes e mamíferos, por exemplo. As lipases animais são importantes na

digestão de lipídios e principalmente porque o organismo não consegue solubilizar estes componentes e assim facilita o processo de absorção das biomoléculas. As lipases animais apresentam um pH ótimo variando de 4,5 a 9, temperatura ótima de 15 a 40 °C e massa molecular de 10 a 240 kDa (Bagi; Simon; Szajáni, 1997).

As lipases microbianas se dividem entre os fungos filamentosos, leveduras e bactérias. As lipases microbianas são produzidas conforme a indução por substâncias extracelulares. Sua indução pode ser obtida utilizando componentes de cadeia carbônica longa como os óleos, gorduras e polissorbato (Tween) que são fontes de carbono padrões utilizados em laboratório. Os principais produtores de lipases fúngicas são *Aspergillus sp*, *Candida sp*, *Mucor sp*, *Rhizopus sp* e características de pH ótimo por volta de 4 a 11, temperatura de 25 a 60 °C e massa molecular de 27 a 120 kDa (Zavarise e Pinotti, 2020; Adetunji e Olamiran, 2021; Pimentel *et al.*, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

As lipases bacterianas são amplamente estudadas devido à sua versatilidade catalítica e ao potencial de aplicação em diversos processos industriais. Existem diversos produtores de lipases bacterianas, mas o gênero *Pseudomonas sp* conseguiu um destaque maior na produção por ser um dos primeiros a serem descobertos como produtores de lipases e possuem alto rendimento. Outros gêneros também conseguiram destaque como *Achromobacter sp*, *Alcaligenes sp*, *Staphylococcus sp* e *Chromobacterium sp*. As lipases bacterianas possuem o pH ótimo em uma ampla faixa, de 4 a 10, temperatura entre 27 a 80 °C e a massa molecular de 11 a 176 kDa (Luz, 2014; Oliveira *et al.*, 2014; Aguiar *et al.*, 2018; Garrido *et al.*, 2018; Barros, 2019; Souza, 2019; Bharati; Rajabakshmi, 2019; Adetunji e Olamiran, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

2.7. Produção Enzimática

A produção enzimática a partir de microrganismos é um processo complexo que envolve vários fatores, incluindo a seleção do microrganismo produtor de enzima, as condições de cultivo, a extração da enzima e a purificação. O primeiro passo na produção de enzimas microbianas é a seleção de um microrganismo produtor de enzima. Isso pode ser feito por meio de triagem de amostras ambientais ou isolamento de

microrganismos conhecidos por produzir a enzima desejada. Uma vez identificado o microrganismo produtor, ele deve ser cultivado em um meio de cultura adequado para produção de enzima, que deve ser otimizado para maximizar a produção. As condições de cultivo, como pH, temperatura, agitação, aeração e nutrientes, devem ser ajustadas para fornecer o ambiente ideal para o crescimento e produção de enzima do microrganismo. Isso pode ser realizado por meio de experimentação em pequena escala e otimização das condições de cultivo (Pinotti, 2020; Adetunji e Olamiran, 2021; Pimentel *et al.*, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

Após o crescimento do microrganismo produtor, a enzima é extraída do meio de cultura ou do próprio microrganismo. A extração pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo precipitação, centrifugação, filtração e ultrafiltração. Por fim, a enzima deve ser purificada para remover quaisquer contaminantes e obter uma preparação de alta pureza. Isso pode ser feito por meio de vários processos de purificação, como cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão molecular, entre outros (Pinotti, 2020; Adetunji e Olamiran, 2021; Pimentel *et al.*, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

O processo de produção de enzimas microbianas pode ser desafiador e requer habilidades técnicas e conhecimento especializado em microbiologia, bioquímica e processos de produção industrial. No entanto, as enzimas produzidas a partir de microrganismos são amplamente utilizadas em várias indústrias, incluindo alimentos, farmacêutica, têxtil, papel e biotecnologia.

2.8. Especificidade e as Aplicações Industriais

A lipase para se tornar uma biomolécula de alto valor agregado, é necessário avaliar a sua especificidade, seu rendimento de processo, possibilidade de purificação, estabilidade e destes fatores é importante destacar a relação hidrolítica do substrato, de maneira que as lipases sejam divididas em (Chen e Sih, 1989; Luz, 2014; Sandoval *et al.*, 2017; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Sarmah *et al.*, 2018; Adetunji e Olamiran, 2021; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021):

- 1) Lipases regiosseletivas: aquelas que possuem especificidade em relação à posição, ou seja, a enzima tem habilidade de distinguir entre as duas posições

externas do triacilglicerol (éster primário) e a posição interna (éster secundário). Elas são subdivididas em:

- a) Lipases não específicas: hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos das posições *sn*-1 (3) ou *sn*-2;

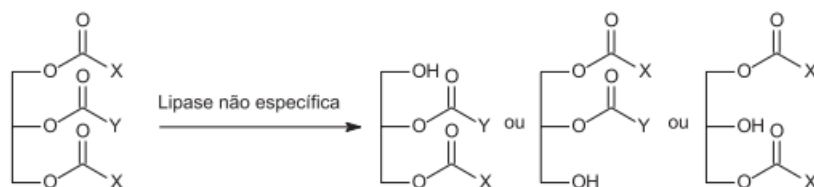


Figura 5: Reações catalisadas por lipases do tipo não específica (CHEN; SHI, 1989).

- b) Lipases 1,3-específicas: hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, nas posições *sn*-1 ou *sn*-3, havendo casos reportados na literatura de lipases que hidrolisam apenas a posição 2;

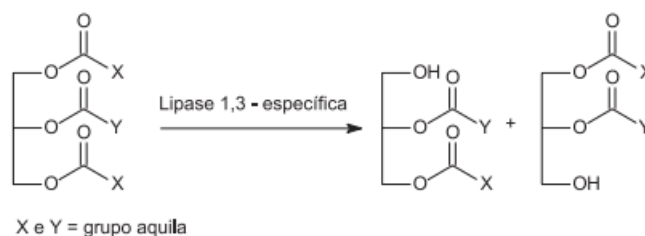


Figura 6: Reações catalisadas por lipases do tipo 1,3 específica (CHEN; SHI, 1989)

- 2) Lipases tipo-seletivas: apresentam especificidade com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturações do grupo acila;

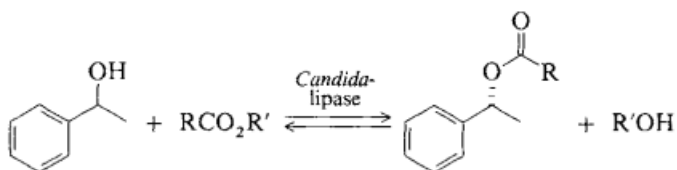


Figura 7: Acilação utilizando lipase enantiosseletiva no phenethanol (Chen e Shi, 1989).

3) Lipases enantiosseletivas: apresentam a capacidade de discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica. Tal especificidade da lipase pode mudar com o substrato e esta mudança pode ser relacionada à natureza química do éster.

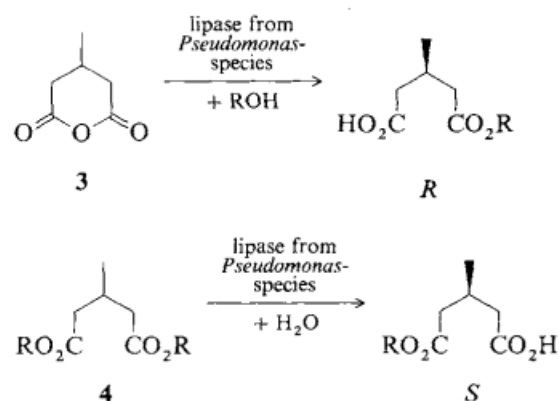


Figura 8: Lipase na etapa de acilação seletiva de enantiômero óptico de anidro em meio com solvente orgânico (3) e hidrólise no diéster em meio aquoso (4). Observado assim a interferência do meio ao tipo de molécula que a lipase tende a manifestar a ação catalítica (CHEN; SHI, 1989).

A síntese de enzimas recombinantes com propriedades bioquímicas e catalíticas aprimoradas por engenharia de proteínas é crucial para o uso de lipases como catalisadores industriais. A descoberta de métodos para utilização desses métodos em escala industrial possibilitou uma grande diminuição no custo da lipase, o que incentivou a criação de diversos usos industriais. As enzimas criadas por microrganismos geneticamente modificados e vendidas pela empresa Novozymes são mostradas na Tabela 3. (Barbosa *et al.*, 2010; Glogauer, 2011; Sayali *et al.*, 2013; Luz, 2014; Oliveira *et al.*, 2014; Aguiar *et al.*, 2018; Garrido *et al.*, 2018; Ren, 2021; Rigo, 2021; Santos, 2021).

Nome comercial	Aplicação principal
Lecitase ® Novo	Indústria de óleos e gorduras
Lecitase ® Ultra	Indústria de óleos e gorduras
Lipopan ®	Indústria de panificação

Lipozyme ®	Indústria de óleos e gorduras
Noopazyme ®	Pastas e macarrão
Palatase ®	Indústria de laticínios
Greasex ®	Indústria de couro
Lipex ®	Indústria de detergentes
Lipolase ®	Indústria de detergentes
NovoCor ® ADL	Indústria de couro
Novozym ® 388	Biocatálise
Novozym ® 435	Biocatálise
Novozym ® 525 F	Biocatálise
Novozym ® 735	Indústria têxtil
Novozym ® 871	Indústria de alimentos para animais de estimação
Novozym ® 51032	Indústria de papel
Resinase	Indústria de papel

Quadro 2: Aplicação comercial de cada tipo de lipase proposta pela marca Novozymes (Luz, 2014).

Um resumo da aplicação das lipases na indústria está apresentado na tabela 4:

Tipos de reações	Áreas de aplicação	Aplicações	Produtos
Hidrólise	Alimentos (Laticínios)	Hidrólise de gorduras do leite.	Aromas para queijos e derivados
Química (processamento de óleos)	Hidrólise de óleos e gorduras.	Ácidos graxos, diglicerídeos e	Linha de processo

		monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídeos)	
Química (detergentes)	Remoção de manchas de óleos.	Detergentes usados em lavanderias e domésticos	Linha de processo
Esterificação	Indústria fina geral	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres emulsificantes
Indústria alimentícia	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras e flavorizantes	Linha de processo
Indústria farmacêutica	Síntese de intermediários de medicamentos	Anti-inflamatórios	Linha de processo
Transesterificação	Indústria fina	Transesterificação de óleos vegetais	Produção de Biodiesel

Quadro 3: Aplicações das lipases conforme a reação catalisadora.

Fonte: Adaptado de Majumder *et al.*, (2024); Passos *et al.*, (2024); Ahmed *et al.*, (2024) e Suganuma *et al.*, (2024).

Conforme evidenciado no Quadro 3, a separação por linha de processo permite identificar nichos de aplicação e entrelaçar indústrias a ponto de que uma enzima poderia conforme o ataque hidrolítico realizar a conformação do produto esperado. Tal versatilidade confere às lipases um potencial significativo de aplicação em diversos setores, como as indústrias química, de biodiesel, farmacêutica e a alimentícia. (Degórska *et al.*, 2024, Liu *et al.*, 2025)

Paralelamente, é pertinente considerar a inter-relação entre enzimas lipolíticas e os parâmetros de produtividade no contexto comercial, analisando aspectos como rendimento, estabilidade catalítica, aplicabilidade e as correlações moleculares envolvidas nos processos (Ahmed *et al.*, 2024; Passos *et al.*, 2024).

2.9. Panorama de aplicação de lipases em matrizes oleosas

No Brasil, os resíduos oleosos representam um grave problema ambiental, originados principalmente da indústria do petróleo e do descarte inadequado de óleo de cozinha. A exploração, produção e tratamento de petróleo geram grandes quantidades de resíduos oleosos, como borras, lodos de estações de tratamento e materiais de limpeza, classificados como resíduos perigosos (Classe I) devido à presença de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, além de metais pesados (Melo; Coriolano; Araújo, 2018). O descarte incorreto desses resíduos contamina o solo, a água (superficial e subterrânea) e o ar, prejudicando a vida aquática, a saúde humana e a produtividade agrícola (Corrêa *et al.*, 2018). Um único litro de óleo pode contaminar até um milhão de litros de água, criando barreiras que impedem a entrada de luz e a oxigenação.

O descarte inadequado de resíduos oleosos no Brasil configura uma crise ambiental de proporções alarmantes, cujos efeitos deletérios se manifestam em múltiplos níveis. Ignorar a magnitude deste problema equivale a fechar os olhos para a degradação progressiva de ecossistemas vitais e para o aumento da exposição da população a substâncias tóxicas. A fonte primária deste desafio reside na indústria do petróleo, um setor estratégico para a economia nacional, mas cuja produção gera inevitavelmente volumes significativos de borras, lodos e outros resíduos contaminados com hidrocarbonetos (Melo; Coriolano; Araújo, 2018). A esses, somam-se os resíduos provenientes de estabelecimentos comerciais e residenciais, onde o óleo de cozinha

usado, em vez de ser reciclado, frequentemente encontra seu destino nas redes de esgoto ou, pior ainda, diretamente no solo (Albino e Argolo, 2021).

Os resíduos oleosos, quando descartados no solo, comprometem sua estrutura e fertilidade, além de contaminar lençóis freáticos. A queima desses resíduos libera emissões tóxicas que causam doenças respiratórias (Almeida *et al.*, 2023). No ambiente aquático, a presença de óleo causa a mortandade de peixes, contaminação por metais pesados e degradação de áreas de preservação ambiental. A gestão inadequada desses resíduos é um desafio complexo, agravado pela falta de treinamento e de consciência ambiental (Melo; Coriolano; Araújo, 2018).

As consequências desse descaso são multifacetadas e de longo alcance. Nos corpos hídricos, a presença de óleo forma barreiras impermeáveis que impedem a penetração da luz solar, essencial para a fotossíntese e, consequentemente, para a manutenção da vida aquática. A redução do oxigênio dissolvido, provocada pela decomposição do óleo, leva à asfíxia de peixes e outros organismos, desequilibrando a cadeia alimentar e comprometendo a biodiversidade. A contaminação do solo, por sua vez, afeta a fertilidade, impede o crescimento de plantas e facilita a lixiviação de compostos tóxicos para os lençóis freáticos, contaminando fontes de água potável. Além disso, a queima de resíduos oleosos libera gases poluentes que contribuem para o aquecimento global e para o aumento da incidência de doenças respiratórias na população.

Diante desse cenário sombrio, as lipases emergem como uma ferramenta biotecnológica promissora para reverter esse quadro. Essas enzimas, capazes de catalisar a quebra de gorduras e óleos, oferecem uma alternativa sustentável e eficiente aos métodos tradicionais de tratamento de resíduos oleosos, que frequentemente envolvem processos químicos agressivos ou incineração, gerando ainda mais poluição (Melo; Coriolano; Araújo, 2018). A aplicação de lipases em processos de biorremediação pode degradar os resíduos oleosos em componentes menos nocivos, como ácidos graxos e glicerol, que podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de bioprodutos, como bioplásticos e biodiesel. Essa abordagem não apenas reduz o impacto ambiental dos resíduos oleosos, mas também promove a economia circular, transformando um problema em oportunidade (Monte *et al.*, 2015). O desenvolvimento e a implementação de tecnologias baseadas em lipases representam,

portanto, um passo crucial para a construção de um futuro mais limpo e sustentável no Brasil (Honório, 2021).

3. Objetivo

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de lipases por bactérias isoladas da biodiversidade amazônica

3.2 Objetivo Específico

- (I) Identificar genes codificadores para lipase no consórcio A3;
- (II) Avaliar produção de lipases por bactérias cultivadas na presença de óleo residual de fritura como fonte de carbono.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do projeto seguiu a metodologia explicada no fluxograma descrito na figura 9.

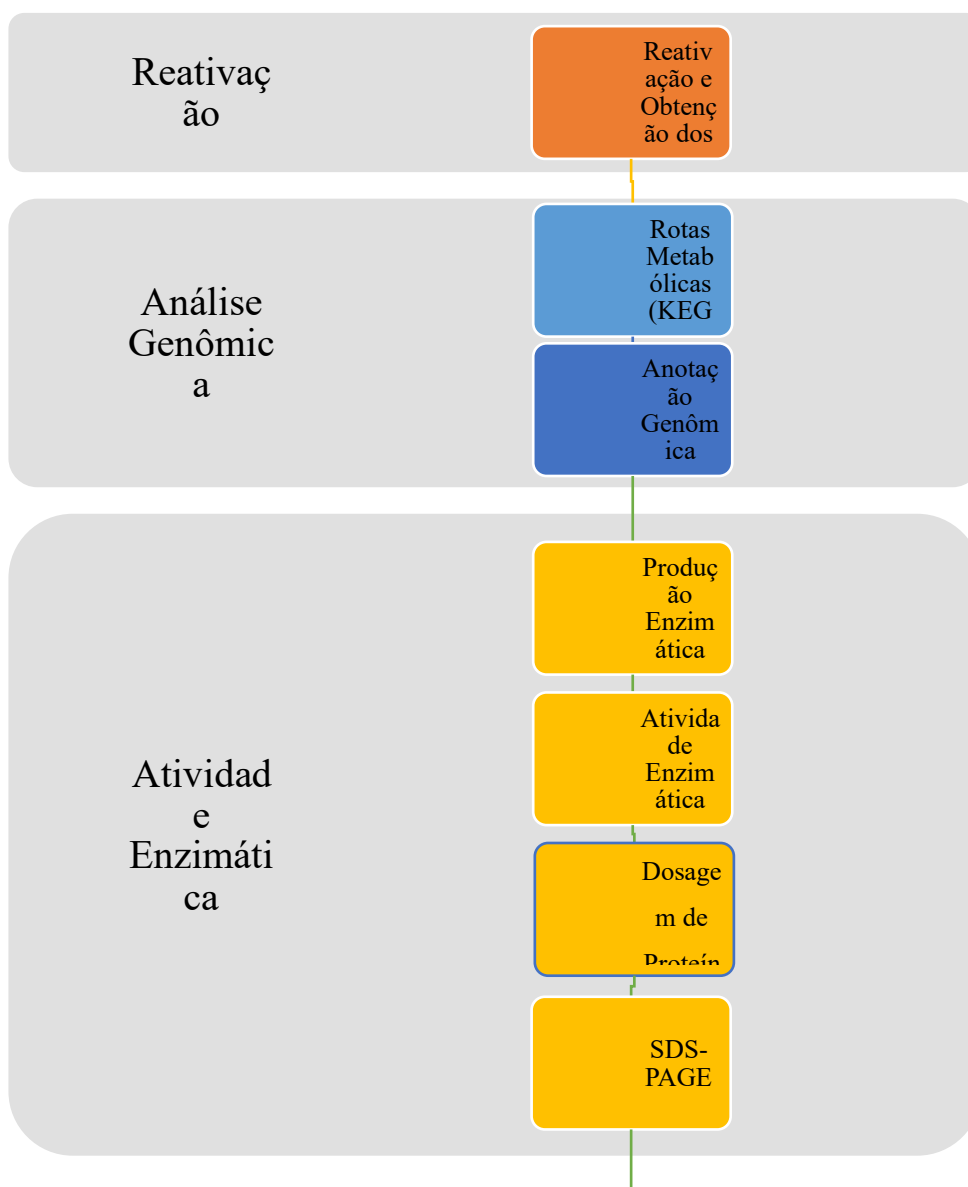


Figura 9: Estratégia experimental do projeto resumida em 4 etapas macro e suas respectivas subetapas.

4.1 Obtenção dos microrganismos

4.1.1 Resultados Anteriores

Este trabalho é um desdobramento de estudos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Proteômica (LAPROT). As coletas de bactérias foram realizadas nas

proximidades do porto do Ceasa, Rio Negro, na Cidade de Manaus, em áreas com histórico de contaminação com combustíveis derivados de petróleo conforme é ilustrado na figura 10 (SANTOS, 2021). As bactérias integrantes do consórcio a ser avaliado neste trabalho (identificado por A3) encontram-se preservadas em meio Bushnell Haas/ágar (BH/Ágar) (0,75 %) suplementado com diesel a 1 % e mantidas em temperatura ambiente, no Laboratório de Proteômica do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFAM. O genoma de cada bactéria do consórcio A3 foi sequenciado e seu genoma está em fase de análise (dados não publicados). As três cepas bacterianas que integram o consórcio A3 foram identificadas como *Acinetobacter seifertii*, *Achromobacter xylosoxidans* e uma espécie nova do gênero *Pseudomonas* (dados não publicados). Tanto cultivadas em consórcio quanto como culturas puras, todas as cepas têm capacidade de usar o diesel como fonte de carbono. Resultados obtidos por análise proteômica indicaram a presença de vias metabólicas envolvidas com a degradação de diferentes compostos lipídicos (SANTOS, 2021).



Figura 10: Área de coleta dos consórcios bacterianos. Porto do Ceasa, Rio Negro, Manaus-AM. Consórcios A1, A2, A3 e A4 coletados em 31 de agosto de 2018 (após derramamento de óleo na região). Consórcio A5 coletado em 15 de novembro de 2015.

Fonte: SANTOS (2021).

A coleta e uso das amostras bacterianas utilizadas neste trabalho foram autorizadas pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional

Associado (SisGen, AE18A6B). As amostras utilizadas não são classificadas como ameaçadas ou protegidas.

4.1.2 Microrganismos selecionados

Os microrganismos selecionados para a avaliação foram os integrantes do consórcio A3, *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter seifertii* e *Pseudomonas sp.* Todos os procedimentos de cultivo e atividade enzimática foram realizados com as linhagens puras e na forma de consórcio.

4.2 Identificação filogenômica

Foram utilizadas 3 sequências genômicas obtidas pelo grupo de pesquisa Proteômica e Bioprospecção no Amazonas, do laboratório de proteoma (LAPROT), a partir das bactérias isoladas do consórcio A3. A identificação das linhagens em nível de espécie foi realizada com base no genoma completo com o auxílio da plataforma TYGS (<https://tygs.dsmz.de>) para comparação com as espécies tipo já caracterizadas. A partir das espécies mais relacionadas identificadas no TYGS, foi obtido o cálculo do dDDH na fórmula d2 com base na Calculadora de Distância Genoma por Genoma (*Genome-to-Genome Distance Calculator*) -GGDC- 3.0 (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>), em que a distância de DNA por DNA Híbrido (dDDH) > 70% é considerado da mesma espécie (Meier-Kolthoff et al., 2021). Além do dDDH, as análises taxonômicas também foram avaliadas com base em algoritmos para Identificação Média de Nucleotídeos (*Average Nucleotide Identity*) -ANI (Lee et al., 2015), em que valores de ANI >95% são indicativos de espécies conhecidas.

4.3 Anotação genômica e observação de rotas metabólicas

Foram utilizadas ferramentas de bioinformática a fim de buscar por genes codificadores para a enzima degradadora de lipídios: lipases. Para esta etapa foram utilizadas as ferramentas de busca RAST: <https://rast.nmpdr.org/> (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (SOUSA, 2020) e rotas metabólicas foram preditas através de buscas no banco de dados KEGG – Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Ogata et al., 1999; OLIVEIRA, 2018). Através da ferramenta Anotação de Leitura Dinâmica e Metabolismo (Dynamic Read Annotation and Metabolism) -DRAM para a anotação e utilizando a plataforma

KBase foi possível realizar a busca de genes para a resistência a antibióticos. Explanando gráficos arredondados com informação de verde para assimilação positiva, vermelho para assimilação negativa e amarelo para a assimilação de estruturas parecidas ou componentes fora do banco de dados.

4.4 Reativação dos microrganismos

Após a realização das análises de genômicas, iniciou-se a reativação dos microrganismos. As bactérias foram cultivadas em meio BH (sulfato de magnésio, 0,20g/L; cloreto de cálcio, 0,02 g/L; fosfato monopotássico, 1,00 g/L; fosfato dipotássico, 1,00 g/L; nitrato de amônio, 1,00 g/L; cloreto de ferro, 0,05 g/L), adicionado de 1% de óleo diesel como fonte de carbono a 150 rpm e 30 °C, durante 16h. Esta cultura foi utilizada como pré-inóculo.

4.5 Coleta das amostras de óleo residual de fritura

A fonte de carbono utilizada para a indução da produção de lipase foi o óleo de residual de fritura. O óleo foi coletado na empresa ISM GOMES DE MATTOS EIRELI de CNPJ: 04.228.626/0001-00 fornecedora de refeições no Restaurante Universitário do setor sul da Universidade Federal do Amazonas.

Foram coletados 2 litros de óleo em garrafas PET. O líquido foi peneirado para a retirada de sólidos em suspensão, passado por uma peneira de 22 µm para a garantia de retirada de microrganismos e armazenado em frascos âmbar.

4.6 Produção Enzimática de Lipase pelas Bactérias

Para a produção de lipase foi utilizado o meio BH suplementado com 1% de óleo residual de fritura peneirado como fonte de carbono. A partir do pré-inóculo obtido anteriormente, realizou-se um inóculo com densidade celular foi ajustada 0,1-OD 600 nm.

O experimento foi conduzido em frascos tipo Erlenmeyer, incubados a 30 °C, 150 rpm por 7 dias, adaptado de Garrido e Silva (2018). Foram utilizadas triplicatas experimentais para cada microrganismo isolado, bem como para o consórcio. Os controles experimentais foram incubados em meio BH sem adição óleo. Durante todo o

período de experimentos foram monitorados o crescimento celular e a atividade enzimática a cada 24 horas.

4.7 Atividade Enzimática de Lipase

A análise da atividade enzimática foi realizada por método fotométrico utilizando o *p*-nitrofenil palmitato (pNPP) como substrato.

O volume total da atividade foi 1400 µL divididos em 140 µL de enzima (sobrenadante de cultura), 931 µL de pNPP 2 mM e 329 µL de tampão Tris-HCL de pH 8,0. Após a solubilização foi incubado a 40 °C por 5 min e interrompeu a reação em um banho de gelo. Por motivos de formação de um precipitado branco foi necessário realizar a centrifugação das amostras a 4°C e 10.000 rpm por 10 e/ou 15 minutos, até a total separação do precipitado e realizar a leitura do sobrenadante no espectrofotômetro a 405 nm (GUO, et al, 2021; KOTOGÁN, et al, 2022; ABDELLA, 2023).

Para a reação controle foi utilizada a enzima desnaturada por fervura do caldo enzimático durante 10 minutos. Esta reação foi considerada como branco para zerar o espectrofotômetro.

Foi definido como unidade internacional de atividade enzimática (U) o valor de 1 µmol de pNP liberado por minuto (TUYSUZ, et al, 2019).

As concentrações de pNP liberada nas reações foram quantificadas a partir de uma curva padrão de pNP, cuja metodologia é adaptada de Tuysuz e colaboradores (2019): a partir de uma solução padrão de pNP, de 10mM, em tampão fosfato de sódio pH 8,0, as concentrações foram variadas entre 0,01 a 1 mM e suas absorbâncias lidas a 405 nm, em espectrofotômetro com leitor de microplaca.

4.8 Cálculo da Atividade Enzimática de Lipase

Após a obtenção da equação da reta obtida das concentrações de pNP liberados, foi calculado a atividade enzimática em U/L conforme a equação abaixo (SHAH, et al, 2015):

$$\frac{U}{L} = \frac{PnP \times Vt}{Ve \times t} \times Dil$$

Onde:

U/L = Atividade enzimática por 1 unidade de enzima internacional por Litro;

PnP = μmol de p-nitrofenol (PNP) liberado;

Vt = Volume total da mistura reacional (L);

Ve = Volume de enzima utilizada no ensaio (L);

t = Tempo de reação (min);

Dil = Diluição prévia da amostra quando necessário, caso não, foi tratado como constante de valor 1.

4.9 Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas totais foi determinada utilizando o método de Bradford (1976). Para cada análise, preparou-se uma mistura reacional com volume final de 1500 μL , contendo 75 μL de extrato enzimático, 1333 μL de Reagente de Bradford (0,01% de Coomassie Brilliant Blue G-250 em ácido fosfórico 8,5% e etanol 95%) e 91,5 μL de água ultrapura. As amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) sob proteção luminosa (papel alumínio) para evitar interferências fotoquímicas. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro UV-Vis ($\lambda = 595 \text{ nm}$), utilizando como branco uma solução controle, onde o extrato enzimático foi substituído por 75 μL de água ultrapura.

4.10 Eletroforese de proteínas

4.11.1 Eletroforese em SDS-PAGE não desnaturante e não redutor

Para análise da qualidade e diversidade das proteínas secretadas, a eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante e não redutor foi realizada. Um volume igual a 1 mL de sobrenadante de cultura com a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas foi precipitado na concentração 10% de ácido tricloroacético (TCA) e solubilizado em 100 μL de tampão de carregamento (Tris-HCl 0,2M pH 6,8; 4 % (v/v) SDS; 20 % (v/v) glicerol; 0,1% (p/v) azul de bromofenol). As amostras não foram fervidas a fim de garantir a conformação das proteínas. Após este procedimento foi pipetado 15 μL de proteínas em poços de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %) em tampão Tris-Glicina 1x pH 8,3 (Tris 0,025M; Glicina 0,192M, SDS 0,1%).

As condições da eletroforese foram: corrente elétrica constante no gel concentrador de 25 mA e corrente elétrica no gel separador de 50 mA por gel, sistema Mini-PROTEAN® gel releases (Bio-Rad), sob uma tensão de 200 V. Para a visualização, o gel foi incubado por 1 hora em solução corante com azul de Comassie, seguido de solução descorante por no mínimo 12 horas ou “*overnight*”. O gel foi digitalizado utilizando Lab Scam 5.0 (DE SOUZA, BRÍGIDO e MARANHÃO, 2016; FURINI, et al, 2018; ABDELLA, et al, 2023).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dados de bioinformática

O trabalho utilizou informações prévias da tese de doutorado do senhor Jefferson como mencionado na metodologia. A cepa A-313 foi descrita como *Acinetobacter seifertii* e a A-314 como *Achromobacter xylosoxidans*. No caso da cepa A-316, observou-se alta similaridade com o gênero *Pseudomonas*, sem, no entanto, atingir os critérios necessários para definição ao nível de espécie.

A avaliação da similaridade genômica entre bactérias tem sido fundamental para a classificação taxonômica e a compreensão da relação evolutiva entre diferentes espécies. Entre as métricas mais utilizadas, destaca-se a identidade média de nucleotídeos (ANI), que, segundo estudos, deve apresentar valores superiores a 95 % para indicar que duas amostras pertencem à mesma espécie. O ANI é uma medida que estima a porcentagem de nucleotídeos idênticos em regiões alinhadas de dois genomas, sendo considerado um método robusto para delimitar espécies bacterianas (Larralde et al., 2024; Meier-Kolthoff et al., 2021; Lee et al, 2016; Lee et al., 2015).

Para aprimorar essa análise, foi desenvolvido o OrthoANI, uma versão melhorada do ANI que utiliza o algoritmo BLASTn para identificar blocos ortólogos entre os genomas e calcula a média de identidade apenas considerando esses pares. Essa abordagem visa resolver problemas de assimetria presentes em métodos anteriores, garantindo maior precisão na estimativa da similaridade genômica. O OrthoANI, portanto, é altamente correlacionado com o ANI tradicional, mas oferece uma metodologia mais refinada ao focar em fragmentos ortólogos (Larralde et al., 2024; Meier-Kolthoff et al., 2021; Lee et al, 2016; Lee et al., 2015).

Além do ANI, o índice de hibridização de DNA-DNA digital (dDDH) é outra métrica importante na avaliação de similaridade genômica. Valores de dDDH abaixo de um determinado ponto de corte indicam que as amostras não pertencem à mesma espécie, sendo uma ferramenta complementar ao ANI na classificação taxonômica. A combinação dessas métricas permite uma análise mais confiável e detalhada, contribuindo para a reclassificação de organismos e a validação de limites taxonômicos. A importância dessas métricas é reforçada pelo fato de que elas oferecem uma abordagem padronizada e quantitativa para a comparação de genomas, facilitando a

distinção entre espécies e a identificação de possíveis inconsistências na classificação baseada apenas em características fenotípicas ou sequências de genes específicos. Assim, o uso do OrthoANI e do dDDH tem se consolidado como uma prática essencial na genômica comparativa, promovendo avanços na taxonomia bacteriana e na compreensão da diversidade genética (Larralde et al., 2024; Meier-Kolthoff et al., 2021; Lee et al., 2016; Lee et al., 2015).

Compreendendo a abordagem do *software*, é possível a construção de gráfico de calor (*heatmap*) (figura 13, 14 e 15) e seus respectivos filogramas com os genomas dos isolados e das espécies de referência do banco de dados.

Exemplo de uso foi a aplicação de Alves (2020) em isolados de patógenos do gênero *Corynebacterium* onde foi desenvolvido um classificador interno baseado em correlações entre diferentes índices de parentesco genômico, com o objetivo de aprimorar a acurácia na identificação de espécies dentro do grupo. Foram analisadas 213 sequências genômicas provenientes do NCBI Genomes e do Arquivo Europeu de Nucleotídeos, incluindo 188 classificadas. As matrizes obtidas foram combinadas formando uma impressão digital genômica para cada isolado. No total, foram conduzidas 45.369 comparações genoma a genoma, resultando em um dendrograma com clados bem definidos e superior a 95%. A abordagem demonstrou elevada capacidade de discriminar com precisão *C. belfantii* e *C. rouxii*, mesmo dentro de um grupo filogeneticamente próximo.

O gráfico de calor (Figura 11), referente à análise genômica da *Acinetobacter seifertii*, demonstra uma identidade genômica de 96,72% com a espécie proposta, valor que sustenta fortemente sua validação estatística como pertencente a essa designação taxonômica. A "espécie proposta" refere-se ao organismo em estudo cuja identificação está sendo verificada com base em dados genômicos, comparando-se com espécies previamente descritas em bancos de dados. A confirmação estatística baseia-se em métricas como o OrthoANI e o dDDH, que avaliam a similaridade genômica entre os genomas comparados. Nesse caso, o alto valor de identidade diferencia *A. seifertii* de outras espécies filogeneticamente próximas, como *A. baumannii* e *A. nosocomialis*, que apresentaram percentuais de similaridade

significativamente inferiores, reforçando a acurácia da identificação.

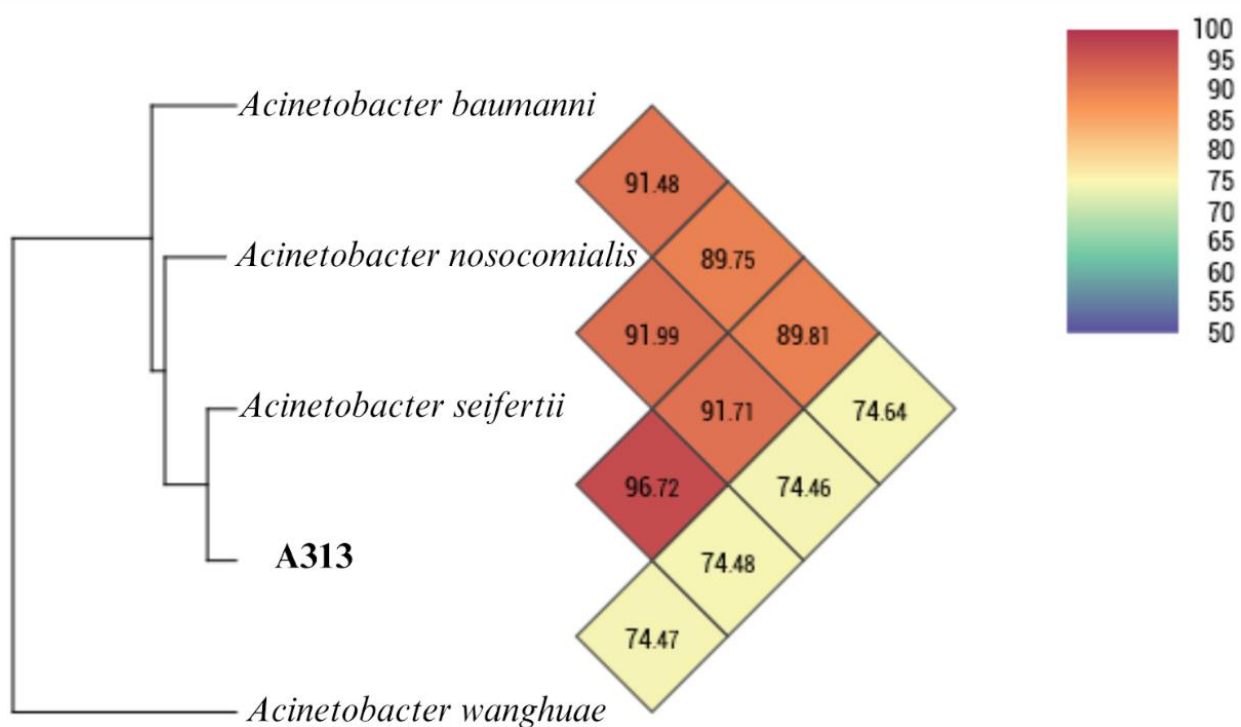


Figura 11: Gráfico de mapa de calor da bactéria A-313 que possui coloração mais forte para os mais próximos de identificados e os mais claros para os mais distantes.

O gráfico de calor (Figura 12) para a bactéria *Achromobacter xylosoxidans* apresentou similaridade de 98,87% com a proposta e a estatística e assim confirmando a espécie, distanciando-se da *A. insuavis*, *A. ruhlandii*.

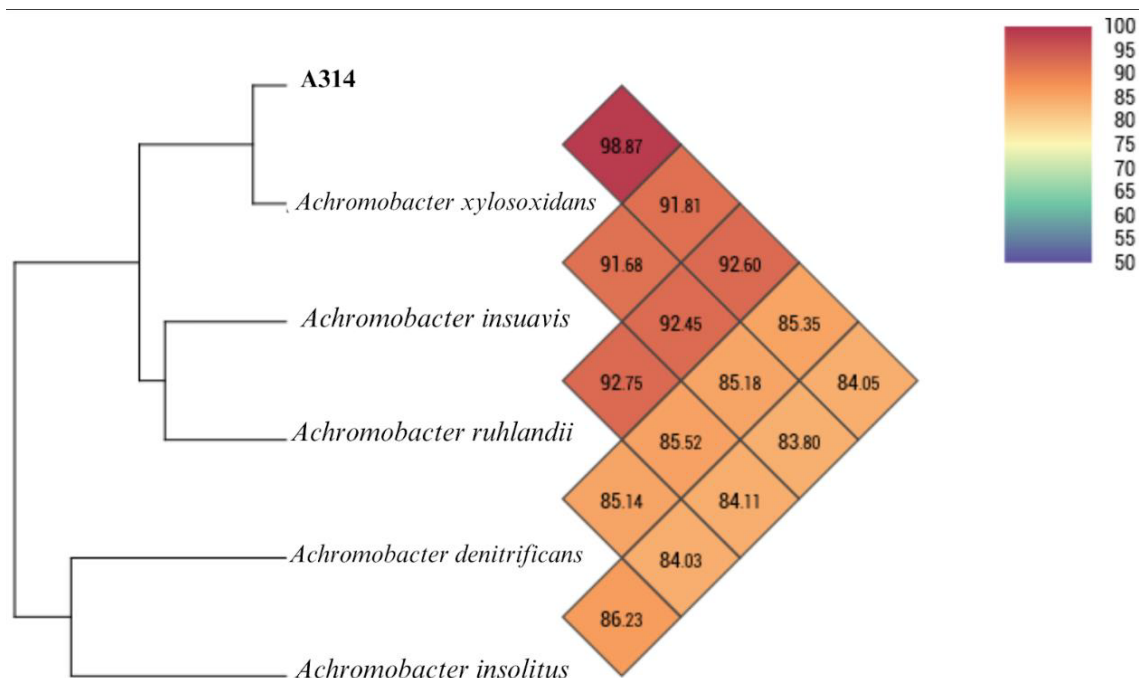


Figura 12: Gráfico de mapa de calor da bactéria A-314 que possui coloração mais forte para os mais próximos de identificados e os mais claros para os mais distantes.

A partir da observação dos dados propostos e estatísticos do gráfico de calor (figura 13) da bactéria A-316. Notasse o mais próximo de 90,99% evidenciando a ausência de identificação conclusiva da espécie, por detalhar valor abaixo de 95%. E conforme o banco de dados, a espécie mais próxima seria a *P. nitroreducens*.

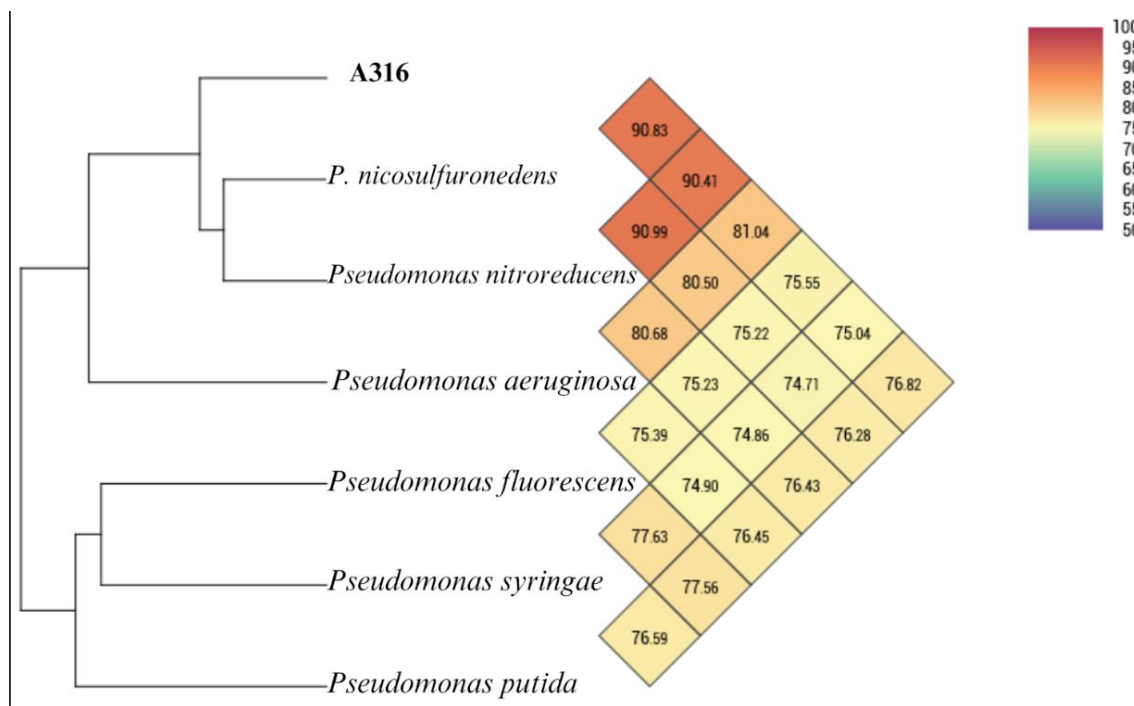


Figura 13: Gráfico de mapa de calor da bactéria A-316 que possui coloração mais forte para os mais próximos de identificados e os mais claros para os mais distantes.

Conforme o estudo organizado por Amaral (2022), é possível visualizar o uso de heatmaps destacando como ferramenta essencial para a visualização e interpretação dos perfis funcionais e genômicos de isolados de *Bartonella spp.* provenientes de roedores e marsupiais do bioma Pantanal. A partir do sequenciamento completo dos genomas de *Bartonella machadoae sp. nov.* e *Bartonella harrusi sp. nov.*, foram identificadas e comparadas as principais vias metabólicas, genes marcadores e famílias de enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos (CAZy) entre diferentes espécies do gênero. Os heatmaps permitiram representar de forma clara e intuitiva a presença, ausência e a variação no repertório gênico funcional dessas cepas em relação a outras previamente descritas. Essa abordagem visual contribuiu para evidenciar assinaturas metabólicas específicas e apoiar a delimitação taxonômica das novas espécies, além de reforçar a utilidade dos heatmaps como recurso estratégico em análises filogenômicas e de perfil funcional em estudos de diversidade microbiana.

Após a confirmação do gênero, seguiu para a etapa de avaliação de sistemas e subsistemas para cada bactéria, pois assim contribuirá para avaliação do indivíduo e do

consórcio. Uma vez que o sistema é compreendido como uma unidade funcional complexa composta por múltiplos elementos biológicos interconectados como genes, proteínas, metabólitos ou vias de sinalização que atuam de forma coordenada para manter processos celulares ou fisiológicos. Enquanto os subsistemas, correspondem a agrupamentos funcionais ou modulares dentro do sistema biológico maior, geralmente definidos com base em critérios estruturais, funcionais ou regulatórios. A identificação e análise desses subsistemas permitem a decomposição da complexidade biológica em unidades menores e mais interpretáveis, sendo particularmente útil em estudos de redes biológicas.

A literatura relacionada ao uso de subsistemas para estudos de metabolismo e anotação rápida, especialmente no contexto de RAST, destaca a importância de ferramentas precisas e eficientes para a análise de dados biológicos. Segundo Silva (2019), subsistemas gerados por RAST proporcionam uma análise detalhada de cada amostra, evidenciando a capacidade do método de criar subsistemas específicos que facilitam a interpretação de dados complexos, como a presença de ureia em amostras específicas (Silva, 2019). Essa abordagem demonstra a eficácia do RAST na anotação rápida, permitindo uma compreensão aprofundada do metabolismo secundário e de outros processos biológicos relevantes.

Além disso, estudos sobre biotecnologia marinha reforçam a relevância do uso de subsistemas na análise de metabolismo, destacando a definição de conceitos relacionados a genes e genomas, que são essenciais para a compreensão do funcionamento biológico em diferentes contextos ambientais (Thompson, 2020). A capacidade de gerar subsistemas precisos contribui para a rápida identificação de funções metabólicas, facilitando estudos de metabolismo secundário e outros processos bioquímicos.

A aplicação do RAST também é evidenciada na biofabricação de alimentos, onde o uso de subsistemas pode explorar novos desafios na pesquisa, como a otimização de processos e a redução de desperdícios (Zaro, 2018). A implementação de subsistemas específicos permite uma análise mais rápida e detalhada, apoiando o desenvolvimento de estratégias inovadoras na biofabricação.

Não obstante, a aplicação de subsistemas em estudos de genoma e na utilização de enzimas lipolíticas mostra-se promissora, com contribuições de diferentes áreas do

conhecimento, incluindo biotecnologia marinha, enzimologia e tecnologia da informação, consolidando uma base sólida para futuras pesquisas e aplicações práticas na área.

A anotação genômica realizada no RAST contribuiu na visualização de subsistemas que estejam diretamente ligados à degradação de óleo e, por conseguinte, à produção da enzima lipolítica. O subsistema de ácidos graxos, lipídios e isoprenóides foi o principal para aprofundar os estudos de genes como também realizar a navegação direta no genoma, em busca de genes específicos da enzima lipolítica, procurando pelo comprimento e função, cuja localização foi fornecida pela própria plataforma, assim como seu enquadramento nos subsistemas (Tabela 2).

Subsystems	Pseudo monas	Acinet obacter	Achrom obacter
AMINO ÁCIDOS E DERIVADOS	745	423	732
METABOLISMO DE POTÁSSIO	25	22	22
METABOLISMO FOSFÓRICO	59	42	63
REGULAÇÃO	140	90	142
ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDIOS E ISOPRENOIDES	235	153	263
VARIAÇÃO	66	58	57
METABOLISMO SECUNDÁRIO	13	25	6
FOTOSÍNTESE	0	0	0
CoFATORES, VITAMINAS, GRUPOS	369	257	336

PROTEICOS E PIGMENTOS			
METABOLISMO E AQUISIÇÃO METÁLICA	80	10	92
METABOLISMO RNA	226	170	177
METABOLISMO DNA	137	94	109
TRANSPORTE DE MEMBRANA _t	254	110	423
METABOLISMOS PARA COMPONENTES AROMÁTICOS	170	111	178
NODUAÇÃO	0	0	0
CÁPSULA E PAREDE CELULAR	220	94	178
PLASMÍDIOS	18	8	27
METABOLISMO PROTICO	290	245	282
DIVISÃO CELULAR	35	37	29
NUCLEOTÍDIOS	132	89	97
METABOLISMO DE NITROGÊNIO	61	24	69
METABOLISMO DE ENXOFRE	142	56	108
RESPIRAÇÃO CELULAR	177	96	217
CARBOIDRATOS	446	284	454

RESPOSTA A ESTRESSE	232	125	198
DEFESA, DOENÇA E VIRULÊNCIA	179	102	146
MOBILIDADE	181	0	83
DORMÊNCIA E ESPORULAÇÃO	3	2	3
Total	4635	2727	4491

Tabela 2: Representação dos subsistemas identificados pelo RAST do consórcio bacteriano.

Utilizando a verificação por função no RAST e possíveis rotas metabólicas no *software* KEGG foi possível identificar uma quantidade de genes relacionados a enzimas lipolíticas conforme a figura 17. Ainda, foram detectados genes para proteínas envolvidas em processos usados industrialmente, como a lisofosfolipase, lisofosfolipase L1, fosfolipase, fosfolipase C4, fosfolipase A1 e triacilglicerol lipase que podem participar do metabolismo de glicero fosfolípido, éter lipídico e ácido α – linoleico.

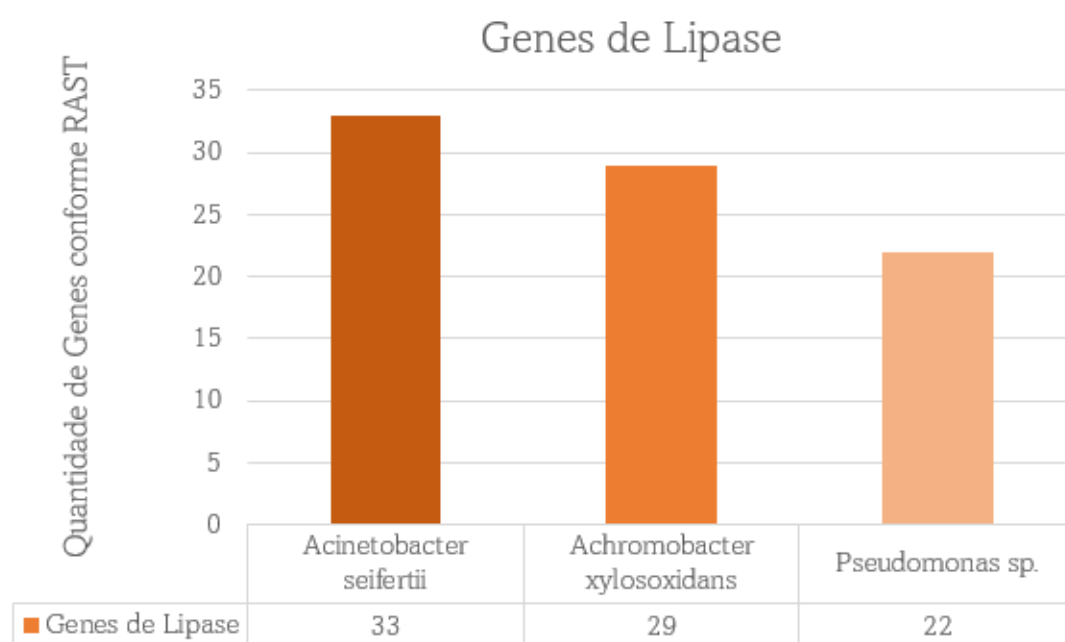


Figura 14: Possíveis genes voltados a atividades lipolíticas.

As fosfolipases também desempenham um papel relevante nos processos metabólicos relacionados tanto ao ciclo do glicerofosfolípídeo quanto ao metabolismo de éteres lipídicos. Esses compostos estão envolvidos em vias biossintéticas essenciais, como a produção de fosfatidiletanolamina — fosfolípídeo comumente associado a aplicações no mercado de suplementos voltados à saúde do sistema nervoso e à melhora da memória. Além disso, os éteres lipídicos participam da formação de seminolípídios e da síntese de esfingolípídios, ambos fundamentais para funções estruturais e sinalizadoras no organismo humano (Souza, 2020; Adetunji, 2021).

A triacilglicerol lipase atua diretamente tanto na síntese quanto na catálise de triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis. Sua participação é fundamental em processos de interesse industrial, especialmente na produção de biodiesel. O papel dessa enzima é particularmente relevante diante da crescente demanda por fontes energéticas renováveis, uma vez que a ampliação do uso de biodiesel — em substituição progressiva ao diesel fóssil — requer investimentos contínuos para aumentar sua participação na matriz energética, inclusive na composição atual de combustíveis veiculares disponíveis no mercado (Chandra, 2020; Souza, 2020).

A realização da catalisação a partir de enzimas é importante a fim de encontrar novas biomoléculas ou aumentar a quantidade de biomoléculas que possam catabolizar agentes contaminantes no meio ambiente e transformar a linha laboratorial numa gestão industrial de processos biotecnológicos de remanejamento de efluentes. Logo atuar em processos residuais e processuais de indústrias como alimentícias, energéticas e farmacêuticas que possuem materiais de alta carga orgânica oleosa como resíduo final no processo produtivo e/ou participação direta da linha produtiva (BHANDARI, et al, 2021; RIGO, 2021).

A premissa de utilizar resíduos como fonte alternativa de carbono está alinhada à necessidade consolidada de reuso de materiais descartáveis, conferindo-lhes valor agregado com elevado potencial biotecnológico. Tal abordagem é especialmente relevante, considerando que os métodos convencionais de recuperação físico-química desses rejeitos podem causar impactos ambientais significativos ao solo, à atmosfera e aos lençóis freáticos.

A análise genômica dos microrganismos avaliados gera expectativas promissoras quanto à capacidade de produção enzimática voltada à mitigação de efluentes tóxicos ou inadequadamente gerenciados. No entanto, apesar da elevada densidade de informações genéticas indicativas do potencial lipolítico e da adaptabilidade bacteriana para aplicações industriais, torna-se imprescindível a avaliação da resistência a antibióticos. Esse fator é essencial para assegurar a biossegurança e viabilizar o uso dos microrganismos em processos produtivos, minimizando os riscos de contaminação humana.

Além da análise da degradação de ácidos graxos, tornou-se necessário compreender a influência da presença de metais na composição do óleo, especialmente após sua exposição a elevadas temperaturas.

O óleo residual de fritura, utilizado como fonte de carbono, pode conter metais pesados como ferro, alumínio, cobre, cobalto e zinco, cuja presença foi destacada por Fonseca (2017). Esses metais, quando em concentrações elevadas, podem comprometer a produção de lipase, particularmente se o microrganismo utilizado não apresentar mecanismos de resistência ou vias metabólicas adaptativas. Adicionalmente, por meio de cromatografia, Fonseca (2017) demonstrou a degradação dos ácidos graxos presentes no óleo, comparando amostras antes e após a incubação com a bactéria *Shewanella putrefaciens*, evidenciando sua capacidade de biodegradação.

Ainda que a presença desses metais seja potencialmente desfavorável, outros autores já indicaram que em quantidades pequenas e suficientes, estes metais não se tornam inibidores ou prejudiciais (Silva, 2009; Santos, 2011; Fitzgerald *et al.*, 2012; Peixoto, 2012; Freitas, 2018).

Estudos recentes destacam a composição do aço inoxidável, que inclui ferro, manganês, cromo, cobre, cobalto e outros metais (Bigueti *et al.*, 2019). Freitas (2018) observou que esses metais podem ser transferidos para o óleo durante o processo de fritura utilizando utensílios de aço inoxidável. Consequentemente, a presença desses metais no óleo pode influenciar a resistência das enzimas lipolíticas.

Conforme o estudo Abdella (2023) a enzima lipase da bactéria denominada de *Pseudomonas sp.* A6 do seu estudo obteve interferência pela presença do íon K^+ (16,6 U/mL, 0,85 U/mg) e íon NH_4^+ (15 U/mL) e alternativamente, Cu^{2+} e Mn^{2+} inibiram a

atividade da lipase, concluindo que se a bactéria possuir vias metabólicas de degradação desses íons será um fator crucial para a adaptação do meio para a produção de enzimas lipolíticas, uma vez que seria normal encontrar esses tipos de íons metálicos na presença de óleo residual de fritura por causa dos utensílios de cozinha residenciais e comerciais.

Os genes dispostos na tabela 3 participam diretamente na necessidade de adaptação da bactéria e/ou consórcio utilizar como fonte de carbono o óleo residual de fritura para a produção de enzimas lipolíticas.

Isolado	Gene	Descrição
A313	ChrB	Resistência a chromium
	CZC	Resistência a cobalto, zinco e cádmio
	ArsH	Resistência a arsênio
A314	CZC	Resistência a cobalto, zinco e cádmio
	ArsH	Resistência a arsênio
	CopD	Resistência a cobre
	ChrA	Resistência a chromium
A316	CZC	Resistência a cobalto, zinco e cádmio
	ArsH	Resistência a arsênio
	Cupredoxin	Tolerância a cobre
	ChrB	Resistência a chromium

Tabela 3: Genes a quais apresentaram resultados sobre resistência a metais pesados.

Através da compreensão da presença de genes possivelmente ativos para a resistência de metais como o cobre, cromo e zinco por exemplo. O consórcio consegue se adaptar ao meio com presença destes e iniciar o processo do que é possível degradar e fornecer energia, no caso o óleo residual de fritura.

A partir da visão de possibilidades degradativas de oleosidade e adaptação metálica seguiu-se para a compreensão por meio da ferramenta DRAM para a melhor visualização dos possíveis metabolismos gerais. Certos algoritmos buscam determinar o conjunto mínimo de vias metabólicas capaz de explicar um conjunto de anotações

gênicas fornecidas, a ferramenta DRAM (Veseli, 2023; Shaffer et al., 2020) integra anotação de genes a partir de diversos bancos de dados enzimáticos, associando informações à estimativa de completude de vias metabólicas. O DRAM é especializado na análise de genomas montados a partir de metagenomas (MAGs), e ciclos biogeoquímicos. O KBase (Veseli, 2023; Arkin et al., 2018) funciona como um ambiente colaborativo online para análises de dados ômicos, contendo aplicações que permitem executar softwares como DRAM, ModelSeed e RAST.

Conforme Shaffer et al (2023) demonstra que a análise funcional de genomas microbianos é uma etapa crucial para a compreensão dos potenciais metabólicos de isolados e comunidades microbianas em ambientes diversos. Entre as ferramentas disponíveis, destaca-se o DRAM, capaz de sintetizar anotações funcionais a partir de múltiplas bases de dados. Integrado à plataforma KBase é possível realizar anotações e modelagens metabólicas via interface gráfica, sem necessidade de infraestrutura própria. O módulo disponibiliza a versão padrão e viral (DRAM-v), organiza as anotações em três níveis de detalhamento e permite a construção de **modelos metabólicos em escala genômica (GEMs)**. Sua aplicação evidenciou ganhos na cobertura funcional e maior precisão preditiva quando combinado com o anotador RAST, validado em genomas de *Escherichia coli* e *Paceibacter normanii*. Assim, o kb_DRAM representa um avanço relevante para estudos em bioinformática e ecologia microbiana.

E para compreender a possibilidade de degradação de cadeias de ácidos graxos foi possível analisar através da ferramenta DRAM para a anotação e utilizando a plataforma KBase. Os resultados apresentados na figura 15 revelam possíveis vias metabólicas, na degradação de cadeias de ácidos graxos. Destes, destaca-se o segmento “SCFA and Alcohol conversions” – Ácidos graxos de cadeia curta e conversões alcoólicas – confirmando metabolismos que degradam esses componentes e abre à possibilidade de produção de enzimas lipolíticas, pelas bactérias isoladas

Conversão de Ácidos Graxos de Cadeia Curta e Álcool

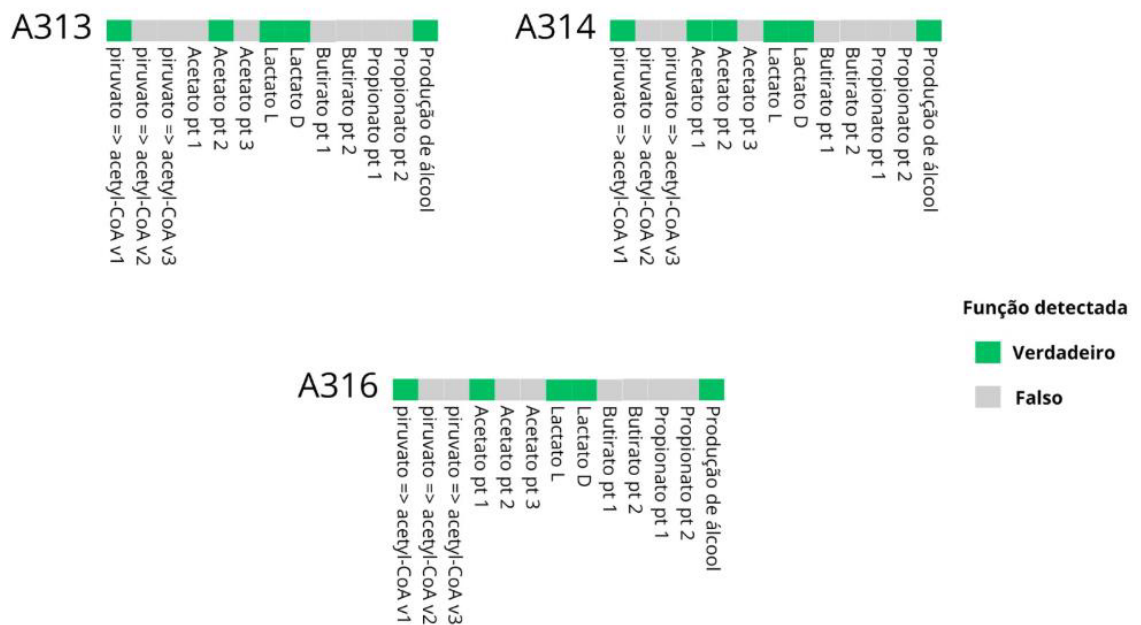


Figura 145: Sequência de metabolismos e foco no segmento de ácidos graxos de cadeia curta e conversões alcóolicas das bactérias.

O trabalho realizado por Shaffer et al (2020) corrobora a caracterização funcional de microbiomas a partir de dados metagenômicos de demanda por ferramentas capazes de organizar e interpretar grandes volumes de informações genéticas de forma estruturada e biologicamente significativa. Nesse cenário, o DRAM (Distilled and Refined Annotation of Metabolism) surge como uma ferramenta robusta, proporcionando anotações funcionais refinadas e organizadas em níveis progressivos de síntese. Um de seus diferenciais está na geração de heatmaps interativos, presentes no nível denominado *Product*, os quais permitem visualizar de forma integrada e comparativa a presença, ausência e completude de vias metabólicas e genes marcadores entre múltiplos genomas e metagenomas. Esses *heatmaps* são especialmente relevantes na análise de vias de produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), metabólitos essenciais na microbiota intestinal humana, onde o DRAM demonstrou capacidade de discriminar perfis metabólicos específicos, indicando a distribuição diferencial das vias de produção de acetato, butirato e propionato em distintas linhagens bacterianas. Dessa forma, a aplicação dos *heatmaps* no DRAM amplia a compreensão sobre a organização

funcional de comunidades microbianas e permite correlacionar potenciais metabólicos com padrões ecológicos e clínicos relevantes.

A produção de piruvato, acetato, lactato e álcool significam que o microrganismo possui vias metabólicas ativas que convertem substratos, principalmente carboidratos ou aminoácidos, nesses compostos, que são metabólitos centrais ou finais de processos catabólicos e fermentativos. Essas vias são fundamentais tanto para a regeneração de cofatores celulares (como NAD^+) quanto para o fornecimento de energia e precursores biossintéticos. Além disso, são elementos que contribuem com a visão de uso de enzimas funcionais para a elaboração da ação do metabolismo (Veseli, 2023; Shaffer et al., 2023 Shaffer et al., 2020).

O piruvato é um intermediário metabólico central, resultante da glicólise, que pode ser direcionado para diversas rotas: respiração aeróbia (ciclo de Krebs), fermentação ou outros processos anaeróbios. Sua produção e conversão determinam o destino energético e redox da célula. O acetato é frequentemente produzido pela fermentação de piruvato em ambientes anaeróbios. É uma fonte de energia para outros microrganismos e um importante SCFA no intestino humano, influenciando o metabolismo do hospedeiro, o pH intestinal e a homeostase imunológica (Veseli, 2023; Shaffer et al., 2023 Shaffer et al., 2020).

O lactato é um produto típico da fermentação láctica, resultado da redução do piruvato pela lactato desidrogenase, regenerando NAD^+ necessário para a continuidade da glicólise em ambientes anaeróbios. O álcool (geralmente etanol) é produzido pela fermentação alcoólica, comum em leveduras e alguns microrganismos anaeróbios, também a partir da conversão de piruvato via acetaldeído. Esse processo contribui para a regeneração de NAD^+ e geração de ATP (Veseli, 2023; Shaffer et al., 2023 Shaffer et al., 2020).

A relevância de observar essas vias em análises genômicas e metagenômicas está na capacidade de prever o papel funcional de um microrganismo em seu ecossistema, identificar sua contribuição para ciclos de carbono e suas possíveis interações metabólicas com o hospedeiro ou outros microrganismos (ex.: fermentação cruzada e produção de SCFAs no meio introduzido) (Veseli, 2023; Shaffer et al., 2023 Shaffer et al., 2020).

O consórcio foi observado conforme os genes de resistência a antibióticos que foram identificados pelo CARD (<https://card.mcmaster.ca>) no modo de análise - que assim mostrou probabilidades das bactérias possuíram estes genes comparando o genoma e a biblioteca de dados de genes de resistência armazenados no *software*. Os resultados foram classificados em três categorias: genes confirmados (verde), genes com similaridade estrutural (amarelo) e genes ausentes ou não relacionados (vermelho), conforme ilustrado na Figura 16.

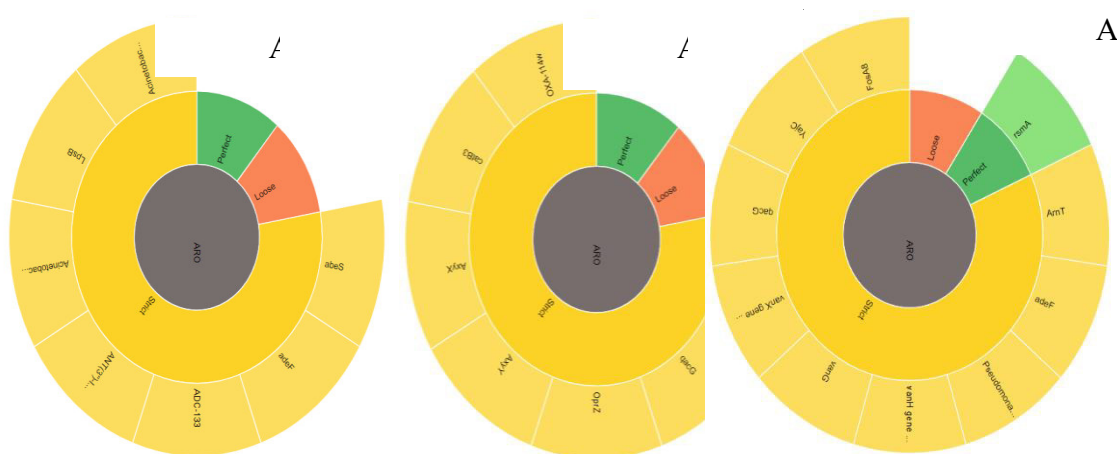


Figura 15: Gráfico de resistência a antibióticos de cada linhagem. O verde são os identificados semelhantes, amarelos são sequências próximas de existentes e vermelho são não identificados.

A compreensão em utilizar os dados de verificação de resistência a antibióticos é uma abordagem para o início da transformação do estudo de bancada em um projeto de alto escalonamento com baixo risco de virulência e caso ocorra um acidente, seja possível a eliminação da infestação com antibióticos conhecidos e de fácil acesso.

Demonstrando a segurança do uso de microrganismos deste consórcio para a biorremediação de óleos de frituras residuais. Através da figura 14 observa-se que as bactérias isoladas *A. seifertii* (A-313) e *A. xilosoxydans* apresentaram apenas estruturas de genes parecidos e que não foi encontrado no banco de dados, enquanto a *Pseudomonas sp.* (A-316) possuiu apenas 1 gene de resistência já conhecido e o restante com estruturas parecidas.

Isto infere na possibilidade de trabalhar com estas espécies sem maiores perigos, ou preocupações em casos de contaminação, onde pode ser facilmente tratado e erradicado. Esta informação corrobora com as diretrizes da OMS que apontam que esta etapa é importante, garantindo o trabalho com microrganismos selecionados, não-

patogênicos, e com baixa probabilidade de risco à população. Conforme IGLESIAS (2019) a adição de etapas de conhecimento a resistência de antibióticos já salvou mais de 700.000 vidas no processo de adição da biotecnologia nas linhas de produtos em todo o globo.

Conforme o trabalho de Pinheiro (2023) o uso do RGI é crucial para a identificação de genes de resistência a antimicrobianos em amostras bacterianas. Ele permite uma análise detalhada das características genéticas de patógenos, como o *Staphylococcus aureus*, especialmente em contextos de coinfeção, como durante a pandemia de COVID-19. Essa ferramenta contribui para a vigilância epidemiológica, ajudando a entender a evolução das cepas e a resistência microbiana, o que é vital para o manejo clínico e a prevenção de infecções em ambientes hospitalares.

5.2 Análise comparativa do crescimento bacteriano isolado e em consórcio

Conforme descrito em 3.6, na metodologia, no crescimento bacteriano foi utilizado OFR como fonte de carbono. A partir da aplicação, houve o desenvolvimento celular, com modificações perceptíveis no meio de cultura.

Estas modificações já foram evidentes após 24 horas, cujos frascos límpidos e transparentes adquiriram alto grau de turbidez.

Exemplificando, na Figura 17 se contempla a diferença de turbidez nos Erlenmeyer, marcada pelo crescimento bacteriano. A primeira triplicata, da direita para a esquerda – lado B – é da bactéria *Pseudomonas sp.*, identificada como A-316 e a segunda triplicata, mais turva, posicionada mais à esquerda – lado A – é do consórcio A3.



Figura 16: Triplicata de crescimento do consórcio bacteriano A3, no lado esquerdo (A) e a linhagem *Pseudomonas* sp. (A-316) a direita (B).

Já a Figura 18 exibe a diferença entre a *A. seifertii*, denominada A-31, cuja triplicata está no lado B, à direita, e da *A. xyloxydans*, chamada de A-314, posicionada no lado A, à esquerda

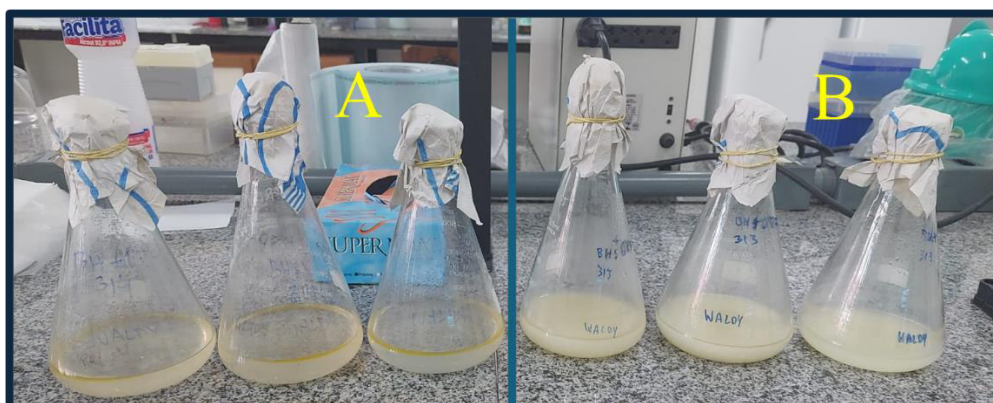


Figura 17: Triplicata de crescimento bacteriano com a linhagem *A. xyloxydans* (A314) (A) e *A. seifertii* (A313) (B).

Avaliá-las de forma isolada foi importante para contemplar as peculiaridades, uniformes, ou não, de cada linhagem, testemunhando se estas características se manteriam na forma de consórcio.

Observa-se nesse crescimento, a formação de biofilme na parede do frasco, conforme a *A. seifertii*, cujo desenvolvimento, já supracitado, é mais rápido que as demais. As outras duas bactérias, além de crescerem mais lentamente, não modificam diretamente a coloração do meio. Os resultados obtidos se assemelham a outros autores como: Furini (2018), Jie NG (2021), Guo (2021) e Abdella (2023), que também observaram o crescimento de *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, analisando suas formações de crescimento, obtendo resultados auspiciosos quanto às produções lipolíticas.

O consórcio bacteriano é inegavelmente notável, beneficiando-se na sobrevivência, sendo tal comportamento mais satisfatório que o observado quando isoladas. Sendo esse crescimento em tempo curto, entende-se que, continuamente, complementam seus desenvolvimentos.

Seguindo a curva de crescimento, um fator crucial é considerar que foram obtidas juntas, desta forma, são provenientes de um ambiente onde se adaptaram sem competição, promovendo melhor desenvoltura em consórcio. Este caso se evidencia, também, na produção de lipases utilizando OFR, com alto teor de ácido graxo, como fonte de carbono.

A produção enzimática ocorreu durante os 7 dias do experimento, mas a *A. seifertii* e o consórcio apresentaram resultados de crescimento em 24h em todas as réplicas realizadas, notando pela turbidez do meio. Enquanto a *A. xylosoxidans* e a *Pseudomonas* sp. apresentaram resultados bem menores de crescimento no meio com fonte de carbono OFR.

Por meio da observação da figura 18 pode-se compreender que realmente o *A. seifertii* impõe um crescimento constante no desenvolvimento do consórcio e pode dar a impressão que é a maior degradadora da fonte de carbono. Foi avaliada a atividade enzimática também para comparar com o crescimento e poder visualizar conforme a visão dada estudos de Cinética de Gaden e ainda pela variação do tempo que no caso é de 7 dias.

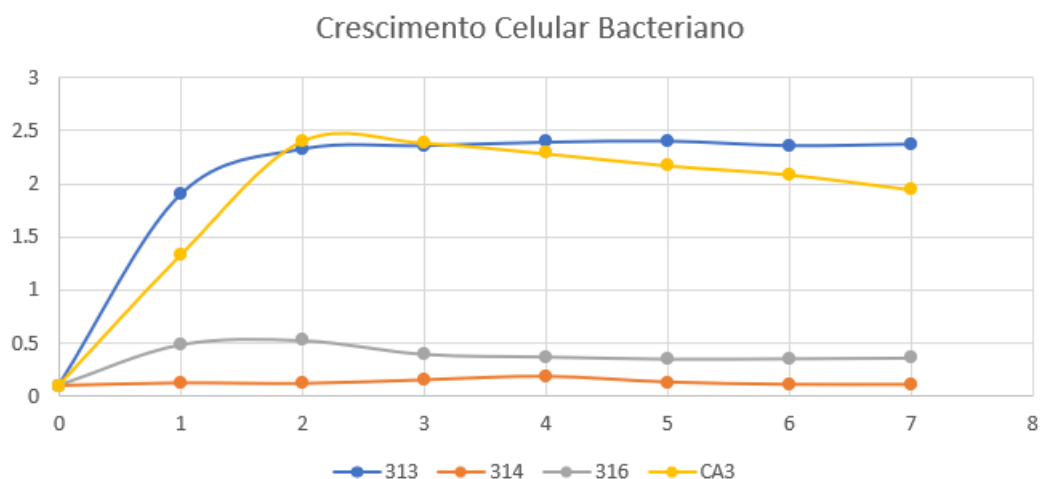


Figura 18: Gráfico de crescimento bacteriano das linhagens, *A. seifertii* (A313), *A. xylosoxydans* (A314), *Pseudomonas* sp. (A316) e o consórcio bacteriano

5.3. Atividade Enzimática

Para o cálculo da atividade enzimática, foi necessária a construção de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de para-nitrofenol (pNP), composto quantificável por espectrofotometria. A curva padrão apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9978, indicando forte correlação linear entre as concentrações e as absorbâncias obtidas.

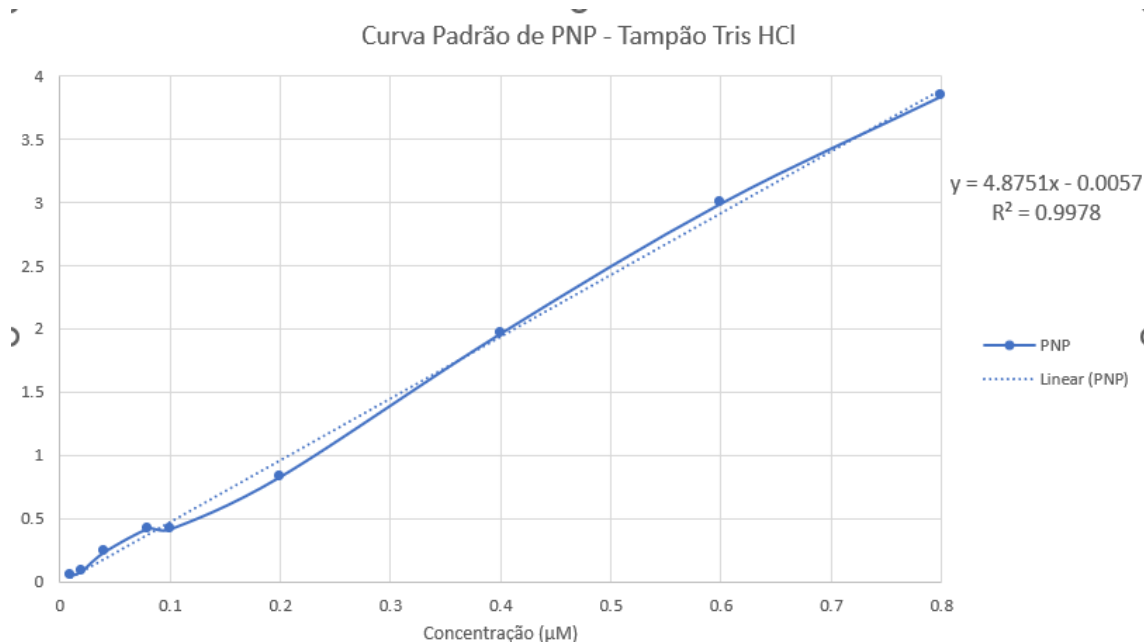


Figura 19: Curva Padrão de paranitrofenol com concentrações conhecidas.

Autores como BEKTAS (2023); WILKESMAN e KURSZA (2017) determinam a importância da comparação de métodos de detecção de atividade enzimática para lipases e esterases como o vermelho de fenol como indicador reside na sua simplicidade, alta sensibilidade e custo-benefício, mas o método utilizando o pNPP é muito difundido e permite a detecção de enzimas lipolíticas em níveis de picogramas, tornando-o altamente sensível.

Além da elevada sensibilidade, este método se destaca pela fácil execução, custo-benefício do substrato, além de análises qualitativas mais ágeis para enzimas lipolíticas sensíveis à temperatura

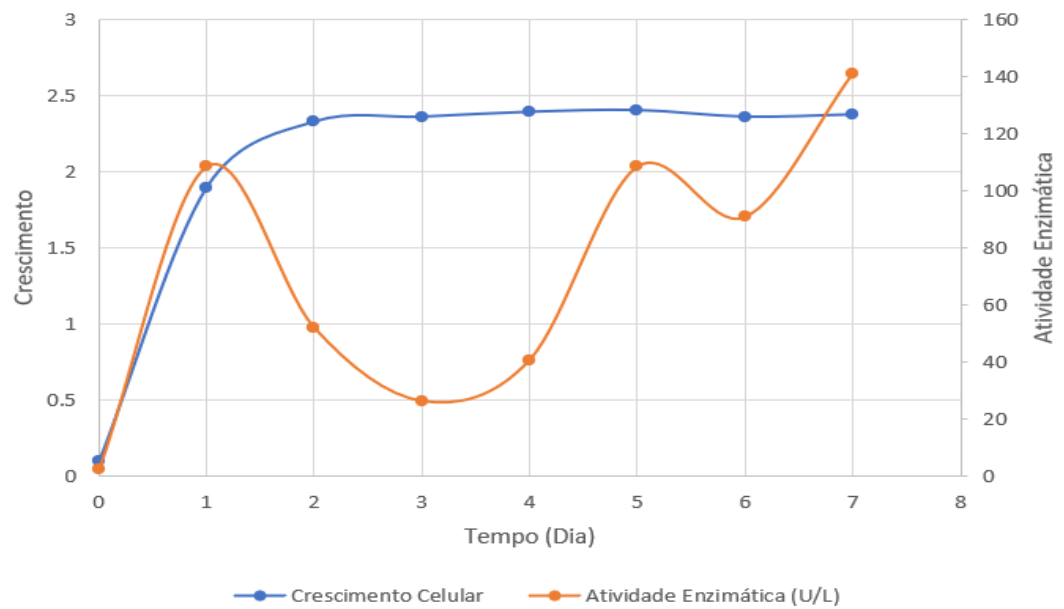
Os cálculos para determinação da atividade enzimática foram realizados, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 07 com unidade de U/L.

Dia	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/L)			CA3
	313	314	316	
0	2.34	2.34	2.34	2.34
1	108.68	174.37	101.80	68.25
2	52.02	9.95	83.34	138.91
3	26.38	7.58	30.33	157.41
4	40.86	56.13	71.31	121.26
5	108.68	14.33	125.28	227.11
6	91.00	14.33	183.08	204.96
7	141.32	33.11	226.01	259.88

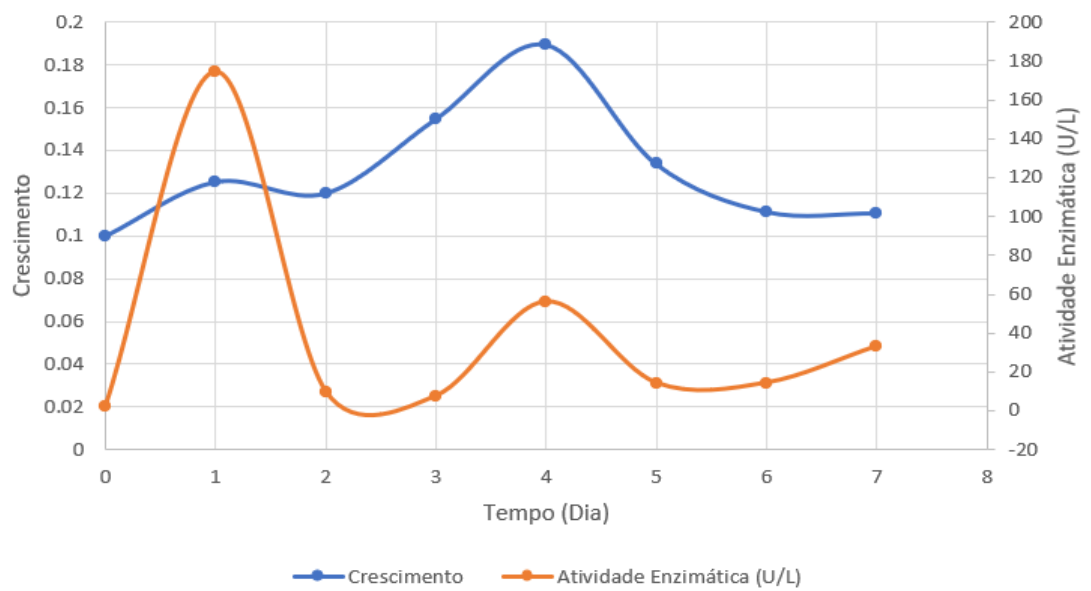
Quadro 4: Atividade enzimática calculada para cada linhagem e consórcio em U/L.

Os valores obtidos da atividade enzimática foram comparados ao crescimento bacteriano utilizando a visão de Gaiden como mencionado no tópico anterior. Desta forma pode-se observar os gráficos de cada linhagem e do consórcio conforme as Figuras 19 a, b, c e d.

313 - *Acinetobacter seifertii*



314 - *Achromobacter xylosoxydans*



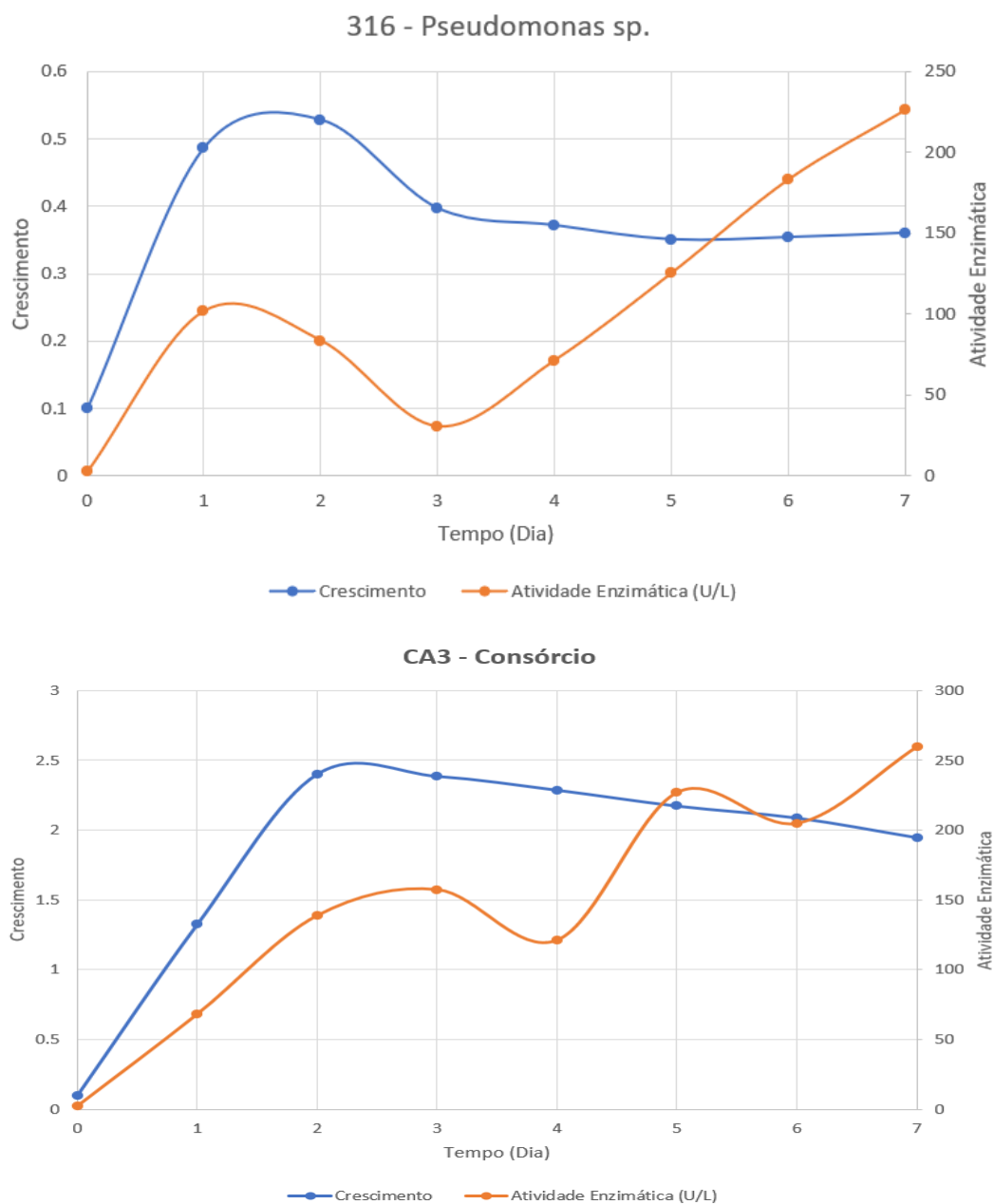


Figura 20: Gráficos comparativos de crescimento bacteriano e atividade enzimática para cada linhagem e consórcio bacteriano.

Para cada linhagem bacteriana, observou-se a produção ativa da enzima lipase em meio de cultura contendo óleo residual de fritura como fonte de carbono. A *Pseudomonas* sp e o consórcio bacteriano apresentaram as maiores atividades enzimáticas, com valores máximos de 226 U/L e 259 U/L, respectivamente. O crescimento bacteriano foi mais expressivo para *Acinetobacter seifertii* e o consórcio, atingindo uma densidade óptica de 2,3 a 600 nm. Por outro lado, *Achromobacter*

xylosoxydans demonstrou resultados intermediários em comparação às outras linhagens, com uma atividade enzimática de 33,1 U/L e uma densidade óptica de 0,19.

Conforme o estudo de GUO et al (2021) destaca o potencial inexplorado do microbioma do fundo do mar para a produção de enzimas com características únicas, especialmente lipases ativas a baixas temperaturas, que podem ter um impacto significativo em várias aplicações industriais. A cepa *Pseudomonas marinensis* gcc21 e suas lipases representam uma contribuição valiosa para o campo da biotecnologia e da enzimologia.

A lipase 1 mostrou atividade específica de 2,5 U/mg em um amplo intervalo de pH (5,0 a 11,0), com a maior atividade e estabilidade também a pH 8,0. E a lipase 2 com 5 U/mg com características semelhantes.

Conforme Reddy et al (2022) a atividade enzimática e o índice de emulsificação são parâmetros importantes na avaliação de biosurfactantes. No estudo, a cepa *Achromobacter xylosoxidans* GSR21 apresentou uma atividade biosurfactante significativa, com um índice de emulsificação (E24) máximo de 62%, comparável a 72% do lauril sulfato de sódio. A atividade enzimática, medida por métodos como a atividade de lipase, também foi avaliada, indicando a capacidade do microrganismo em degradar hidrocarbonetos. Assim, a comparação entre esses parâmetros revela a eficácia do biosurfactante produzido em aplicações ambientais e industriais.

Por meio de KHAN et al (1966) a atividade enzimática da lipase extracelular de *Achromobacter lipolyticum* é otimizada a um pH de 7,0 e a uma temperatura de 37 °C. A enzima é relativamente estável ao calor, perdendo apenas 47% de sua atividade após 180 minutos a 71 °C, mas inativa completamente a 99 °C em 4 minutos ou após autoclave a 121 °C por 15 minutos, apresentando valor máximo de 30 U/mL. A presença de sais, especialmente MgCl₂, estimula a atividade da lipase, que é eficaz na hidrólise de glicerídeos naturais e sintéticos, com melhor desempenho em emulsões de gordura do leite.

A análise de dados demonstra que os picos de atividade enzimática ocorrem em momentos distintos dos picos de crescimento bacteriano, caracterizando um modelo de produção enzimática não associada ao crescimento celular. Essa dissociação sugere que a síntese de lipases está mais diretamente relacionada à disponibilidade de substrato e

ao estágio fisiológico das células — particularmente à fase estacionária ou de transição — do que à densidade populacional propriamente dita. Esse padrão é indicativo de uma produção secundária, frequentemente regulada por sinais metabólicos e condições ambientais específicas.

Além disso, ao analisar a atividade enzimática acumulada ao longo do tempo de incubação, observou-se um aumento contínuo na produção de lipase pelo consórcio e pela *Pseudomonas* sp ao longo de 7 dias, indicando que essas linhagens são promissoras para aplicações biotecnológicas que requerem produção sustentada de enzimas.

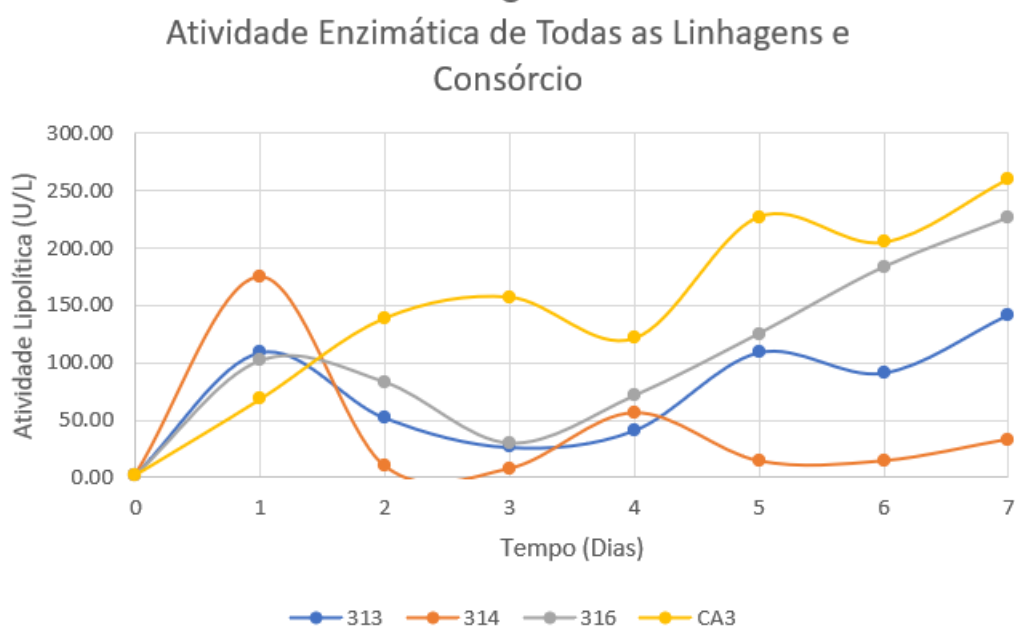


Figura 21: Atividade enzimática de todas as linhagens e consórcio num único gráfico.

Conforme TUYSUZ et al (2019) atividade enzimática máxima de lipase, produzida pela bactéria *Bacillus licheniformis* A7 sob condições ótimas, foi de 1607 U/L. As condições ideais para essa produção incluíram uma concentração de óleo de fritura de 40 mL/L, temperatura de 55 °C, pH inicial de 6, 0 e um tempo de incubação de 72 horas. Além disso, a máxima taxa de crescimento celular foi de 2.219 OD600nm. Esses dados destacam a eficiência da cepa na produção de lipase utilizando óleo de fritura como substrato.

5.4 Análise eletroforética de proteínas por SDS-PAGE

As proteínas presentes nos sobrenadantes das culturas de cada bactéria foram analisadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O objetivo foi verificar se havia variação no perfil de proteínas produzidas ao longo do tempo ou se ocorria a produção de um único tipo de enzima, com possível variação na atividade enzimática durante o tempo de incubação.

Utilizando 5 µg de proteínas por poço, foi possível observar a separação das bandas proteicas com mais nitidez, conforme ilustrado na Figura 22. O padrão molecular utilizado foi o BlueEye Prestained Marker 10-245 kDa (Jenas Bioscience, com faixas de massa molecular variando de 10 a 257 kDa).

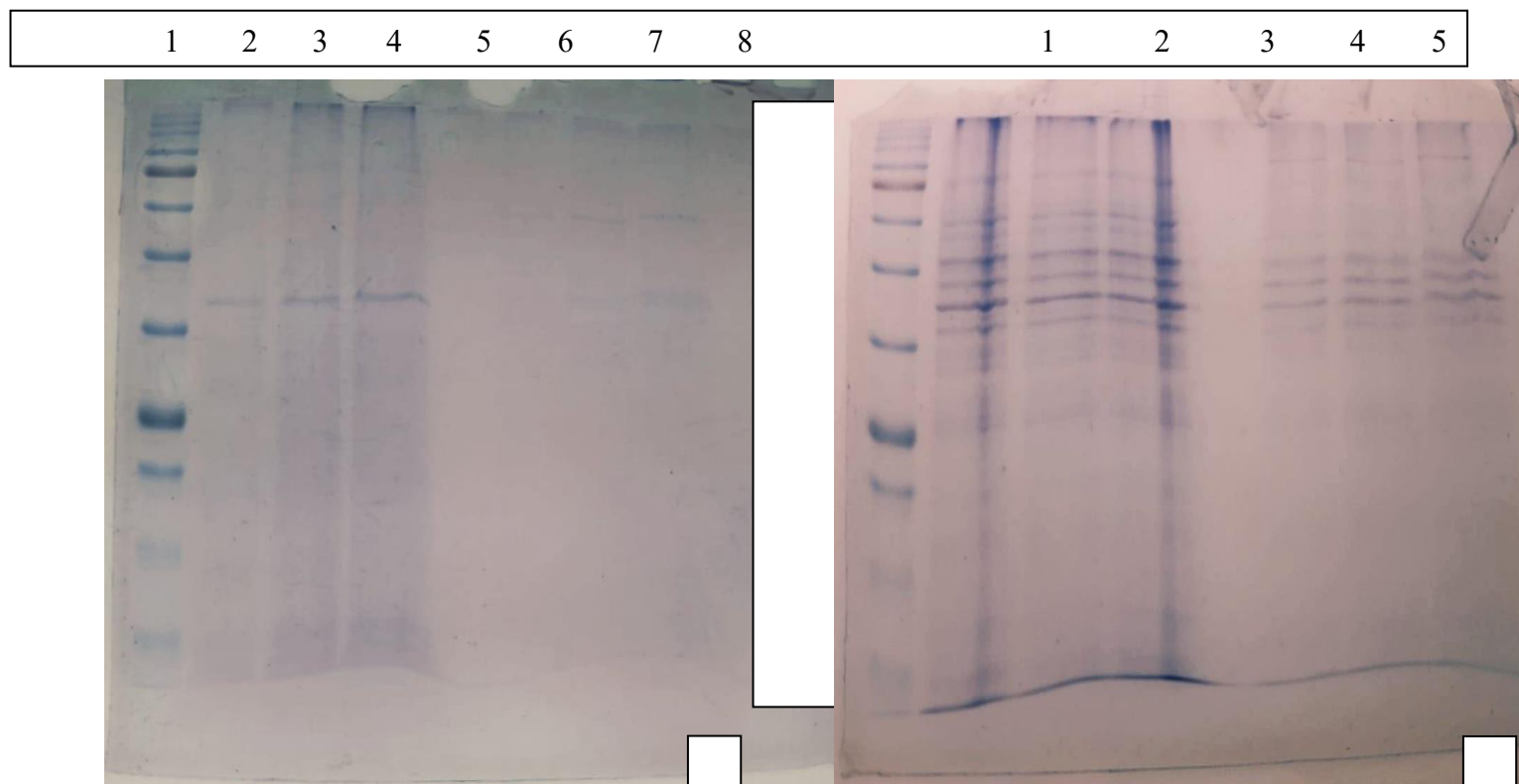


Figura 22: Gel de SDS-PAGE – (A) *A. seifertii* nos poços 2, 3 e 4 e *A. xylosoxydans* nos poços 6, 7 e 8. (B) Consórcio bacteriano nos poços 2, 3 e 4 e *Pseudomonas* sp nos poços 6, 7 e 8. Em ambos os géis apresentam o padrão no poço 1.

Os géis com a dosagem de proteínas de 5 µg foram o suficiente para conseguir resultados com as bandas mais visíveis comparado aos extratos brutos concentrados. De forma que se pode observar bandas obtidas nas linhas próximas de 46 kDa a 55 kDa, 55

kDa a 77 kDa, 110 kDa e 135 kDa a 203 kDa. A literatura apresenta diversas bactérias produtoras de enzimas lipolíticas, citações de FURINI (2018); ABDELLA (2023); RABANI (2014); ZARINVIARSAGH (2017); THI PHAN (2021), por exemplo a: *Acromobacter*; *Alcalígenes*; *Burkholderia*; *Cromobactéria*; *Pseudomonas*; *Acinetobacter*; *Brevibactéria*; *Enterobacter*; *Bacillus*; *Staphylococcus*.

Conforme estes autores, cada linhagem possui um diferencial de lipase conforme o crescimento e adaptabilidade da bactéria no meio em que sobrevive, obtendo lipases que suportam ambientes mais quentes ou frios, com temperaturas mais ou menos altas, pH mais ácido ou alcalino e, incluindo, resistência a ambientes críticos.

No estudo de Guo et al. (2021), a análise da lipase bruta de *Pseudomonas* revelou múltiplas bandas em eletroforese (SDS-PAGE), indicando a presença de proteínas contaminantes. Após precipitação com sulfato de amônio a 60%, observou-se a redução para cinco bandas, sugerindo uma purificação parcial. A etapa final de cromatografia em coluna (Sephadex G-100) permitiu isolar uma banda única, correspondente à massa molecular de 65 kDa, evidenciando a eficiência do método em refinar a enzima alvo.

Em paralelo, Rabanni et al. destacam a importância da prospecção de lipases psicrotolerantes – enzimas capazes de manter atividade metabólica em baixas temperaturas. Essa abordagem visa ampliar o potencial biotecnológico de lipases em processos industriais que demandam operação sob condições não convencionais, como ambientes refrigerados ou polares.

A comparação das massas moleculares reportadas para lipases de diferentes espécies (Quadro 3) reforça a relação entre a diversidade estrutural dessas enzimas e sua adaptação a nichos ambientais específicos. A variação no perfil de bandas entre amostras brutas e purificadas, como observado por Guo et al. (2021), também ressalta a necessidade de padronização metodológica para garantir reprodutibilidade em estudos enzimáticos.

Linhagem Estudada	Linhagem da	Banda Obtida (KDa)	Banda Literat	Autor
-------------------	-------------	--------------------	---------------	-------

	Literatura		ura (KDa)	
Acinetobacter seifertii.	<i>Acinetobacter</i> sp.	46 a 55	23 a 62	Furini (2018); Carvalho (2015) Kim, et al (1998)
Pseudomonas sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>P. aeruginosa</i>	55 a 77	20 a 75	Maria (2023) Guo (2021) Kim, et al (1998)
Achromobacter xylosoxidans.	<i>Achromobacter</i> sp.	135 a 203	32 a 58	Thi phan (2021) Meneses (2020)

Quadro 5: Comparação das faixas de massa molecular das bandas proteicas obtidas neste estudo com dados de linhagens semelhantes descritas na literatura.

O estudo de lipases adentra diversos ramos industriais e estes resultados obtidos caminham para mais uma fonte de obtenção de enzimas lipolíticas provenientes de bactérias da região amazônica utilizando o resíduo poluidor oleoso e transformando em material de alto valor agregado e futuramente num processo de refinamento, deverá ser possível agregar valores cada vez maiores, pois entendesse que o desenvolvimento do ser humano é atrelado a maior formação de resíduos e cabe ao corpo científico a demanda de encontrar novas vias, possibilidades e soluções biotecnológicas.

6. CONCLUSÃO

A lipase é uma biomolécula de alto potencial de aplicação industrial e este trabalho propôs o uso de produção enzimática a partir do resíduo do restaurante universitário, óleo de fritura residual através do consórcio bacteriano que apresentou resultados positivos através das análises enzimáticas obtidas.

As melhores atividades enzimáticas foram obtidas através da *Pseudomonas sp* e do consórcio bacteriano no sétimo dia de produção, 226 U/L e 259 U/L, respectivamente, enquanto a *Acinetobacter seifertii* e *Achromobacter xylosoxidans* obtiveram respectivamente, 141 U/L e 33 U/L.

Através da separação de proteínas por SDS-PAGE demonstrou resultado de bandas próximas a da literatura como da *A. seifertii* e *Pseudomonas sp*, enquanto *A. xylosoxidans* era esperado por volta de 32 a 25KDa, mas foi obtido valor de 135 a 203 KDa.

Resultados que foram inicialmente vasculhados geneticamente através da anotação genômica que o consórcio apresentou genes para a degradação de lipídios através do software RAST principalmente pelo subsistemas de ácidos graxos, lipídios e isoprenóides e investigação de rotas metabólicas por software KEGG como rotas de síntese de fosfatodicolina a partir de lisofosfolipídios, síntese de monoacilglicerol através das lipases de triacilglicerol que participam das indústrias de produção de biodiesel.

A plataforma KBASE foi possível confirmar a conversão de ácidos graxos de cadeia curta e álcool com conversões em comum de piruvato em acetil coenzima, acetato, lactato L/D e produção de álcool.

E para a disponibilidade deste consórcio para o escalonamento do processo foi verificada a resistência a antibióticos que resultou em apenas uma resistência na bactéria *Pseudomonas*, enquanto a *A. xylosoxidans* e *A. seifertii* apresentaram apenas estruturas semelhantes do banco de dados.

7. PRETENSÕES FUTURAS

O trabalho possui o potencial de avaliação de escalonamento de processo, avaliação de engenharia genética a fim de aumentar a produção e manipulação do meio de cultura para aumentar a produção enzimática e focar na geração de biomoléculas.

Outro caminho importante é na avaliação degradativa e quantitativa de resíduos oleosos em tanques bioprocessuais de região tubular ou de área circular com tempos de retenção específicos para exibição de resultados no segmento de biorremediação

8. REFERÊNCIAS:

- ABDELLA, B., Youssif, A. M., SABRY, S. A., & GHOZLAN, H. A. (2023). Production, purification, and characterization of cold-active lipase from the psychrotroph *Pseudomonas* sp. A6. **Brazilian Journal of Microbiology**, 54(3), 1623-1633, 2023.
- ABREU, G.F.; TALAMINI, V.; STADNIK, M.J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, 34, n.1, p. 78-82, 2008.
- ADETUNJI, A. I., & OLANIRAN, A. O. (2021). Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, 52, 1257-1269.
- AGUIAR, G. P. S., MARTINS, V. G., MARTINS, P. C. C., BOSCHERO, R. A., & PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. (2018). Produção de lipase microbiana a partir de resíduos de corvina. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, 10(1), Páginas-118;
- Akram, F., Mir, A. S., Haq, I. U.; Roohi, A. (2023). An appraisal on prominent industrial and biotechnological applications of bacterial lipases. **Molecular Biotechnology**, 65(4), 521-543.
- AHMED, F. et al. Emerging technologies for lipase detection in dairy: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 136, p. 106802, 1 dez. 2024.
- AKHTER, K. et al. Optimization and characterization of alkaliphilic lipase from a novel *Bacillus cereus* NC7401 strain isolated from diesel fuel polluted soil. **PLOS ONE**, v. 17, n. 8, p. e0273368, 30 ago. 2022.
- AKTAR, L.; SAHA, M. L. Optimization of cultural parameters for lipase production by indigenous *Stenotrophomonas* sp. and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lipid-rich environments. **Bangladesh J. Bot.**, p. 979–988, 2023.
- ALBINO, T. N.; ARGOLO, A. **Tratamento dos resíduos oleosos provenientes da exploração offshore de petróleo: análise da eficiência ambiental**. Centro Universitário CIMATEC, 2021.
- ALMEIDA, K. F. B. DE et al. **Impactos ambientais causados pelo descarte incorreto de óleo lubrificante nas oficinas mecânicas – ISSN 1678-0817 Qualis B2**. Disponível em: <<https://revistaft.com.br/impactos-ambientais-causados-pelo-descarte-incorreto-de-oleo-lubrificante-nas-oficinas-mecanicas/>>. Acesso em: 8 fev. 2025.
- ARPIGNY, J. L., & JAEGER, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical journal**, 343(1), 177-183. 1999;
- ASSUNÇÃO, P. **Uso de bioaditivo na redução de óleos e graxas em efluente de caixa de gordura**. Engenharia Ambiental e Sanitária-Pedra Branca, 2019;

ATANASOVA, N. et al. A Thermostable Lipase Isolated from *Brevibacillus thermoruber* Strain 7 Degrades ϵ -Polycaprolactone. **BioTech**, v. 12, n. 1, p. 23, mar. 2023.

AUCH, A. F., VON JAN, M., KLENK, H. P., & GÖKER, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Standards in genomic sciences**, 2, 117-134, 2010.

AYED, H. B., JEMIL, N., MAALEJ, H., BAYOUDH, A., HMIDET, N., E NASRI, M. **Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. International Biodeterioration & Biodegradation**, 99, 8–14, 2015.

BAGI, K.; SIMON, L. M.; SZAJÁNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 7, p. 531–535, 15 maio 1997.

BALTACI, M. Ö., TUYSUZ, E., OZKAN, H., TASKIN, M., & ADIGUZEL, A. (2019). Lipase production from thermophilic bacteria using waste frying oil as substrate. **Teknik Bilimler Dergisi**, 9(3), 23-27, 2019.

BARBOSA, C. S., BÜCKER, F., SANTESTEVAN, N. A., SOUZA, M. M. D., & BENTO, F. M. (2010). **Produção de enzimas lipase e esterase e biossurfactantes por bactérias e leveduras isoladas de borra oleosa**; 2010.

BARBOSA, J. M. P. et al. Biochemical characterisation of lipase from a new strain of *Bacillus* sp. ITP-001. **Química Nova**, v. 35, p. 1173–1178, 2012.

BARROS, R. F. **Expressão heteróloga de duas lipases em *Komagataella phaffii* utilizando promotores constitutivos**; 2019.

BASTOS, A. B. D. **Produção e aplicação de lipase fúngica na degradação do efluente de uma indústria de sorvetes**; Monografia, Universidade Caxias do Sul, 2019.

BHARATHI, D., & RAJALAKSHMI, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 22, 101368;

BISHT, D.; YADAV, S. K.; DARMWAL, N. S. An oxidant and organic solvent tolerant alkaline lipase by *P. aeruginosa* mutant: downstream processing and biochemical characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1305–1314, dez. 2013.

BORA, L.; BORA, M. Optimization of extracellular thermophilic highly alkaline lipase from thermophilic *Bacillus* sp isolated from hot spring of Arunachal Pradesh, India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 30, 1 jun. 2012.

BORKAR, P. S., BODADE, R. G., RAO, S. R., & KHOBRADE, C. N. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40, 358-366, 2009.

CAIXETA, E. S. **Aplicação de fungo em fermentação submersa como alternativa de biodegradação de resíduo de óleo de cozinha**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

CASAS-GODOY, L.; GASTEAZORO, F.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; MARTY, A.; SANDOVAL, G. Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, **Methods in Molecular Biology**, vol. 1835, 2018;

CASTRO, H. F. DE et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146–156, fev. 2004.

CHANDRA, P., SINGH, R., & ARORA, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, 19(1), 169;

CHEN, C. S.; SIH, C. J. (1989). General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: The use of lipases [new synthetic methods (76)]. **Angewandte Chemie International Edition in English**, 28(6), 695-707;

CONVENÇÃO SOBRE A DIVERSIDADEBIOLÓGICA.**Decreto legislativo nº 2, de 5 de junho de 1992**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/cdbport_72.pdf> Acessado em 02 de Maio de 2023;

CORRÊA, Livia Pita; GUIMARÃES, Vitor Nunes; HESPANHOL, Láine Ignácio; SILVA, Jonathan Velasco da. Impacto ambiental causado pelo descarte de óleo: estudo do destino que é dado para o óleo de cozinha usado pelos moradores de um condomínio residencial em Campos dos Goytacazes - RJ. **R. bras. Planej. Desenv.**, Curitiba, v. 7, n. 3, Edição Especial Fórum Internacional de Resíduos Sólidos, p. 341-352, ago. 2018.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. DE. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, p. 863–873, dez. 1999.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. DA G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623–630, ago. 2004.

DEGÓRSKA, O. et al. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 281, p. 136221, 1 nov. 2024.

DE LIMA CAMPOS, L., & DE OLIVEIRA, J. C. M. D. **Bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse industrial a partir de amostras de compostagem**, 2019;

DE MATOS, G. P.; ZAGONEL, J. T. TRATAMENTO AERÓBIO DE ESGOTO EMPREGANDO A TÉCNICA DE BIOAUMENTAÇÃO: Tratamento aeróbio de esgoto por bioaumentação. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 18, n. 1, p. 105-115, 2021;

DEMİRKAN, E.; AYBEY ÇETİNKAYA, A.; ABDOLU, M. Lipase from new isolate *Bacillus cereus* ATA179: optimization of production conditions, partial purification, characterization and its potential in the detergent industry. **Turkish Journal of Biology**, v. 45, n. 3, p. 287–300, 23 jun. 2021.

EL-KURDI, N., EL-SHATOURY, S., ELBAGHDADY, K., HAMMAD, S., & GHAZY, M. (2024). Biodegradation of polystyrene nanoplastics by *Achromobacter xylosoxidans* M9 offers a mealworm gut-derived solution for plastic pollution. **Archives of Microbiology**, 206(5), 1-24, 2024.

ENESPA, P. C.; DEVENDRA, P. S. (2022): Sources, purification, immobilization and industrial applications of microbial lipases: An overview, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, DOI: 10.1080/10408398.2022.2038076;

FARIAS, Cyndy Mary de Mello. **Produção e Caracterização de Lipases por *Aspergillus* da Micoteca URM Utilizando Resíduo de Licuri (*Syagrus coronata*) (Martius) Beccari como Substrato**. 2013. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

FERREIRA, P. G.; FERREIRA, V. F. Aqui tem química: supermercado Parte I. Óleos e gorduras. **Revista Virtual de Química**, v. 14, p. 185-199, 2022;

FURINI, G., BERGER, J. S., CAMPOS, J. A., SAND, S. T., & GERMANI, J. C. (2018). Production of lipolytic enzymes by bacteria isolated from biological effluent treatment systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 90, 2955-2965, 2018.

GARRIDO, J. V. M. L.; BISPO, D. F.; SILVA, C. F. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase e otimização da produção enzimática. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, 2018;

GLOGAUER, A. **Isolamento de clones com atividade lipolítica do metagenoma de solo contaminado com gordura animal e caracterização de uma nova e eficiente lipase**. Tese (Doutorado em Ciências – Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, 2011;

GODOI CONTESSOTO, V. D., OLIVEIRA JUNIOR, A. B. D., CHAHINE, J., OLIVEIRA, R. J. D., & PEREIRA LEITE, V. B. (2018). Introdução ao problema de enovelamento de proteínas: uma abordagem utilizando modelos computacionais simplificados. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, 40;

GOLANI, M. EVALUATION OF NOVEL IMMOBILIZED LIPASE FROM *Staphylococcus argenteus* MG2 AND ITS APPLICATION AS DETERGENT

ADDITIVE. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 13, n. 6, p. e10224–e10224, 11 mar. 2024.

GOMES, E., GUEZ, M. A. U., MARTIN, N., & SILVA, R. D. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, 30, 136-145;

GUEDES, E. H. S., DOS SANTOS, A. L., IBIAPINA, A., AGUIAR, A. O., DA SILVA SOARES, C. M., VELLANO, P. O.; JUNIOR, A. F. C. (2021). Agro-industrial waste as a substrate for the production of microbial lipases: a review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e30710212537, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12537;

GUO, C., ZHENG, R., CAI, R., SUN, C., & WU, S. (2021). Characterization of two unique cold-active lipases derived from a novel deep-sea cold seep bacterium. **Microorganisms**, 9(4), 802, 2021.

HERMANSYAH, H. et al. Production of Dry Extract Lipase from *Pseudomonas Aeruginosa* by the Submerged Fermentation Method in Palm Oil Mill Effluent. **International Journal of Technology**, v. 9, n. 2, p. 325–334, abr. 2018.

HONÓRIO, C. As soluções para resíduo de óleo de cozinha — **Universidade Federal da Paraíba - UFPB Pró-Reitoria de Extensão**. Disponível em: <https://www.ufpb.br/proex/contents/noticias/noticias-das-acoes-de-extensao/noticias-das-acoes-de-extensao_4/as-solucoes-para-residuo-de-oleo-de-cozinha>. Acesso em: 8 fev. 2025.

IQBAL, S. A.; REHMAN, A. Characterization of Lipase from *Bacillus subtilis* I-4 and Its Potential Use in Oil Contaminated Wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 789–797, out. 2015.

JAEGER, K. E., & EGGERT, T. (2002). Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, 13(4), 390-397;

INAN BEKTAS, K., NALCAOĞLU, A., CEYLAN, E., COLAK, D. N., CAGLAR, P., Agirman, S., ... & BELDUZ, A. O. (2023). Isolation and characterization of detergent-compatible amylase-, protease-, lipase-, and cellulase-producing bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 54(2), 725-737, 2023.

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, p 315-351, 1999;

KARAMAN, F. et al. A New Enzyme for Biodiesel Production and Food Applications: Lipase of *Bacillus megaterium* F25 Isolated From an Aquatic Insect *Rhantus suturalis*. **GCB Bioenergy**, v. 16, n. 12, p. e70009, 2024.

KHAN, F. I., LAN, D., DURRANI, R., HUAN, W., ZHAO, Z., & WANG, Y. (2017). The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 5, 16, 1967.

KHAN, I. M., DILL, C. W., CHANDAN, R. C., & SHAHANI, K. M. (1967). Production and properties of the extracellular lipase of *Achromobacter lipolyticum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, 132(1), 68-77.

KOBLITZ, Maria Gabriela Bello; PASTORE, Gláucia Maria. Purificação e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por uma nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 494-502, maio/jun. 2006.

KOTOGÁN, A., FURKA, Z. T., KOVÁCS, T., VOLFORD, B., PAPP, D. A., VARGA, M., ... & TAKÓ, M. (2022). Hydrolysis of edible oils by fungal lipases: An effective tool to produce bioactive extracts with antioxidant and antimicrobial potential. **Foods**, 11(12), 1711, 2022.

LEE, I., OUK KIM, Y., PARK, S. C., & Chun, J. (2016). OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 66(2), 1100-1103, 2016.

LEE, L. P., KARBUL, H. M., CITARTAN, M., GOPINATH, S. C., LAKSHMIPRIYA, T., & TANG, T. H. (2015). Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. **BioMed research international**, 2015;

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. 6ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2014;

LIU, M. et al. A comprehensive review of recombinant technology in the food industry: Exploring expression systems, application, and future challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 24, n. 2, p. e70078, 2025.

LUZ, B. D. S. **Produção de lipases visando-se aplicações industriais empregando-se micro-organismos selecionados na bioprospecção realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco/MG**. Dissertação para a obtenção de mestre em Ciências com ênfase em: Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável, 2014.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Food Science and Technology**, v. 17, p. 115–119, ago. 1997.

MAJUMDER, D. et al. Use of genomics & proteomics in studying lipase producing microorganisms & its application. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 9, p. 100218, 30 dez. 2024.

MARTINS, P. A. **Lipases microbianas: prospecção, produção e aplicação.** , 2021.

MEIER-KOLTHOFF, J. P., CARBASSE, J. S., PEINADO-OLARTE, R. L., & GÖKER, M. (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. **Nucleic acids research**, 50(D1), D801-D807, 2022.

MELO, P. M. G. DE; CORIOLANO, A. C. F.; ARAÚJO, A. S. DE. ANÁLISE E PROPOSTA DE DESTINAÇÃO DE RESÍDUO DE PETRÓLEO, BORRA OLEOSA E SEU IMPACTO NO MEIO AMBIENTE. **Educação Ambiental em Ação**, v. XI, n. 43, 10 set. 2018.

MONTE, Elvis Francisco do; FAGUNDES, Tiana Cibele; XIMENES, Amanda Fagundes; MOURA, Fábila da Silva; COSTA, Amanda Rodrigues Santos. Impacto ambiental causado pelo descarte de óleo: Estudo de caso da percepção dos moradores de Maranguape I, Paulista – PE. **Revista GEAMA**, Recife, v. 1, n. 2, p. 205-219, 2015.

MILAN, A. et al. **Influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da lipase produzida por aspergillus sp. via fermentação em estado sólido**, Universidade Federal de Passo Fundo, Simpósio de Alimentos para a Região Sul, 2007.

MOBARAK-QAMSARI, E.; KASRA-KERMANSHAHI, R.; MOOSAVI-NEJAD, Z. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 92–98, jun. 2011.

MOUAD, A. M. et al. Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p. 64–68, 1 abr. 2016.

MURZIN, A.G.; BRENNER, S.E.; HUBBARD, T.; CHOTHIA, C. SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. **Journal Molecular Biology**, v. 247, p. 536-540, 1995;

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

NG, A. M. J., ZHANG, H., & NGUYEN, G. K. T. (2021). Zymography for picogram detection of lipase and esterase activities. **Molecules**, 26(6), 1542.

NOORMOHAMADI, R. et al. Characterization of a lipase from a newly isolated *Pseudomonas* sp. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 422–427, dez. 2013.

OLIVEIRA, A. C. D., Fernandes, M. L., & Mariano, A. B. (2014). Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45, 1503-1511;

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

PASSOS, R. M. DOS et al. Ethyl biodiesel production from crude soybean oil using enzymatic degumming-transesterification associated process. **Industrial Crops and Products**, v. 222, p. 119930, 15 dez. 2024.

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. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 135–140, ago. 2003.

PEIXOTO, F. B. S., DA CUNHA PEIXOTO, J. C., SARAIVA, A. B. F., RUIZ, M. M., PEIXOTO, A. T. M., PEREIRA, J. O., & ASTOLFI-FILHO, S. (2021). Microrganismos isolados de ambientes aquáticos da Amazônia produtores de hidrolases de interesse industrial e biotecnológico. **Revista Geintec- Gestão Inovação e Tecnologias**, 11(1), 5795-5808;

PEIXOTO, R.M. **Bioprospecção de micro-organismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo, 2008;

PHAM, V. H. T., KIM, J., CHANG, S., & CHUNG, W. (2021). Investigation of lipolytic-secreting bacteria from an artificially polluted soil using a modified culture method and optimization of their lipase production. **Microorganisms**, 9(12), 2590, 2021.

PIMENTEL, P. S. S. R., DE OLIVEIRA, J. B., ASTOLFI-FILHO, S., & PEREIRA JR, N. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass using an optimized enzymatic cocktail prepared from secretomes of filamentous fungi isolated from Amazonian biodiversity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 193(12), 3915-3935, 2021.

RABBANI, M., SHAFIEE, F., SHAYEGH, Z., MIRMOHAMMADSADEGHI, H., Shariat, Z. S., ETEMADIFAR, Z., & MOAZEN, F. (2015). Isolation and characterization of a new thermoalkalophilic lipase from soil bacteria. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, 14(3), 901, 2015.

REDDY, G. S., REDDY, M. M., Gnanasree, B., BHAVANA, P., SARVANI, V. V. N. S., Preethi, P., ... & Reddy, N. K. (2022). Isolation, Screening, Characterization And Application Of Biosurfactant By *Achromobacter xylosoxidans* Strain GSR21 Producing

Bacteria From Hydrocarbons Contaminated Soil.(2022). **Int. J. Life Sci. Pharma Res**, 12(1), 154-169, 2022.

REINEHR, C. O. **Produção de lipases de *Aspergillus* spp. por fermentação em estado sólido seguida de separação e concentração utilizando membranas**. Tese de Doutorado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2015.

RHEE, J.-K. et al. New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to the Hormone-Sensitive Lipase Family, Cloned from a Metagenomic Library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 817–825, fev. 2005.

REN, J., FAN, B., NIU, D., GU, Y., & LI, C. (2021). Biodegradation of waste cooking oils by *Klebsiella quasivariicola* IUMR-B53 and characteristics of its oil-degrading enzyme. **Waste and Biomass Valorization**, 12, 1243-1252;

RIGO, D., GAYESKI, L., TRES, G. A., CAMERA, F. D., ZENI, J., VALDUGA, E., ... & BACKES, G. T. (2021). Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão/Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, 7(1), 9232–9254.

RIOS, C. **Efeito da dieta à base de inseto (*Nauphoeta cinerea*) no crescimento, sistema imune, atividade enzimática, capacidade antioxidante e microbiota em *Litopenaeus vannamei***. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2022.

SANDOVAL, G., CASAS-GODOY, L., BONET-RAGEL, K., RODRIGUES, J., FERREIRA-DIAS, S., & VALERO, F. (2017). Enzyme-catalyzed production of biodiesel as alternative to chemical-catalyzed processes: advantages and constraints. **Current Biochemical Engineering**, 4(2), 109-141;

SANTOS, C. I. A. dos; SALGADO, C. A.; VANETTI, M. C. D. Bacterial lipases: impacts on dairy product quality and biotechnological potential. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 13, p. e230101321213, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.21213;

SANTOS, J. F. D. (2021). ***Sinergismo entre cepas de um consórcio bacteriano degradador de diesel isolado do Rio Negro***;

SARATALE, R. G., SARATALE, G. D., & CHANG, J. S. (2017). Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs): um olhar crítico sobre a linhagem de microrganismos e estratégias de biodegradação. **Environmental Research**, 156, 818-834;

SARMAH, N., REVATHI, D., SHEELU, G., YAMUNA RANI, K., SRIDHAR, S., MEHTAB, V., & SUMANA, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology progress**, 34(1), 5-28;

SAYALI, K.; SADICHHA, P.; SUREKHA, S. Microbial Esterases: An overview. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 7, p.135-146, 2013;

SHAFFER M, BORTON MA, BOLDUC B, FARIA JP, FLYNN RM, GHADERMAZI P, EDIRISINGHE JN, WOOD-CHARLSON EM, MILLER CS, CHAN SHJ, SULLIVAN MB, HENRY CS, WRIGHTON KC. kb DRAM: annotation and metabolic profiling of genomes with DRAM in KBase. *Bioinformatics*. 2023 Apr 3;39(4):In: **Bioinformatics**, 2024.

SHART, A. O. B.; ELKHALIL, E. A. I. Biochemical Characterization of Lipase Produced by *Bacillus* spp. Isolated from Soil and Oil Effluent. **Advances in Enzyme Research**, v. 8, n. 4, p. 39–48, 29 dez. 2020.

SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C. E MACRAE, I. C. (1987) Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **Journal of Microbiology Methods**, v. 6, p. 123-137;

SHI, J., CHEN, Y., LIU, X., & LI, D. (2021). Rhamnolipid production from waste cooking oil using newly isolated halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* M4. **Journal of Cleaner Production**, 278, 123879;

SILVA, F. B. **Estudo das interações não-nativas, eletrostáticas e hidrofóbicas, no processo de enovelamento de proteínas utilizando modelos minimalistas**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, 2021;

SINGH, R., GUPTA, N., GOSWAMI, V. K., & GUPTA, R. (2006). A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied microbiology and biotechnology**, 70, 679-682;

SOUSA, V. R. G. D. (2019). **Óleo residual de fritura: biodegradação por bactérias *Pseudomonas* sp. e *Oceanimonas baumannii***;

SOUSA, V.Y.K. **Bioprospecção de antimicrobianos entre bactérias ambientais e plantas medicinais da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília. 2012;

SUGANUMA, T.; KATAOKA, Y.; UEHARA, H. “Powdered” lipases as industrial catalysts: Production of Interesterified, structured lipids. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 102, n. 1, 2024.

SUNDHEIM, G.; ZIMMER, T.-L.; ASTRUP, H. N. Isolation and Characterization of Lipoprotein Lipase Activators from Bovine Blood Serum. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 3, p. 407–414, 1 mar. 1983.

TAPIZQUENT, M., FERNÁNDEZ, M., BARRETO, G., HERNÁNDEZ, Z., CONTRERAS, L. M., KURZ, L., & WILKESMAN, J. (2017). Zymography detection

of a bacterial extracellular thermoalkaline esterase/lipase activity. **Zymography: Methods and Protocols**, 295-300, 2017.

ULLAH, S., MALOOK, I., BASHAR, K. U., RIAZ, M., ASLAM, M. M., REHMAN, Z. U., ... & JAMIL, M. (2016). Purification and Application of Lipases from *Pseudomonas* Species: Lipases from *Pseudomonas* Species. **Biological Sciences-PJSIR**, 59(2), 111-116, 2016.

UNO, H. et al. Modular Synthesis of Medium-Sized Fluorinated and Nonfluorinated Heterocyclic Lactones by Sequential CN-Bond-Cleaving Ring Expansion under Pd Catalysis. **ACS Catalysis**, v. 10, n. 23, p. 14117–14126, 2020.

YASEMİN, S.; ARABACI, N.; GÜVENMEZ, H. K. **Production of Cold Active Lipase from *Bacillus* sp.** 2017.

VICI, A. C., DA CRUZ, A. F., FACCHINI, F. D., DE CARVALHO, C. C., PEREIRA, M. G., FONSECA-MALDONADO, R., ... & POLIZELI, M. L. (2015). *Beauveria bassiana* lipase A expressed in *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* with potential for biodiesel catalysis. **Frontiers in Microbiology**, 6, 1083;

ZAINUDIN, M. H. M. et al. A highly thermostable crude endoglucanase produced by a newly isolated *Thermobifida fusca* strain UPMC 901. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13526, 19 set. 2019.

Zambare, V., Patankar, R., Bhusare, B., & Christopher, L. (2021). Recent advances in feedstock and lipase research and development towards commercialization of enzymatic biodiesel. **Processes**, 9(10), 1743;

ZARINVIARSAGH, M., EBRAHIMIPOUR, G., & SADEGHI, H. (2017). Lipase and biosurfactant from *Ochrobactrum intermedium* strain MZV101 isolated by washing powder for detergent application. **Lipids in health and disease**, 16, 1-13, 2017.

ZAVARISE, J. P.; PINOTTI, L. M. Avanços em caracterização bioquímica de lipases microbianas: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. e104942897-e104942897, 2020.

ZOUAOU, B.; ABBOUNI, B.; GHALEM, B. RAHO. Isolation, purification and properties of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Isolation, purification and properties of lipase from *Pseudomonas aeruginosa***, v. 11, n. 60, p. 12415–12421, 2012.