
Lipases: Biocatalizadores da Hidrólise de Triacilgliceróis

Lipases: Biocatalysts of the Hydrolysis of triacylglycerols

Madalena Vaz^{1,2} e Altino Choupina^{1,2};

¹Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal;

²CIMO- Centro de Investigação de Montanha, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal.

e-mail contato: albracho@ipb.pt

Resumo

Os enzimas lipases (E.C.3.1.1.3) pertencem à família das serinas hidrolases, que por sua vez incluem várias enzimas esterases (E.C.3.1.1.1). Uma característica que distingue as lipases das esterases é o facto de serem capazes de realizar a hidrólise de óleos e gorduras em glicerol e ácidos gordos livres na interface óleo-água. Normalmente é aceite que as esterases hidrolisam ligações éster em esteres e triacilgliceróis de cadeia carbónica curta, libertando ácidos gordos de baixo peso molecular, já as lipases hidrolisam preferencialmente triacilgliceróis de cadeia longa. As lipases microbianas apresentam uma grande diversidade de aplicações industriais tais como na indústria farmacêutica, alimentar, de detergentes entre outros.

Abstract

The enzyme lipase (EC3.1.1.3) belongs to the family of serine hydrolases, which in turn to include various enzymes esterase (EC3.1.1.1). One feature that distinguishes lipases from esterases is the fact that they are capable of performing the hydrolysis of oils and fats into glycerol and free fatty acids in the oil-water interface. It is usually accepted that the esterases hydrolyze ester bonds in stacked short carbon chain triacylglycerols, releasing fatty acids of low molecular weight, since lipases hydrolyze long chain triacylglycerols preferentially. Microbial lipases have a wide variety of industrial applications such as in pharmaceuticals, food, detergent and more.

1. Definição

Os enzimas lipases (E.C.3.1.1.3) pertencem à família das serinas hidrolases, que por sua vez incluem várias enzimas esterases. São enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos, libertando ácidos gordos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Também têm a capacidade de catalisar reacções de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos (VILLENEUVE et al., 2000) . Estas enzimas catalisam a hidrólise de óleos e gorduras em glicerol e ácidos gordos livres na interface óleo-água (Figura 1), no entanto, também são capazes de catalisar uma grande variedade de reacções em ambos os meios (aquosos e não aquosos), particularidade que as distingue das esterases (SAXENA et al., 2003) . Uma característica importante das lipases é a sua capacidade de não só hidrolisar ligações éster, para transesterificar triglicéridos e resolver misturas racémicas, mas também de sintetizar ligações éster em meio não aquoso (MACRAE; HAMMOND, 1985).

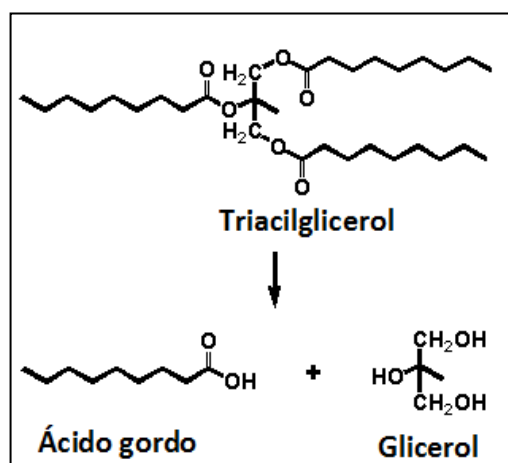


Figura 1. Hidrólise por lipases de triacilglicerol em glicerol e ácidos gordos.

A lipase irá dividir ésteres emulsionados de glicerina e de cadeia longa de ácidos gordos como trioleína (trioleilglicerol, TC18) (SHARMA et al., 2001). Para as esterases, o substrato considerado padrão é a tributirina (tributirilglicerol, TC4), que por sua vez, também pode ser hidrolisada por lipases (JAEGER et al., 1999) .

As lipases são amplamente distribuídas na natureza, e são produzidas por animais, plantas e microrganismos. As maiorias das lipases utilizadas para fins biotecnológicos, tem sido isoladas de bactérias e fungos (LIN et al., 2006) .

Normalmente é aceite que as esterases hidrolisam ligações éster em esteres e triacilgliceróis de cadeia carbónica curta (< 10 carbonos), libertando ácidos gordos de baixo peso molecular, e, por isso também são denominadas esterases não-lipolíticas (CHAHINIAN et al., 2005) ou somente carboxilesterases (BORNSCHEUER, U. T., 2002). Já as lipases hidrolisam preferencialmente triacilgliceróis de cadeia longa (> 10 carbonos).

2. Características cinéticas e físico-químicas

A maioria das lipases apresenta uma faixa óptima de actividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e uma temperatura óptima para uma actividade máxima entre 30 e 40°C. No entanto, estas propriedades podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo. As lipases, geralmente, são glicoproteínas ácidas (HIOL et al., 1999), com massas moleculares entre 20 e 60 kDa. O seu ponto isoeléctrico pode variar entre 4 e 5 (FERRER et al., 2000).

Como as lipases são enzimas hidrossolúveis, vão actuar no metabolismo e digestão dos triacilgliceróis (ALOULOU et al., 2006; SVENDSEN, 2000), apresentando assim uma baixa actividade ou mesmo serem inactivas em substratos solúveis em soluções aquosas. No entanto, apresentam maior actividade quando a concentração do substrato é suficientemente alta para formar agregados micelares ou emulsões, uma vez que têm a capacidade de interagir com a interface dos substratos agregados (SARDA; DESNUELLE, 1958). Esse aumento de actividade, na presença de micelas ou emulsões, deve-se ao fenómeno conhecido como activação interfacial (REIS et al., 2008). No caso da activação de esteres, a situação é diferente, isto porque as esterases catalisam hidrólise de esteres solúveis, trabalhando sem interface e obedecendo às equações de cinética enzimática de Michaelis-Menten, que são válidas apenas se as reacções catalíticas ocorrerem em fases homogéneas.

Dessa forma, a análise das reacções catalisadas por lipases ocorre utilizando-se substrato lipídico sob a forma de emulsão. Ao contrário das lipases, as esterases actuam somente em compostos solúveis em água (VOLPATO et al., 2010).

Este fenómeno, conhecido por activação interfacial, pode ser facilmente observado quando se avalia o efeito da concentração de substrato na actividade enzimática.

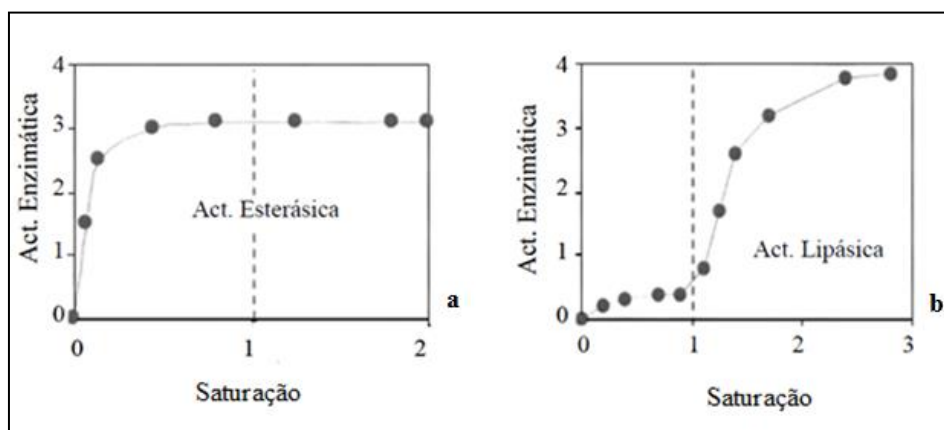


Figura 2. Hidrólise de tríacetina pela lipase pancreática e esterase hepática de porco em função da concentração de substrato (SARDA; DESNUELLE, 1958).

Na figura 2a, observa-se o perfil de actividade da esterase hepática de porco frente a tríacetina em concentrações solúveis e além do seu limite de solubilidade. Na figura 2b, observa-se o perfil de actividade da lipase pancreática de porco frente a tríacetina. Os substratos no estado solúvel são indicados em concentrações abaixo do limite de solubilidade (sinalizada com 1) e concentrações acima deste limite são denominados como substrato no estado agregado.

Este fenómeno de activação interfacial das lipases foi observado por Holwerda et al. (1936) e por Schonheyder e Volquartz (1945). Em ambos os

casos, os trabalhos foram realizados com lipases pancreática de porco. Sarda e Desnuelle (1958) purificaram esta lipase e estudaram detalhadamente este fenómeno, observando que a actividade da lipase sobre a triacetina aumentava, notavelmente, uma vez que esta superava o seu limite de solubilidade. Levantaram-se duas hipóteses, denominadas de modelo da enzima e modelo do substrato.

O modelo da enzima foi proposto por Desnuelle et al. (1960), supondo que a activação interfacial poderia responder a uma mudança conformacional sofrido pelas lipases. Estas reacções não se podem descrever mediante uma reacção de Michaelis-Menten, uma vez que o processo de hidrólise possui diversas etapas (VERGER et al., 1990). No que diz respeito ao modelo do substrato, a activação é explicada com a modificação do substrato lipídico na interface: o aumento da concentração local do substrato no lugar do centro activo vai diminuir a orientação e conformação dos lípidos unidos na interface, relativamente à geometria do centro activo da enzima ou à diminuição do grau de hidratação do substrato (MUDERHWA; BROCKMAN, 1992; SMABY et al., 1994).

3. Características estruturais

Pleiss et al. (1998) compararam a estrutura dos centros activos de diversas lipases e esterases e, como principal conclusão, observaram que os centros das lipases são normalmente mais largos e profundos do que os centros presentes nas esterases, o que poderia explicar a capacidade que as lipases têm de reconhecer substratos mais variados e com cadeias mais longas (p.ex.: trioleína).

Quando uma lipase está na fase aquosa, abaixo do seu limite de solubilidade ou na ausência de uma emulsão ou em baixa concentração de um substrato lipídico, há, normalmente, uma hélice que cobre o centro activo, um oligopeptído helicóide denominado por motivo “*lid*” ou “tampa”, que protege o centro activo (figura 3). Essa tampa, anfifílica, é constituída por aminoácidos polares na parte externa e por aminoácidos apolares na parte interna, em contacto com o centro activo (KAMIYA et al., 1999).

Diz-se que, a lipase com a tampa que cobre o centro activo está numa conformação fechada, e na presença de uma emulsão ao entrar em contacto com a interface formada pelo lípido, as lipases sofrem uma mudança conformacional na região da tampa, expondo o seu centro activo para a hidrólise das moléculas de triacilglicerol (BRZOZOWSKI et al., 2000). O centro activo só fica exposto quando a tampa abre, ou seja, a enzima só catalisa uma reacção em interfaces hidrofóbicas-hidrofílicas ou ainda na presença de um solvente hidrofóbico. O mecanismo de passagem à conformação fechada para conformação aberta é então designado por activação interfacial (KUNCOVA et al., 2003).

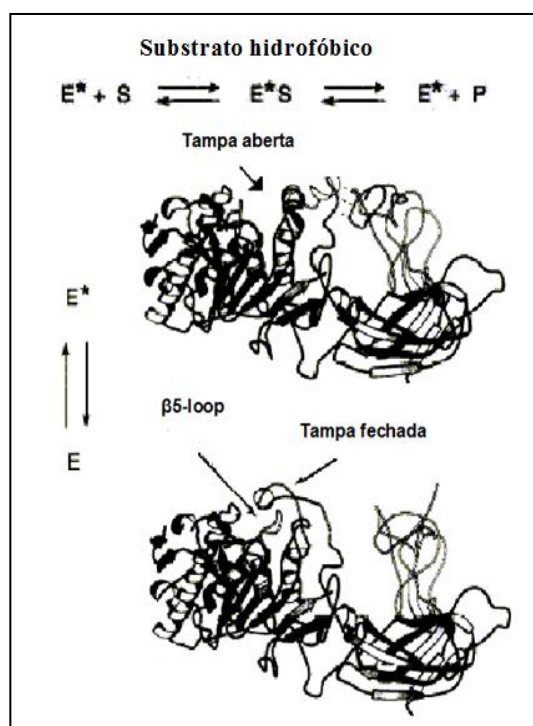


Figura 3. Representação do mecanismo de tampa das lipases (RIBEIRO II 2006).

O centro activo das lipases é geralmente caracterizado por uma tríade composta por serina, histidina e um resíduo ácido (ácido aspártico ou glutâmico), essencial para todas as reacções catalisadas por estas enzimas, sendo portanto classificadas como serina hidrolases (JAEGER et al., 1999; REETZ, 2002).

Os mecanismos envolvidos na catálise das serinas hidrolases foram, inicialmente, propostos por Brady et al. (1990). Na figura 4, a primeira etapa consiste na retirada de um protão da serina, mecanismo pelo qual os resíduos de histidina e aspartato são requeridos. O grupo hidroxilo do resíduo de serina ataca o carbono do grupo carbonilo do substrato formando um intermediário de enzima acilado. A presença de um espaço oxianiónico contribui para a estabilização da distribuição de carga e também para redução da energia mínima de formação do intermediário tetraédrico. A última etapa é denominada de desacilação: o grupo acil é transferido para a enzima e libertado pelo ataque de um nucleófilo (p. ex.: H₂O) sendo assim, o centro catalítico da enzima é regenerado.

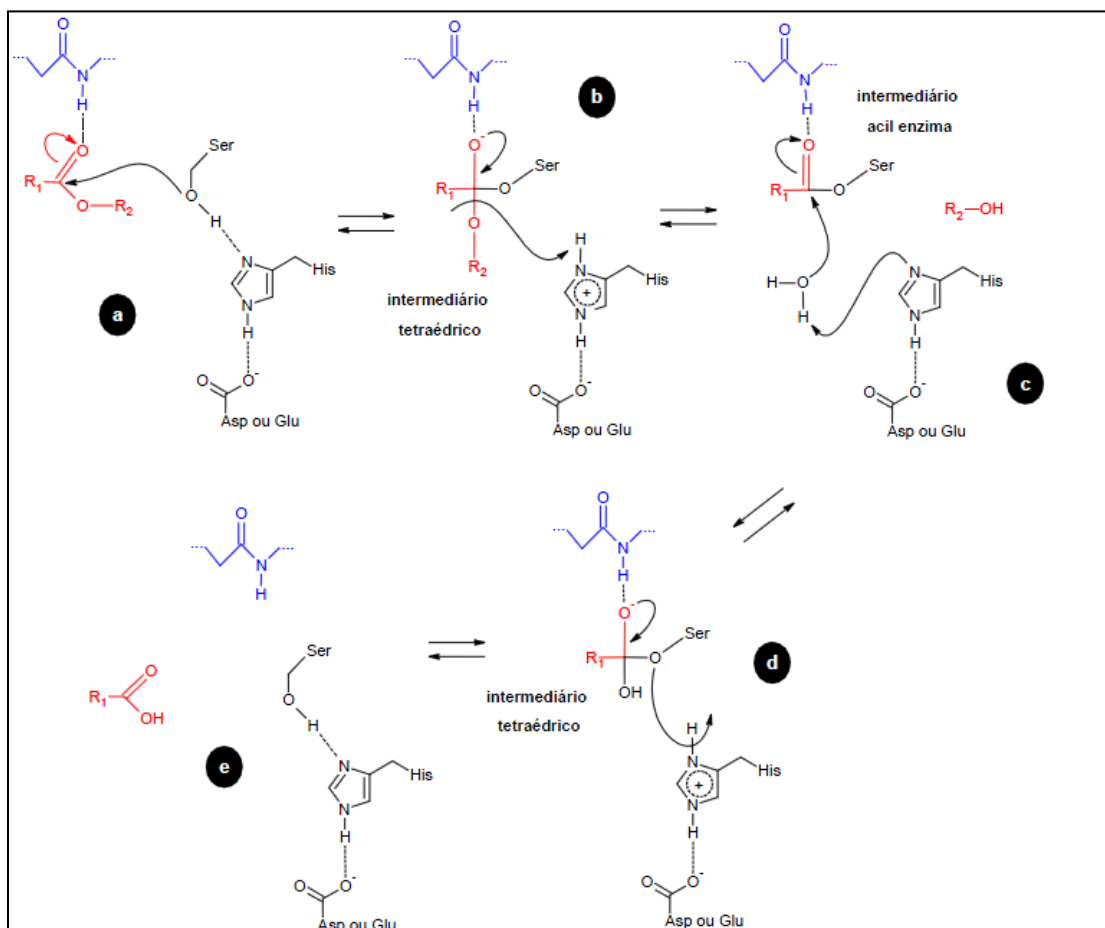


Figura 4. Mecanismo de reação de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases. A tríade catalítica e a água são visualizadas a preto, os resíduos do espaço oxianiónico a azul e o substrato a vermelho. (a) Ataque nucleofílico do hidroxila da serina ao carbono susceptível da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil-enzima e ataque nucleofílico da água; (d) intermediário tetraédrico; (e) enzima livre. Modificado de Jaeger *et al.* (1994).

O resíduo da serina que participa na tríade catalítica, normalmente, encontra-se num pentapéptido conservado com uma sequência consenso (Gly-X-Ser-X-Gly), onde X representa qualquer um dos 20 aminoácidos. Actualmente, alguns bancos de dados de domínios conservados, por exemplo, o PROSITE (HULO et al. 2008; SIGRIST et al. 2002) e o Pfam (FINN RD et al. 2008) utilizam a sequência do pentapéptido e da região ao seu redor para classificar se uma determinada sequência de aminoácidos codifica para uma lipase ou esterase. De facto, somente a sequência desta região tem sido insuficiente para diferenciar entre estes dois tipos de enzimas e, portanto, novos métodos de diferenciação têm sido sugeridos (FOJAN et al., 2000).

Foi observado que todas as lipases com estruturas terciárias resolvidas possuem a configuração chamada α/β hidrolase (SCHMIDT-DANNERT, 1999) (figura 5). Esta configuração foi identificada em 1992 através da comparação de cinco enzimas com funções catalíticas totalmente diferentes: dienolactona hidrolase, haloalcano dehalogenase, serino carboxipeptidase II de trigo, acetilcolinesterase e a lipase de *Geotrichum candidum*. Estas enzimas não possuem qualquer similaridade entre sequências, não actuam com substratos similares nem possuem o mesmo nucleófilo, contudo, possuem similaridades estruturais, combinadas com a preservação do arranjo dos resíduos catalíticos (NARDINI; DIJKISTRA, 1999). Segundo estes autores, o grupo de enzimas com a configuração α/β hidrólase cresceu e tem abrangido um grande grupo de enzimas, fazendo destas uma das mais versáteis e amplamente distribuídas configurações de proteínas.

Além de apresentarem o mesmo mecanismo reaccional, as carboxilesterases e as lipases apresentam algumas semelhanças estruturais. A principal é a presença da configuração α/β hidrólase, sendo composto por várias α -hélices e folhas- β intercaladas. Este é uma configuração bastante comum às hidrólases, sendo também encontrado em outras famílias de enzimas como epóxido hidrólases (E.C. 3.3.2.3) (ARAND et al., 2005) e haloperoxidases (E.C. 1.11.1.) (HOFRICHTER; ULLRICH, 2006).

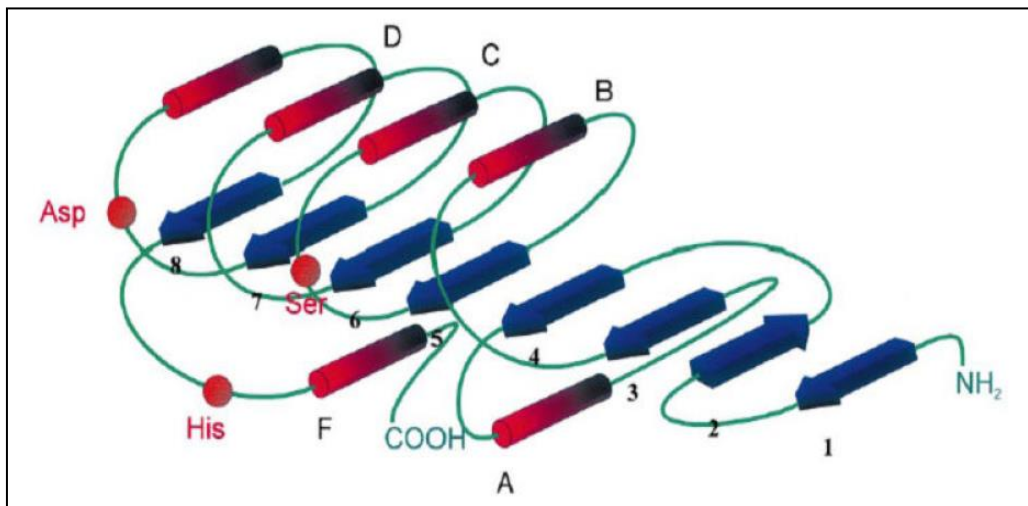


Figura 5. Representação esquemática do motivo estrutural conservado em enzimas da família α/β hidrólase.

Na figura 5, os filamentos em conformação β (1 a 8) formando uma estrutura em folha β -pregueada estão indicados pelas setas azuis, as estruturas em α -hélices (A a F) estão indicadas pelas colunas em vermelho. As posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica estão indicadas por esferas vermelhas. A região aminoterminal é indicada por NH_2 no início da cadeia e a região carboxiterminal por COOH no final da cadeia (BORNSCHEUER, 2002).

4. Aplicações biotecnológicas das lipases

As lipases microbianas apresentam uma grande diversidade de aplicações industriais, por serem mais estáveis que as lipases animais, vegetais e por poderem ser produzidas a baixos custos, com alta velocidade de síntese, grande versatilidade, e com maior simplicidade na manipulação ambiental e genética da capacidade produtiva dos microorganismos (CIHANGIR; SARIKAYA, 2004; ELLAIAH et al., 2004). São, na maioria, extracelulares, uma evidência que facilita a sua extração, isolamento e purificação (CARVALHO et al., 2003).

O potencial biotecnológico das lipases relaciona-se pelo facto de catalisar diversas reacções (eterificação e transesterificação), e não apenas hidrólises. Normalmente, preservam a sua estrutura e estabilidade em solventes orgânicos, não requerem a presença de cofactores mas requerem condições estáveis de temperatura e pH. Apresentam ainda uma larga especificidade pelo substrato e alta enantiosseletividade (BURKERT et al., 2004; CARVALHO et

al., 2003; CASTRO et al. 2004; CONTESINI et al., 2009; ELIBOL; OZER, 2002; RIGO et al., 2010).

As lipases de origem microbiana são utilizadas em alimentos, no fabrico de detergentes (hidrólise de gordura), de cosméticos (remoção de lipídios) e tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas). Como estas enzimas possuem um enorme potencial catalítico, também são utilizadas como biocatalisadores ideais em química orgânica, química fina (síntese de ésteres), na indústria farmacêutica, e na produção de aditivos alimentares (intensificação de aroma) (BURKERT et al. 2004; CIHANGIR; SARIKAYA, 2004; ELIBOL; OZER, 2002).

5. Indústria farmacêutica

A síntese de substâncias bioactivas tem sido praticada ao longo dos anos através da química orgânica convencional. Esta via de síntese, em alguns casos, pode resultar em problemas, como a instabilidade da molécula nas condições de reacção e a formação de mistura racémica, sendo a molécula de interesse um dos enantiómeros (REETZ, 2002).

A utilização de lipases na indústria farmacêutica deve-se, especialmente, à enantioselectividade exibida por muitas destas enzimas. A catálise enantioselectiva permite a obtenção de produtos opticamente puros, uma vez que estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e actuarem, preferencialmente, num dos isómeros de uma mistura racémica. Esta característica é extremamente vantajosa, pois, em muitos casos, uns dos isómeros (R ou S) apresentam actividade biológica, enquanto o outro é menos activo ou até mesmo tóxico (HASAN et al., 2006). Como exemplo, pode-se citar o ácido 2-fenil-propanóico. Este composto é utilizado na síntese de drogas anti-inflamatórias não esteróides (Ibuprofeno e Naxopreno) e pode ser obtido através de reacções de transesterificação ou de hidrólise do éster correspondente, catalisadas por lipases. Outro exemplo que pode ser descrito, na utilização da lipase de *C. antarctica* numa resolução racémica dos derivados do ácido tiotetrónico, para a obtenção do composto (R)-trilactomicina, que possui um átomo de carbono quaternário quiral em C5, com excesso

enantiomérico, (ISAKSSON et al. 2006; PANDEY et al., 1999; TOYAMA et al., 2006).

Como as esterases e lipases são capazes de catalisar uma série de reacções e possuem uma boa estabilidade em solventes orgânicos, podem ser consideradas como excelentes biocatalisadores em fases intermediários de processos químicos convencionais e na catálise de reacções químicas que envolvam substratos insolúveis em meio aquoso. Além disso, são aplicadas na resolução de misturas racémicas e na remoção selectiva de certos compostos. As lipases são, também, utilizadas na produção de antidepressivos, anti-hipertensivos e vasodilatadores (HASAN et al., 2006; PATEL, 2002). O uso de lipases nas indústrias da química fina e farmacêutica tem sido cada vez mais comum devido às características de químio-, regio- e/ou estereoselectividade (REETZ, 2002).

6. Indústria alimentar

Na indústria de alimentos, as lipases são intensamente utilizadas, principalmente na hidrólise da gordura do leite, intensificação do sabor dos queijos e na aceleração do processo de maturação, fabrico de derivados de queijo e na hidrólise de gorduras e óleos (HASAN et al., 2006).

As lipases são, também, utilizadas para modificar o sabor dos alimentos, síntese dos ésteres, dos ácidos gordos, e álcoois de cadeias curtas, sendo estes compostos básicos do sabor e aroma (HASAN et al., 2006).

A estereoselectividade das lipases é útil na síntese de biopolímeros como, por exemplo, em polifenóis e poliésteres, na resolução cinética de misturas racémicas de álcoois secundários em reacções de hidrólise, na eterificação e na transesterificação (JAEGER; EGGERT, 2002; SCHULZ et al., 2000).

Por exemplo, na indústria de lacticínios, no queijo e no leite, são utilizadas na aceleração do processo de maturação. Desta forma, a lipase tem sido utilizada na hidrólise selectiva dessa gordura, possibilitando a sua utilização na formação de produtos com aroma do queijo, na produção de substitutos de manteiga e outros aditivos usados em cereais, gomas e aperitivos. A adição

desses hidrolisados confere uma variedade de efeitos organolépticos aos alimentos (VIRTO et al., 2003).

Outro exemplo pode ser dado na indústria de panificação, no fabrico do pão, a lipase degrada os lípidos do trigo, modificando a sua interacção com o glúten, obtendo um resultado condicionador na massa, aumentando o volume do pão, melhorando a textura. Neste caso, utiliza-se a lipase 1,3 específica para obter este efeito (CASTRO et al., 2004). A hidrólise realizada por lipases 1,3 específicas é aplicada para a obtenção de monoacilgliceróis que são usados como agentes emulsificantes (FREIRE; CASTILHO, 2008).

7. Indústria de detergentes

As lipases são utilizadas na indústria de detergentes para facilitar o rompimento de ligações presentes nos triacilgliceróis e, conseqüentemente solubilizar gorduras aderidas ao tecido. Alguns exemplos de enzimas utilizadas em detergentes são a Lipolase® (Novozymes), obtida do fungo *Thermomyces lanuginosa* e expressa em *A. oryzae*; a Lumafast® (Genencor, USA) e a Lipomax® (Gist-Brocades, Holanda), lipases bacterianas provenientes de *Pseudomonas mendocina* e *P. alcaligenes* (JAEGER; REETZ, 1998).

A área mais importante de aplicação comercial para as lipases hidrolíticas é em detergentes industriais ou domésticos (HORCHANI et al., 2009), onde é geralmente usada em combinação com uma ou mais enzimas, tais como proteases, amílases e celulasas, sendo responsável pela remoção de diversas gorduras (CASTRO et al., 2004). As lipases, neste caso, devem possuir características de baixa especificidade ao substrato, termoestabilidade, e serem activas e estáveis em condições normalmente consideradas agressivas para uma enzima, como temperaturas de 40 a 60 °C e meios muito básicos (SHARMA et al., 2001).

8. Outras aplicações

Na indústria têxtil, as lipases são usadas para facilitar a remoção de lubrificantes, a fim de promover uma melhor absorção da tinta no tecido. As

fibras sintéticas modificadas enzimaticamente são utilizadas para a produção de fios e tecidos (HASAN et al., 2006).

As possibilidades de aplicações das lipases na indústria oleoquímica são enormes. Pesquisas acerca da produção de biodiesel utilizando lipases através da transesterificação de triglicéridos com álcoois de cadeia curta, tem crescido significativamente nos últimos anos. Foram realizadas produções de biodiesel catalisadas por lipases a partir de diferentes tipos de óleos, tais como de girassol, soja, coco e palma (LEE et al., 2002; PIZARRO; PARK, 2003; TALUKDER et al., 2010).

As lipases também são utilizadas na indústria de papel e celulose para remoção de triacilgliceróis e ceras, removendo componentes hidrofóbicos que causam problemas no fabrico do papel (GRUPTA et al., 2004; KONTKANEN et al., 2004; PANDEY et al., 1999).

Na área ambiental, as lipases podem ser aplicadas na remoção de óleos presentes nas águas residuais de fábricas, restaurantes ou residências, ou provenientes de indústrias de refinação de óleos que poluem solos e água. A aplicação de microrganismos produtores de lipases na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo é sugerida como uma alternativa de biorremediação (JAEGER; EGGERT, 2002; PATEL, 2002; PIZARRO; PARK, 2003).

REFERÊNCIAS

ALOULO, A. et al. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdan, v. 1761, p. 995-1013, 2006.

ARAND, M. et al. Epoxide hydrolases: structure, function, mechanism, and assay. **Methods Enzymol.**, v. 400, p. 569-588, 2005.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiol Rev.**, England, v. 26, 73-81, 2002.

BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.

- BRZOZOWSKI, A. M. et al. Structural origins of the interfacial activation in thermomyces (humicola) lanuginosa lipase. **Biochemistry**, Washington, v. 39, n. 49, 15071-15082, 2000.
- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by Geotrichum sp. using factorial design. **Biores. Technol.**, v. 91, 77-84, 2004.
- CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quim. Nova**, v. 26, 75-80, 2003.
- CASTRO, H. F. et al. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Quím. Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.
- CHAHINIAN, H. et al. Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: comparison with nonlipolytic and lipolytic carboxylesterases. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1738, p. 29-36, 2005.
- CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of Aspergillus sp. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 20, 193-197, 2004.
- CONTESINI, F. J. et al. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from Aspergillus niger by solid-state fermentation. **J. Microbiol.**, v. 47, 563-571, 2009.
- DESNUELLE, P.; SARDA, L.; AILHAUD, G. Inhibition de la lipase pancreatique par la diethyl-p-nitrophenyl en emulsion. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 37, 570-571, 1960.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended Rhizopus arrhizus. **Process Biochem.**, v. 38, 367-372, 2002.
- ELLIAH, P. et al. Production of lipase by immobilized cells of Aspergillus niger. **Process Biochem.**, v. 39, n. 5, p. 525-528, 2004.
- FERRER, M. et al. Purification and properties of a lipase from Penicillium chrysogenum isolated from industrial wastes. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 75, p. 569-576, 2000.
- FINN, R. D. et al. The pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, 281-288, 2008.
- FOJAN, P. et al. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. **Biochemistry**, v. 82, p. 1033-1041, 2000.
- FREIRE, D. M. A.; CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 506.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial application of microbial lipase. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.

HIOL, A. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 25, p. 80-87, 1999.

HOFRICHTER, M.; ULLRICH, R. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 71, p. 276-288, 2006.

HOLWERDA, K.; VERDAKE, P. E.; DE WILLIGEN, A. H. A. Vergleichende untersuchungen über die verseifungsgeschwindigkeit einiger einsäuriger triglyceride unter einfluss von pankreasextrakt. **Rec. Trav. Chim. Pays-Bas**, Amsterdam, v. 55, p. 43-57, 1936.

HORCHANI, H. et al. Biochemical and molecular characterization of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **J. Mol. Catal., B, Enzym.**, v. 56, p. 237-245, 2009.

HULO, N. et al. The 20 years of PROSITE. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 245-249, 2008.

ISAKSSON, D.; SJÖDIN, K.; HÖGBERG, H. E. Enantiomerically enriched cryptone by lipase catalysed kinetic resolution. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, p. 275-280, 2006.

JAEGER, K. E. et al. Bacterial Lipases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 53, p. 315-351, 1999.

KAMIYA, N. et al. Enantioselective recognition mechanism of secondary alcohol by surfactant-coated lipases in nonaqueous media. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 65, p. 227-232, 1999.

- KONTKANEN, H. et al. Characterisation of steryl esterases activities in commercial lipase preparations. **J. Biotechnol.**, v. 108, p. 51-59, 2004.
- KUNCOVÁ, et al. Catalysis in organic solvents with Lipase immobilized by Sol-Gel Technique. **J. Sol-Gel. Sci. Technol.**, v. 26, p. 1183-1187, 2003.
- LEE, K. T.; FOGLIA, T. A.; CHANG, K. S. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 79, n. 2, p. 191-195, 2002.
- LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 39, p. 98-102, 2006.
- MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future application of lipases. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, Newcastle Upon Tyne, v. 3, p. 193-217, 1985.
- MUDERHWA, J. M.; BROCKMAN, H. L. Lateral lipid distribution is a major regulator of lipase activity. Implications for lipid-mediated signal transduction. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, p. 24184-24192, 1992.
- NARDINI, M.; DIJKISTRA, B. W. α/β Hydrolase Fold Enzymes: The Family Keeps Growing. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 9, 732-737, 1999.
- PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 29, p. 119-131, 1999.
- PATEL, R. N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 31, p. 804-826, 2002.
- PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1077-1082, 2003.
- PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chem. Phys. Lipids**, Limerick, v. 93, 67-80, 1998.
- REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, p. 145-150, 2002.
- REIS, P. et al. Lipases at interfaces: a review. **Adv. Colloid Interface Sci.**, Amsterdam, v. 147-148, p. 237-250, 2008.
- RIBEIRO, I. I. **Imobilização de enzimas em materiais baseados em gelatinas**. Caparica: FCT-UNL, 2006. Relatório de estágio.
- RIGO, E. et al. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT - Food Sci Technol.**, v. 43, 1132-1137, 2010.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 30, p. 513-521, 1958.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHMIDT-DANNERT, C. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 7, p. 2123-2130, 1999.

SCHONHEYDER, F.; VOLQUARTZ, K. On affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. **Acta Physiol. Scand.**, Stockholm, v. 9, p. 57-67, 1945.

SCHULZ, T.; PLEISS, J.; SCHMID, R. D. Stereo selectivity of Pseudomonas cepacia lipase toward secondary alcohols: a quantitative model. **Protein Sci.**, v. 9, p. 1053-1062, 2000.

SHARMA R, C.; BANERJEE, U. C. Production, purification characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SIGRIST, C. J. A. et al. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. **Brief. Bioinform.**, v. 3, p. 265-274, 2002.

SMABY, J. M.; MUDERHWA, J. M.; BROCKMAN, H. L. Is lateral phase separation required for fatty acid to stimulate lipases in a phosphatidylcholine interface? **Biochemistry.**, Washington, v. 33, p. 1915-1922, 1994.

SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1543, p. 223-238, 2000.

TALUKDER, M. M. R. et al. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochem. Eng. J.**, v. 49, p. 207-212, 2010.

TOYAMA, K. et al. Lipase-catalyzed kinetic resolution of thiotetronic acid derivatives bearing a chiral quaternary carbon: total synthesis of (R)-thiolactomycin and its O-analogue. **Tetrahedron Lett.**, v. 47, p. 7163-7166, 2006.

VERGER, R. Enzyme kinetics of lipolysis. **Methods Enzymol.**, v. 64, p. 340-92, 1980.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipase for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catal., B, Enzym.**, Amsterdam, v. 9, p. 113-148, 2000.

VIRTO, M. et al. Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. **Internat Dairy J.**, v. 13, p. 391-399, 2003.

VOLPATO, G. et al. Single-step purification of different lipases from Staphylococcus warneri. **J. Chromat. A**, Amsterdam, v. 1217, 473-478, 2010.