



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOENERGIA –MESTRADO

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DO ESTER OLEATO DE ETILA A PARTIR DE LIPASES
FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO NO
ESTADO SÓLIDO**

RICARDO ANTONIO ZANELLA

TOLEDO
Setembro de 2020

RICARDO ANTONIO ZANELLA

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DO ÉSTER OLEATO DE ETILA A PARTIR DE LIPASES
FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO NO
ESTADO SÓLIDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioenergia.

Orientador: Professor Dr. Edson Antônio da Silva

Co-orientadora: Professora Dr^a. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

TOLEDO

Setembro de 2020

ZANELLA, RICARDO ANTONIO

SÍNTESE ENZIMÁTICA DO ESTER OLEATO DE ETILA A PARTIR DE LIPASES FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO / RICARDO ANTONIO ZANELLA; orientador(a), Edson Antônio da Silva; coorientador(a), Maria Luiza Fernandes Rodrigues, 2020.
62 f.

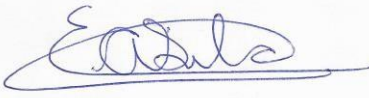
Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2020.

1. Catalisadores enzimáticos . 2. Fermentação Estado Sólido. 3. Lipase . 4. Ésteres do biodiesel.. I. Silva, Edson Antônio da . II. Rodrigues, Maria Luiza Fernandes . III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por RICARDO ANTONIO ZANELLA perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 08 de junho de 2020

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Orientador



Prof. Dr. Jamal Abd Awadallak

Membro



Profª Drª Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner
Membro

AGRADECIMENTOS

Eu não estaria aqui hoje entregando esse trabalho após esses anos de luta e desafios se não fosse por algumas pessoas muito importantes em minha vida.

Primeiramente a minha mãe Vanira, a quem dedico a minha vida, pelo incentivo a buscar melhores oportunidades para meu futuro, pelo apoio independente das dificuldades pelas quais passei.

Ao meu pai Reinaldo, pelo companheirismo e ensinamentos, proporcionando-me o necessário para seguir meus projetos e sonhos.

A minha irmã Karine, pela ajuda nos momentos mais difíceis, muitas vezes deixando seus problemas de lado para vir ao meu socorro, não tenho palavras para agradecer tudo o que fez e faz por mim.

A minha esposa e companheira Juliana, pela motivação e suporte no decorrer desta caminhada, pelas palavras positivas nos momentos de desânimo.

Aos meus primos e tios, que estiveram também presentes nessa jornada.

A Profa. Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues, pela paciência e persistência em me orientar, ensinar, explicar repetidas vezes, mesmo quando os resultados não foram os esperados, mesmo com meus atrasos e obstáculos encontrados.

Ao Prof. Dr. Edson Antônio da Silva, pela ajuda, orientações e contribuições a mim concedidas nesse período.

A todos os professores e professoras do Programa.

A dona Dirce, que sempre me lembrava das minhas obrigações com o Programa.

Aos colegas de laboratório Aline, Bruna, Cintia, Karina, Leonardo, Monique, Pedro, Rafaela e um agradecimento especial para duas pessoas que me ajudaram muito nessa jornada nos dias em que eu não poderia estar presente, Ana Julia Romão da Silva e Amanda Bachini Esteves, ao Técnico de Laboratório Fernando, pela colaboração nos experimentos.

Agradeço também aos meus colegas de mestrado, pela ajuda em diversos estudos, principalmente nas áreas na qual não tenho afinidade.

Amigos e amigas, que puderam entender a minha falta em alguns momentos de encontros e descontração.

A todos que, de uma forma ou outra, participaram da realização do meu sonho em ser “Mestre”, muito obrigado!

SÍNTESE ENZIMÁTICA DO ESTER OLEATO DE ETILA A PARTIR DE LIPASES FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal, a síntese enzimática do éster oleato de etila, a partir de lipases fúngicas, produzidas pela cepa *Penicillium sumatrense*, isolada das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*, *Euphorbiaceae*), e utilizando casca de arroz (CA) e farelo de sementes de girassol (FSG) como substratos na Fermentação em Estado Sólido (FES). A dosagem da atividade enzimática foi determinada pelo método titulométrico, utilizando o azeite de oliva com substrato. Em busca da maximização na produção de lipases, foram realizados planejamentos experimentais com diferentes proporções de substratos e indutores (glicerol). Os resultados obtidos indicaram uma atividade catalítica $29,3 \text{ Ugss}^{-1}$ nas condições ótimas de 55% de umidade, 25% de FSG, $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em 96 h de fermentação. O material fermentado (lipase), obtido a partir do resíduo agroindustrial das cascas de arroz e farelo de semente de girassol, foi empregado nos estudos da síntese do éster oleato de etila em n-heptano, modificando as variáveis de temperatura, atividade enzimática e razão molar (RM, ácido:álcool). Para avaliar o rendimento em éster, foi utilizado o método espectrométrico de Lowry & Tinsley e as análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 7.0. As melhores condições experimentais para a síntese enzimática do éster oleato de etila foram obtidas com o substrato moído, razão molar 1:6 (ácido/álcool), temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e atividade enzimática de 60 Ugss^{-1} , atingindo 100% de conversão em éster em 5 horas de reação.

Palavras-chave: Fermentação em Estado Sólido, síntese enzimática, lipase, oleato de etila.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF ETHYL OLEATE ESTER FROM FUNGAL LIPASES OF
Penicillium sumatrense PRODUCED BY SOLID STATE FERMENTATION

ABSTRACT

The main objective of this work was the enzymatic synthesis of ethyl oleate ester from fungal lipases, which was produced by the strain *Penicillium sumatrense* isolated from castor leaves (*Ricinus communis L., Euphorbiaceae*), and applying rice husks and Sunflower Seeds Bran (FSG) as substrates in Solid State Fermentation (FES). The dosage of the enzymatic activity was determined by the titrimetric method, using olive oil as a substrate. To maximize the production of lipases, experimental plans were carried out with different proportions of substrates and inductors (glycerol). A catalytic activity value of 29.3 Ugss⁻¹ was obtained in the optimum conditions (55% humidity, 25% FSG, 27 °C) in 96 h of fermentation. The fermented material (lipase) obtained from the agro-industrial residue of rice husks and sunflower seed bran, was used in the studies of the synthesis of ethyl oleate in n-heptane, modifying the variables of temperature, enzymatic activity and molar ratio (RM, acid: alcohol). To evaluate the ester yield, the Lowry & Tinsley spectrometric method was applied and the statistical analyzes were performed using the Statistica 7.0 software. The best experimental conditions for the enzymatic synthesis of ethyl oleate were obtained with the ground substrate, molar ratio 1:6 (acid/alcohol), temperature 37 °C and enzymatic activity of 60 Ugss⁻¹, reaching out 100% conversion to ester in 5 hours of reaction.

Keywords: Solid state fermentation, enzyme synthesis, lipase, ethyl oleate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.....	3
Figura 2. Reações de síntese catalisadas por lipases	4
Figura 3. Estrutura da lipase de <i>Rhizopus oryzaea</i> na presença do substrato tricaprilina.	5
Figura 4. Mecanismo representativo de uma reação de esterificação catalisada por lipase.....	6
Figura 5. Fungo <i>Penicillium sumatrense</i> incubado em meio BDA usando frascos de Erlenmeyer.....	16
Figura 6. Substratos, semente de girassol (A) e casca de arroz (B)	17
Figura 7. Solução de Esporos. (Fonte: O autor, 2019).....	18
Figura 8. Marcações em quadrantes da câmara de Neubauer	18
Figura 9. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico. (Fonte: Autor, 2019).....	22
Figura 10. Complexo formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres.	23
Figura 11. Cinética de Produção de lipase fúngica de <i>Penicillium sumatrense</i> por FES. Os ensaios foram realizados com umidade de 55% e de 27 °C.	25
Figura 12. CA como suporte físico (A), enquanto o FSG (B) atuou como fonte de carbono.	26
Figura 13. Resultado com 96 h de fermentação, obtendo-se uma atividade enzimática de 29,3 Ugss ⁻¹ , utilizando 25% de FSG acrescentado na CA.	26
Figura 14. Cinética de produção de lipase fúngica de <i>Penicillium sumatrense</i> por FES utilizando diferentes proporções de glicerol. Os ensaios foram realizados com umidade de 55% e de 27 °C.	29
Figura 15. Variação na conversão do oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, em substrato moído e em substrato inteiro, contendo a lipase de <i>Penicillium sumatrense</i> produzida por FES. Condições dos ensaios: 37 °C, n-heptano, RM 1:6 (ácido:álcool) e 60,0 U de atividade enzimática.....	31
Figura 16. Enzima lipase aderida à casca de arroz (A) e material sólido fermentado moído (B).....	32
Figura 17. Reação de síntese do éster oleato de etila catalisada pela lipase.....	33
Figura 18. Gráfico de Pareto na interação dos efeitos das variáveis na síntese do éster oleato de etila, com um intervalo de 95% de confiança.	33
Figura 19. Gráfico de paridade para mostrar a distribuição dos valores observados e os valores preditos para a síntese éster do oleato de etila.	35
Figura 20. Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) que apresenta a interação entre as variáveis Atividade Enzimática e Temperatura para a síntese do éster oleato de etila.....	35
Figura 21. Variação da conversão do oleato de etila em função do tempo, utilizando o sólido fermentado contendo a lipase de <i>Penicillium sumatrense</i> produzida por FES.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das principais enzimas utilizadas na indústria	9
Tabela 2. Principais diferenças entre os processos de FES e FS.	11
Tabela 3. Planejamento Experimental 2^3	21
Tabela 4. Composição físico-química da casca de arroz (<i>Oriza sativa</i>) e girassol (<i>Helianthus annuus</i>).	24
Tabela 5. Comparação dos dados obtidos com a literatura.	28
Tabela 6. Resultados experimentais do delineamento fatorial 2^3 aplicado no estudo da síntese do éster oleato de etila durante 4 h de reação.	33
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) do modelo para a síntese do éster oleato de etila.	34

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

μmol – Micromol

A - Atividade Enzimática

BDA - Ágar Batata Dextose

CA - Casca de Arroz

CaO - Óxido de Cálcio

Cesp – Contagem de esporos

GC FID- Cromatografia Gasosa

Exp – Experimento

F - Distribuição F de Fisher-Snedecor

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

Fc - Fator de correção

FES - Fermentação no Estado Sólido

FS - Fermentação Submersa

FSG - Farelo de Semente de Girassol

g – gramas

GL- Graus de Liberdade;

Gly - Glicina;

GRAS - Generally Regarded as Safe

h – horas

LQA - Laboratório de Qualidade de Alimentos

M – Molar

m/v - Massa por Volume

mg - Miligrama

mg L^{-1} - Miligrama por Litro

min – minuto

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

mol L^{-1} – mols por Litro

NaOH - Hidróxido de Sódio

NC-IUBMB - (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*)

nm - Nanômetros

p – Probabilidade

PA – Para Analise

PVC - Policloreto de Vinila

RM – Razão Molar

rpm – rotação por minuto

s - segundos

Ser - Serina;

SM - Soma dos Quadrados Médios;

SQ - Soma dos Quadrados;

TC - Torta de Crambe

Temp – Temperatura

U - Unidades totais

U gss⁻¹ - Unidade por grama de sólido seco

U/mL – Unidade por mililitro

v/v - Volume por Volume

X1 - Histidina

X2 - ácido glutâmico ou aspártico

Δt - tempo de hidrolise

ΔV - Volume de NaOH

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. MICRORGANISMO	3
2.2. LIPASES	3
2.2.1. Aspectos Estruturais e Mecanismo Catalítico das Lipases.....	5
2.2.2. Fontes de Lipases	6
2.2.3. Características das lipases	8
2.2.4. Aplicação das lipases.....	9
2.3. FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO – (FES).....	10
2.4. SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTER-OLEATO DE ETILA	13
2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. OBJETIVO GERAL	15
3.1.1. Objetivos Específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. REAGENTES.....	16
4.2. MICRORGANISMO	16
4.3. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS	17
4.4. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO.....	17
4.5. PRODUÇÃO DA LIPASE	17
4.5.1. Preparação do inóculo	18
4.5.2. Condições de Cultivo	19
4.5.2.1. Cinética de Produção de Lipases com diferentes proporções de substratos ...	19
4.5.2.2. Cinética de Produção de Lipases com adição de indutor	20
4.5.3. Secagem do Sólido Fermentado.....	20
4.6. BIOCATÁLISE.....	20
4.6.1. Estudo de Reação de Síntese do éster Oleato de Etila	20
4.6.1.1. Ensaios de Síntese do éster Oleato de Etila (Planejamento Experimental 2 ³)	20
4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS	21
4.7.1. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico	21
4.7.2. Determinação de Atividade Lipolítica-Método Espectrofotométrico	22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS	24
5.2. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE SUBSTRATOS	25
5.3. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES COM ADIÇÃO DE INDUTOR.....	28
5.4. RESULTADOS DO ENSAIO PRÉVIO PARA DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA REACIONAL.....	30
5.5. ENSAIOS DE SÍNTESE DO ÉSTER OLEATO DE ETILA (PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³)	32
5.6. CINÉTICA ENZIMÁTICA DO OLEATO DE ETILA APÓS OTIMIZAÇÃO	37
5.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de grãos, com destaque para o Estado do Paraná. Suas partes não aproveitadas como folhas, caule, e casca, são consideradas subprodutos de baixo valor agregado, e devido ao seu elevado volume, contribuem para um dos maiores problemas ambientais das indústrias e da agricultura: a eliminação dos resíduos gerados.

A casca de arroz (CA), um resíduo agroindustrial utilizado neste trabalho como suporte para o crescimento fúngico durante a Fermentação no Estado Sólido (FES), devido à sua lenta biodegradação permanece inalterada por longos períodos de tempo, gerando enorme dano ao meio ambiente.

A CA representa um dos mais abundantes resíduos agroindustriais se for comparado com outros cereais como o trigo e o milho. Suas partes não aproveitadas como a casca, folhas, caule, são considerados resíduos e, por possuírem um elevado volume, colaboram com um grande problema das indústrias e da agricultura: a eliminação desses resíduos (DELLA, 2005).

De acordo com DELLA (2005), a CA representa cerca de 23% do peso total do arroz, estas CA podem ser reaproveitadas como fonte alternativa de sílica, por meio de suas cinzas; geração de energia pela combustão direta e como substrato para a FES, se tornando algumas alternativas viáveis do ponto de vista tecnológico, econômico e ecológico (FOLETTTO, 2005).

Entretanto a utilização da CA exclusivamente como base na FES não é muito eficiente, devido ao seu baixo teor de lipídeos (0,47% em média) (LQA – UNIOESTE, 2016). Por isso, neste trabalho utilizou-se o farelo de semente de girassol (*Helianthus annuus L.*) como substrato para a produção de lipases, pois possui um elevado teor de lipídeos (48,0 % em média).

Existem dois tipos de fermentação que podem ser utilizados para a produção de enzimas, como as lipases e outros metabólitos: fermentação submersa (FS) onde os microrganismos crescem em substratos que se encontram em meio líquido e fermentação em estado sólido (FES), onde os microrganismos crescem em substratos sólidos umedecidos ou inertes, na ausência de água livre (TEIXEIRA, 2015). O material sólido poderá ser substrato natural, ou resíduo agroindustrial como a casca do arroz (CA) (*Oryza sativa*) ou suporte inerte, como poliuretano ou resinas poliméricas (PANDEY, 2003).

Uma das condições que favorece o processo fermentativo é a característica que o substrato selecionado disponibiliza para o desenvolvimento do metabólito, ressaltando que outros parâmetros também influenciam em seu processo, tal como a temperatura de incubação, quantidade de inóculo inicial, quantidade de água adicionada, se há a presença ou não de oxigênio e nutrientes, se não há contaminação ao meio, e outros.

Tendo em vista essas características, a FES, se torna uma tecnologia economicamente viável para a produção de enzimas, como as lipases, produzidas neste projeto de pesquisa, utilizando resíduos agroindustriais como matéria-prima de baixo custo e a geração de produtos de alto valor agregado (enzimas).

As lipases são enzimas versáteis, pois em meio aquoso catalisam reações de hidrólise e em meio orgânico, reações de síntese. Nesta pesquisa, as lipases produzidas foram utilizadas como catalisador biológico na síntese do éster oleato de etila, um dos ésteres do biodiesel, que é utilizado como aditivo para diesel combustível, na indústria cosmética e alimentícia (SOUZA, 2013; KRÜGER, 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MICRORGANISMO

Os microrganismos vivos são a fonte para obter lipases. De acordo com SINGHANIA *et al.* (2009), fungos e leveduras são mais adequados e adaptados para o cultivo em Fermentação no Estado Sólido (FES), pois não há grande necessidade de água em sua produção, além do mais, na FES há a possibilidade em utilizar uma ampla variedade de resíduos agroindustriais como substratos, que em geral são ricos em proteínas, lipídeos, carboidratos e outros nutrientes que os microrganismos necessitam no seu metabolismo.

Os fungos que são capazes de produzir enzimas no interior da planta são denominados como fungos endofíticos, que ao contrário dos fungos fitopatogênicos, não causam danos para as plantas, e sim os beneficiam com o controle biológico de pragas, induzindo a planta a desenvolver resistência a pragas (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

2.2. LIPASES

Conforme NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), as lipases (glicerol éster hidrolises EC.3.1.1.3), pertencem a um grupo especial de esterases classificadas como serina hidrolases, sendo constituídas conforme a tríade catalítica Gly-X1-Ser-X2-Gly, onde Gly = glicina; Ser = Serina; X1 = histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico (ZAGO, 2010).

As lipases são catalisadores biológicos que atuam na hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), liberando como produto os ácidos graxos e glicerol (Figura 1).

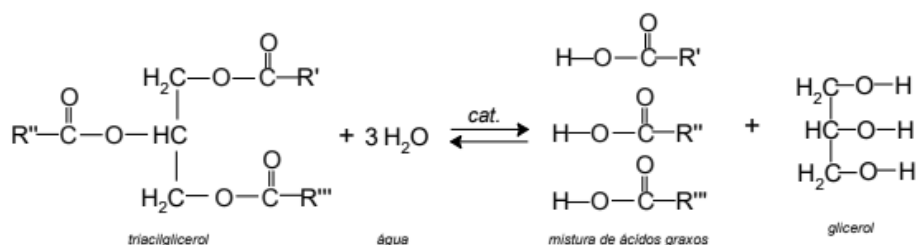


Figura 1. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol. (Fonte: SANTOS, 2016)

Contudo em meio aquo-restritos, as lipases se tornam muito eficientes em reações de biotransformação (Figura 2), como hidroesterificação, esterificação, interesterificação, alcóolise, aminólise, lactonização (SANTOS *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016).

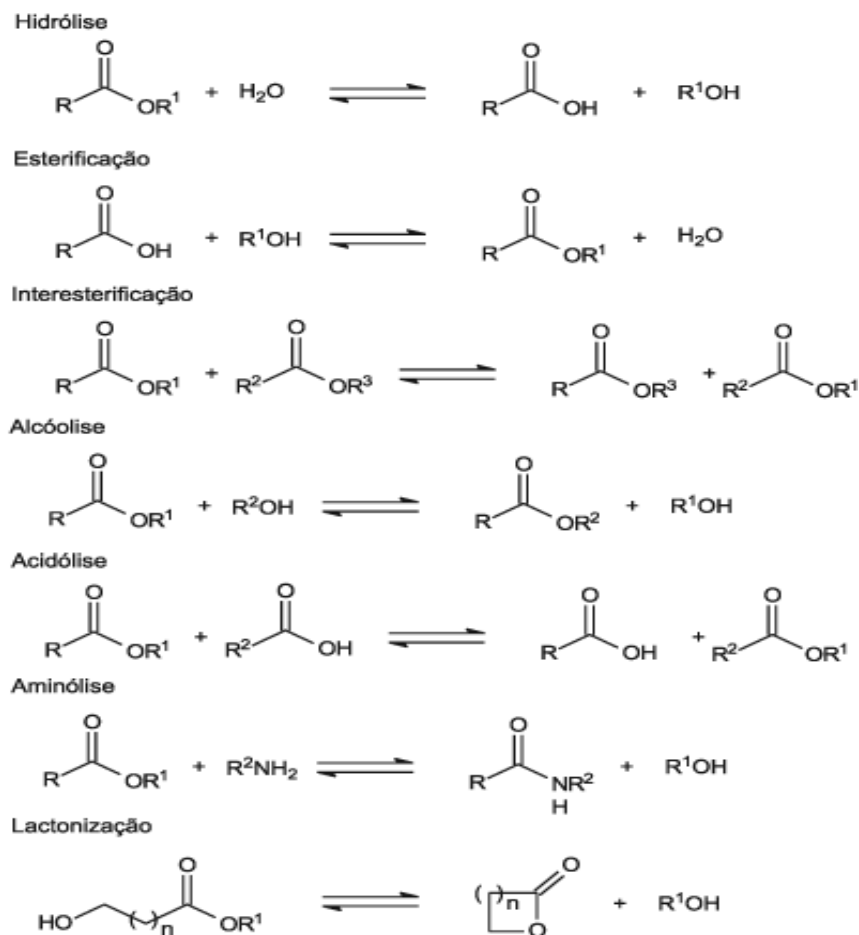


Figura 2. Reações de síntese catalisadas por lipases (Fonte: PAQUES & MACEDO, 2006)

A maioria das lipases não necessita de cofatores, isto é, pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas, responsáveis pela sua função catalítica. Estas enzimas podem atuar em uma larga faixa de pH, sendo respectivamente inalterado a altas temperaturas, possuindo também especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (GANDHI, 1997; PANDEY *et al.*, 1999; ZORN *et al.*, 2016).

Nas lipases ocorrem um fenômeno chamado de ativação interfacial (interface água/óleo), (BALCÃO *et al.*, 1996 e WAKABAYASHI, 2004).

Neste fenômeno, ocorre a mudança na estrutura tridimensional da lipase, onde uma parte da molécula cobre o sítio ativo com uma curta α -hélice, denominada “flap” ou “lid” (tampa hidrofóbica). Esta tampa possui um lado voltado para o sítio catalítico, do mesmo

modo que as cadeias proteicas existentes ao seu redor, ambas são compostas particularmente por cadeias laterais hidrofóbicas. Se as enzimas estiverem em meio aquoso sem o seu substrato natural, a “tampa” que esta cobrindo o sitio catalítico irá se “fechar” fazendo com que a lipase se torne inativa, no entanto, na presença de substratos hidrofóbicos, essa “tampa” fica “aberta”, tornando as lipases ativas, ou seja, as lipases são adsorvidas na interface hidrofóbica, ocasionando mudança na estrutura enzimática (CASTRO *et al.*, 2004; ZAGO, 2010; FARIAS 2013).

2.2.1. Aspectos Estruturais e Mecanismo Catalítico das Lipases

A estrutura tridimensional das lipases (Figura 3), descritas na literatura é expressa através de estudos de raio-X, onde que apresenta um padrão de isomerismo conformacional comum, qualificado de α/β hidrolase, composto de uma sequência de α -hélices e folhas β -pregueadas (JAEGER *et al.*, 1994; SCHRAG & CYGLER, 1997; BORNSCHEUER, 2002).

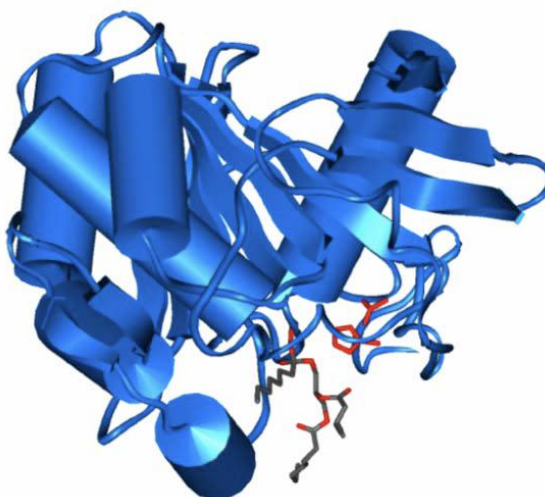


Figura 3. Estrutura da lipase de *Rhizopus oryzaea* na presença do substrato tricaprilina. (Fonte: DIAZ, 2005).

O dobramento das lipases é do tipo α/β hidrolase, onde que apresenta um núcleo central denominado folha β central, juntamente com diferentes fitas β anti-paralelas, ligadas por α -hélices (BOTTON, 2014).

A Figura 4 demonstra o mecanismo catalítico sugerido para a síntese de ésteres de um ácido graxo catalisada por lipase.

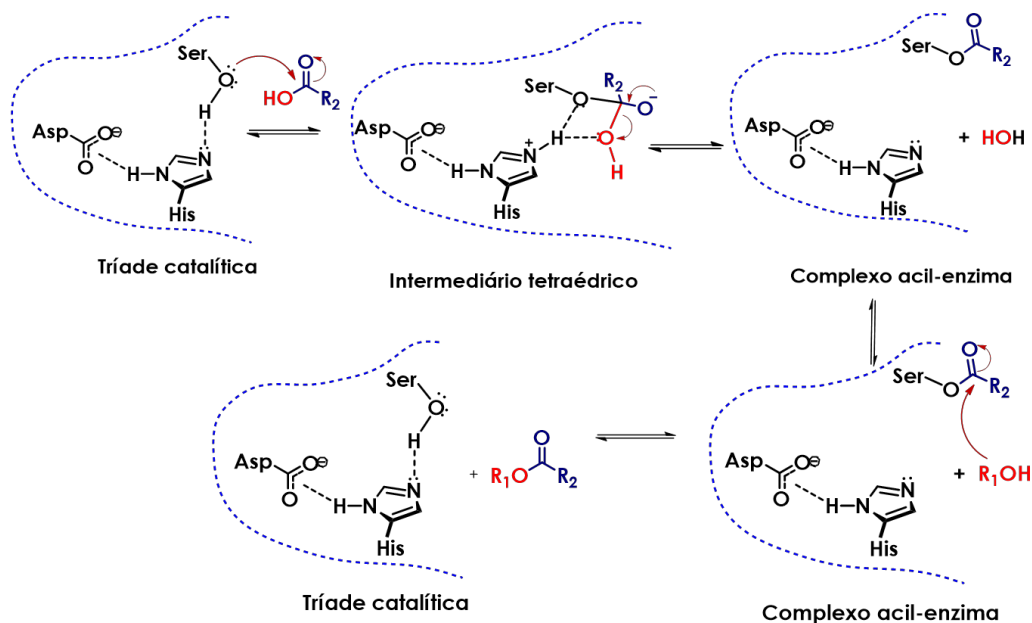


Figura 4. Mecanismo representativo de uma reação de esterificação catalisada por lipase. (Fonte: FABER, 2011).

O mecanismo catalítico ocorre em algumas etapas, na qual o aminoácido histidina aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila do aminoácido serina do sítio ativo catalítico. O oxigênio da hidroxila serínica ocasiona um ataque nucleofílico ao carbono da ligação éster da cadeia do substrato, dando forma a um intermediário tetraédrico. O intermediário tetraédrico, por sua vez afasta o íon alcóxido ($-RO^-$), transferindo-o para o substrato, formando água através da transferência do próton do resíduo da histidina. No segundo momento, o álcool ataca o carbono novamente, ao mesmo tempo em que é desprotonado pelo resíduo do aminoácido histidina, originando um complexo acil-enzima, liberando éster e regenerando a enzima, (Figura 4) (FABER, 2011).

2.2.2. Fontes de Lipases

As lipases são secretadas por uma grande variedade de seres vivos (animais, plantas e microrganismos). Nos animais (estômagos, tecido adiposo, vascular e linfático), nas plantas (oleaginosas) como a mamona (*Ricinus communis*) e a canola (*Brassica napus*), dentre outras e nos microrganismos como fungos (filamentosos e leveduras) e bactérias (ZAGO, 2010). De acordo com Fernandes (2007), os fungos são valorizados industrialmente devido a sua grande capacidade de produzir enzimas, e por normalmente serem extracelulares, facilitando a sua recuperação em meio de fermentação e por sua grande maioria não serem nocivos a saúde

humana, sendo reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe, JAEGER *et al.*, 1994).

As lipases microbianas dos gêneros (*Rhizopus*, *Candida*, *Penicillium* e *Pseudomonas*, *Aspergillus* e *Burkholderia*) são consideradas as principais fontes produtoras de enzimas (JAEGER *et al.*, 1994; PANDEY *et al.*, 1999; LAGE *et al.*, 2016; KRÜGER, 2017). Dessa forma são as mais utilizadas industrialmente como catalisadoras em síntese orgânica, devido ao grande potencial biotecnológico, fácil manipulação e crescimento, maior especificidade de substratos, não precisam de co-fatores, estáveis em (solventes orgânicos, pH e temperatura), custo de produção mais baixos diante de outras fontes (por serem ecologicamente mais viáveis), além da grande produção através da fermentação (ZAGO, 2010; MADALOZZO, 2011; BOTTON, 2014).

As enzimas vêm sendo aplicadas em diversas áreas de processos industriais devido à facilidade de obtenção e as vantagens em relação aos catalisadores químicos. Dentre as aplicações industriais, os biocatalisadores são utilizados na produção de bebidas, alimentos, têxtil, celulose, síntese de ésteres de biodiesel dentre outras aplicações (SALUM, 2010; CHOI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2019.). Sendo também utilizados na biorremediação de solos e efluentes, para a remoção de óleos presentes nas águas residuais de indústrias como restaurantes, fábricas (laticínio, refinação de óleos) ou residências (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Atualmente, existem alternativas aos catalisadores convencionais que podem ser utilizadas, é o caso da catalise enzimática. Os catalisadores enzimáticos ou biocatalisadores ou catalisadores biológicos como também são conhecidos, possuem elevada eficiência catalítica, em geral muito maior que aquela que caracteriza catalisadores sintéticos; têm alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas, permitem a síntese de compostos de alta pureza, produção de enzimas por processos fermentativos de baixo custo contendo substratos baratos, e, em alguns casos, podem funcionar tanto em soluções aquosas quanto em solventes orgânicos (CONTESINI *et al.*, 2010). Os benefícios alcançados pela utilização dos catalisadores enzimáticos são a não ocorrência de rejeito aquoso alcalino, baixa síntese de contaminantes e bons rendimentos (FERNANDES, 2007). Tendo em vista a grande biodiversidade de microrganismos, justifica a busca das indústrias por novas enzimas (CONTESINI *et al.*, 2010). Em se tratando de enzimas microbianas, são os fungos filamentosos que são considerados como as melhores fontes e produtoras de lipases, pois sintetizam lipases extracelulares, facilitando sua extração do meio fermentativo (CONTESINI *et al.*, 2010; BIROLI *et al.*, 2015).

2.2.3. Características das lipases

Um dos fenômenos mais conhecidos criado por estudos cinéticos de reações realizados por lipases é a “ativação interfacial”, de certa maneira que, se torna responsável pelo aumento da atividade lipolítica em consequência dos substratos. Em meio de emulsão ocorre uma mudança na estrutura tridimensional da enzima (MESSIAS *et al.*, 2011). Essa mudança ocorre na maioria das lipases em que o sítio ativo existente na enzima está coberto por cadeias proteicas de caráter hidrofóbicas denominadas “lid”, (tampa). Quando essa lid está em uma interface água-óleo, ocorre uma interação entre elas, que por sua vez sofre uma mudança conformacional (onde que a lid se move alterando de modo “fechado” para modo “aberto”), expondo seu sítio ativo, permitindo a catálise da reação (MESSIAS *et al.*, 2011; ZORN *et al.*, 2016).

As características e a estrutura química das lipases microbianas se diversificam dependendo do microrganismo, do gênero, da espécie e também da cepa.

A utilização de lipases microbianas industriais resulta a partir de suas propriedades como, a estabilidade frente ao pH (2,0 e 11,0) e temperatura (30 e 100 °C) além de não dependerem de co-fatores. Assim, as lipases microbianas apresentam uma diversidade em relação ao uso de substratos, estabilidade ao pH, temperatura e solventes orgânicos, contudo estas propriedades podem variar até entre os mesmos microrganismos (BOTTON, 2014).

Com relação ao pH, foram observadas atividades entre 7,5 e 9,0 com a espécie *Bacillus stearothermophilus* (KAMBOUROVA *et al.*, 2003), existindo também espécies como *Staphylococcus epidermidis*, onde atuou com ampla faixa de pH entre 2,0 e 10,0 (SIMONS *et al.*, 1998), e a espécie *Thermomyces lanuginosa* que alcançou um pH ótimo de 9,0 e uma temperatura que variou entre 55 e 60°C (LAGE *et al.*, 2016).

As lipases de *Streptomyces coelicolor*, apresentaram temperatura ótima de 70°C e lipases bacterianas como a *Pyrobaculum calidifontis*, mostraram atividade ótima à 100°C (HOTTA *et al.*, 2002; CÔTÉ & SHARECK, 2008).

As lipases apresentam especificidade com relação ao substrato. “*In vivo*” realizam a hidrólise de mono-, diacil- e triacilglicerol, ou seja, fazem a hidrólise da ligação ésteres conforme a posição da molécula e ácidos graxos nela contida, existindo a preferência por ácidos graxos de cadeia longa (FABER, 2011; BOTTON, 2014).

2.2.4. Aplicação das lipases

As lipases estão se tornando cada vez mais procuradas e utilizadas em diversas áreas, por causa de suas vantagens se comparado aos catalisadores químicos como: alta seletividade; catalisam reações em condições brandas de pH e temperatura; boa estabilidade; não necessitam de co-fatores; são biodegradáveis; não geram produtos tóxicos, poluentes (*white biotechnology*) e subprodutos, proporcionando um menor gasto de água e energia (BOTTON, 2014; KRÜGER, 2017 ESTEVES, 2018).

A Tabela 1 demonstra as principais aplicações industriais das lipases.

Tabela 1. Resumo das principais enzimas utilizadas na indústria

Setor	Aplicações das lipases	Produto
Alimentos		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite.	Formação do aroma para produtos lácteos
Panificação	Melhora sabor e qualidade, prolongamento da vida útil do alimento.	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhora aroma e aumenta a velocidade da fermentação, por remoção de lipídios.	Bebidas alcoólicas como o saquê, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo, carnes e peixes	Melhora a qualidade do ovo por hidrólise dos lipídios, desenvolvimento do aroma e remoção de gordura.	Maionese, produtos embutidos.
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais, hidrólise de óleos	Óleos e gorduras modificadas
Químico		
Química fina	Síntese de Ésteres	Ésteres
Detergentes	Retirada de manchas de gorduras de alimentos	Detergentes
Farmacêutico e Médico		
Medicina	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivo
Cosmético Analítico	Remoção de Lipídios Análise de triglicerídeos no sangue	Cosméticos em geral Diagnóstico

Fonte: SALIHU & ALAM, 2015

As lipases se destacam como biocatalisadores devido suas várias aplicações, empregando-se nas indústrias de papel e celulose (remoção de material hidrofóbico), têxtil (remoção dos lubrificantes, e melhorias do oliéster), farmacêutica (auxiliar na digestão, cicatrização, higiene pessoal (BIROLI *et al.*, 2015), detergentes (hidrolisando os lipídios) (HASAN *et al.*, 2006), couro, alimentos (panificação, queijo, bebidas), cosméticos (tinturas de cabelos, tratamento de acne e caspas), biodegradação e tratamento de águas residuais (efluentes), e em síntese de ésteres de biodiesel (KODA *et al.*, 2010; ZAGO, 2010., PANDEY *et al.*, 2013; ANGAJALA *et al.*, 2016).

2.3. FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO – (FES)

Com relação ao reaproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas, a Fermentação em Estado Sólido (FES), vem sendo empregada como uma tecnologia de alternativa limpa, na qual o uso de substratos vem principalmente de resíduos agroindustriais como: torta de babaçu, farelo de trigo, bagaço de mandioca, casca de arroz, dentre outros. Estes resíduos apresentam vantagem na produção de enzimas, pois é possível recuperar e reutilizar as enzimas após a sua utilização em reações de hidrólise e síntese (BARRIOS-GONZÁLES, 2012; CAVALCANTE, 2018; SANTOS, 2018).

Há dois modelos básicos de fermentação que podem ser utilizados na produção de enzimas e outros metabólitos: Fermentação Submersa (FS), onde os substratos se encontram em meio líquido com nutrientes solúveis e a FES, onde os microrganismos se desenvolvem em substrato sólido, inertes, levemente umedecidos, ou praticamente na ausência de água livre. Os espaços existentes entre os fragmentos são ocupados com ar, facilitando o processo de transporte de oxigênio e os microrganismos possuem a capacidade de se desenvolverem dentro do substrato, ou até mesmo sobre a superfície, consumindo o substrato e secretando enzimas (MITCHELL *et al.*, 2006).

A FES é, sobretudo compatível na produção de enzimas por fungos filamentosos, pois representa seu habitat natural, ou seja, com baixo teor de umidade, se tornando adequado para o desenvolvimento desses fungos. Esta é a principal condição que faz com que eles se adaptem bem e produzam enzimas com altos rendimentos comparados com a FS (OLIVEIRA *et al.*, 2017). A Tabela 2 apresenta algumas diferenças entre os processos de FES e FS.

Tabela 2. Principais diferenças entre os processos de FES e FS.

Fermentação em Estado Sólido (FES)	Fermentação Submersa (FS)
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Consumo limitado de água	Grandes quantidades de consumo de água
Baixa capacidade de transferência de calor	Fácil controle de temperatura
Aeração requer elevado fluxo	Fácil aeração e grande área de contato
Substrato tampão	Fácil controle de pH
Inoculação de esporos em batelada	Fácil inoculação, processo contínuo
Risco de contaminação por fungos	Risco de contaminação por bactérias
Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos	Grandes volumes e elevado custo tecnológico

Fonte: RAIMBAULT, 1997; RODRIGUES, 2006.

Inúmeros resíduos provenientes da agricultura, como soja, bagaço de cana, trigo, milho, girassol, cambre, estão sendo usados como substratos em FES com diferentes microrganismos por autores para a produção principalmente de lipases (SOCCOL *et al.*, 2017).

Neste trabalho utilizou-se a casca de arroz (CA) como suporte, farelo de semente de girassol (FSG) como substrato na FES, e glicerol como indutor do microrganismo na produção de lipases.

Quanto ao arroz, não se sabe bem ao certo se é originário da Índia ou da China, mas este cereal foi introduzido no Brasil pela frota de Pedro Álvares Cabral e seu primeiro cultivo foi relatado em meados de 1530 pela capitania de São Vicente. Porém foi em 1904 em Pelotas-RS, que surgiu a primeira lavoura feita para o comércio, e só depois de 1912 que o arroz teve grande impulso no País (CONAB, 2015).

O arroz é um dos cereais de maior importância econômica, é o terceiro cereal mais produzido e consumido no mundo, sendo um dos principais alimentos consumido em muitos países em desenvolvimento (CONAB, 2015).

Conforme a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de arroz com casca ultrapassou a margem de 700 milhões de toneladas em 2018, sendo que mais de 11 milhões de toneladas foram produzidas no Brasil (IBGE, 2019; SNA, 2018; CONAB, 2018).

De acordo com CONAB (2015), o arroz é uma planta da família das gramíneas, do gênero *Oryza*, tendo cerca de 20 espécies diferentes, onde a mais cultivada é a espécie *Oryza sativa*. É uma planta de cultura anual, sendo classificada no grupo das plantas C3, que possuem adaptação ao meio aquático (EMBRAPA).

A casca do arroz (*Oriza Sativa*) é um subproduto proveniente do arroz, e seu volume apresenta aproximadamente 20% da massa do arroz em casca (PANDEY, SOCCOL & MITCHELL, 1999). A casca de arroz possui em média, 50% de celulose, 30% de lignina e 20% de resíduos inorgânicos (POUEY, 2006).

O girassol (*Helianthus annuus L.*) foi utilizado neste trabalho como substrato na produção de lipases por FES.

O girassol é uma planta dicotiledônea, da família *Asteraceae*, nativa da América do Norte, sendo cultivada praticamente em todos os continentes, principalmente por resistir bem a seca, frio e calor (GAZZOLA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015).

De acordo com Pelegrin (1985), o cultivo dessa semente teve início no Brasil no século XIX, principalmente na região Sul, possivelmente trazido por colonizadores Europeus.

No entanto, foi por volta de 1902 em São Paulo, é que o girassol teve o cultivo comercial, quando a Secretaria da Agricultura distribuía as sementes para os agricultores (UNGARO, 1982).

Foi na década de 30 que a semente de girassol foi indicada como uma semente que poderia ser utilizada na produção de silagem, oleaginosa, alimentação de animais (ração), flor ornamental, entre outras (UNGARO, 1982).

O glicerol, utilizado neste trabalho como indutor na produção de lipases, é um líquido viscoso, incolor e inodoro descoberto em 1779 pelo farmacêutico Carl W. Scheele, conhecido também como propanotriol. Na natureza pode-se encontrar o glicerol em vegetais (soja, mamona, babau, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão) (ROSSI, 2015), e em animais, combinadas com ácidos graxos (triglicerídeos) (ROSSI, 2015).

O glicerol foi escolhido como indutor, uma vez que o mesmo é considerado como fonte de carbono, a qual os fungos filamentosos utilizam para a obtenção de energia (ROSSI *et al.*, 2016). Além disso, o glicerol é um dos coprodutos gerados da síntese de biodiesel, correspondendo em cerca de 10% em relação à produção total do biocombustível (ROSSI, 2015).

Os fungos filamentosos são fontes preferenciais para a produção de lipases pelo método FES, pois se adaptam em ambientes com baixa atividade de água (OLIVEIRA, 2013; BOTTON, 2014).

Os principais fungos citados na literatura para produção de lipases por FES são *Penicillium candidum*, *Mucor miehei*, *P.camembertii*, *Monascus fuliginosus*, *Rhizomucor pusillus* e *R. rhizopodiformis* aplicando o bagaço de cana (LIU *et al.*, 1995; CORDOVA *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2014), *Aspergillus niger* usando torta de gergelim (KAMINI *et al.*, 1998., RIBEIRO *et al.*, 2014); *P. restrictum* utilizando torta de babaçu (PALMA *et al.*, 2000; SILVA, 2017), *P. simplicissimum* usando torta de soja (DI LUCCIO *et al.*, 2004., REINEHR, *et al.*, 2016), *Aspergillus oryzae* aplicando a torta de óleo de coco (RAMACHANDRAN *et al.*, 2004; FERNANDES, 2007).

Desse modo, utilizou-se neste trabalho a lipase de *Penicillium sumatrense* produzida pela FES, tendo como suporte a casca de arroz (resíduo agroindustrial) e, o farelo de semente de girassol, como fonte de carbono, nitrogênio, lipídeos e outros componentes essenciais no seu desenvolvimento, para a síntese de éster do biodiesel (oleato de etila).

2.4. SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTER-OLEATO DE ETILA

O oleato de etila é sintetizado pela reação química ou enzimática, (esterificação) do etanol e do ácido oleico, reagindo entre si e produzindo o oleato de etila (éster etílico de ácido graxo) e água (MATOS, 2014; NYARI *et al.*, 2015). Os ésteres são compostos orgânicos de grande importância nas aplicações industriais, sendo elas farmacêuticas, alimentícias, cosméticas e também na composição de biocombustíveis, como o biodiesel (SOUZA, 2013).

Quando ocorre a síntese sem um catalisador, a reação se tornará lenta, para que isso não ocorra, será necessário à utilização de um catalisador adequado com a finalidade de se tornar um processo viável economicamente. Os processos catalíticos tradicionais são com o uso de catalisadores químicos, envolvendo ácido oleico e hidróxido de sódio (NaOH), ou óxido de cálcio (CaO), entre outros, para acelerar a reação (RAMOS *et al.*, 2017; LINO, 2019).

No entanto, estão sendo substituídos por catalisadores enzimáticos (biocatalisadores), apresentando benefícios (reutilização da enzima, não ocorrência de rejeito aquoso alcalino, redução na síntese de contaminantes e rendimentos desejados), e condições brandas em suas reações (temperatura, pH e estabilidade operacional) (CONTESINI *et al.*, 2010).

2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO DA LITERATURA

A preocupação com o meio ambiente proporciona ideias de projetos que levam à sustentabilidade do sistema de produção industrial. As indústrias de alimentos produzem vários resíduos com alto valor de reutilização. Vários projetos utilizando resíduos agroindustriais estão sendo realizados com objetivo de aproveitá-los.

Independente das grandes possibilidades de reutilização destes resíduos, a prática de descarte ainda é como aterro ou até mesmo queimadas ao ar livre, a qual é uma solução insatisfatória tanto sob o ponto de vista ambiental como econômico.

Resíduos oriundos das indústrias de alimentos aumentam cada vez mais, assim a preocupação em buscar uma utilização para este resíduo, se tornando inevitável.

Vegetais como arroz, trigo e milho apresentam em suas estruturas algumas partes que não são aproveitadas nas indústrias, como as folhas, caule e casca.

A casca de arroz devido à sua lenta biodegradação permanece inalterada por longos períodos de tempo, gerando enorme dano ao meio ambiente.

As pesquisas realizadas constantemente sobre as enzimas demonstram que a preocupação com o meio ambiente esta cada vez mais nítida e sua utilização em grande escala com a ideia em reduzir custos através do reaproveitamento de resíduos residenciais, ou agroindustriais, recebe cada vez mais destaque dentro das indústrias e das próprias unidades de ensino.

Considerando essas características, a Fermentação em Estado Sólido (FES) é uma tecnologia na redução de custos para a produção de enzima, tornando-se viável economicamente na aplicação da síntese de ésteres do biodiesel.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo geral produzir lipase fúngica de *Penicillium sumatrense*, isolado das folhas da mamona (*Ricinus communis L., Euphorbiaceae*). A enzima produzida foi aplicada na síntese do éster oleato de etila.

3.1.1. Objetivos Específicos

Fermentação em Estado Sólido

- Determinar parâmetros da FES como: granulometria, concentração do inóculo e tempo de cultivo;
- Otimizar a produção da lipase por FES;
- Produzir lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* por FES em condições ótimas;
- Determinar a atividade lipolítica através de testes analíticos.

Reações de Síntese

- Aplicar as lipases obtidas na síntese do éster (oleato de etila).;
- Otimizar as condições reacionais através de um planejamento experimental 2³, através das seguintes variáveis: RM ácido/etanol e temperatura;
- Avaliar a cinética de síntese do éster do biodiesel catalisada por lipases fúngicas pelo método espectrofotométrico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia proposta para este trabalho foi desenvolvida no Centro de Engenharia e Ciências Exatas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Toledo.

4.1. REAGENTES

Neste trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico e grau de pureza requeridos nos experimentos, como o Ágar BDA (KASVI), Goma Arábica (SYNTH), Acetona PA (CRQ), Etanol (CRQ, 95%), Piridina PA (SYNTH), Acetato de Cobre II PA (DINAMICA), Ácido Oleico, n-Heptano, e Hidróxido de Sódio.

4.2. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma cepa fúngica endofítica isolada das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*), identificada como *Penicillium sumatrense*. O fungo endofítico *Penicillium sumatrense* já está identificado por sequenciamento de DNA ribossomal, de acordo com metodologia descrita por Stringari (2009).

Para a manutenção da cepa, realizada a cada quatro meses, o fungo *Penicillium sumatrense*, foi incubado em meio BDA – cloridrato de tetraciclina (250 mg.L⁻¹ de meio BDA) e Clorafenicol (1% m/v), em placas de Petri ou frascos de Erlenmeyer (Figura 5). O fungo foi incubado em estufa a 28°C por quatorze dias. Após o crescimento, o fungo foi transferido e estocado em tubos estéreis contendo água estéril (CASTELANI, 1967). A cepa foi então armazenada, sob refrigeração, a 4°C.



Figura 5. Fungo *Penicillium sumatrense* incubado em meio BDA usando frascos de Erlenmeyer. (Fonte: O autor, 2019).

4.3. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

4.4. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

As análises de cinzas, teor de óleo, proteína e umidade foram realizadas em triplicatas pelo Laboratório de Qualidade de Alimentos (LQA), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em Toledo-PR.

Para a análise da composição centesimal, utilizou-se a metodologia descrita conforme Zenebon *et al.* (2008). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5. PRODUÇÃO DA LIPASE

Para a produção da enzima, foi utilizado como substrato, a semente de girassol (*Helianthus annuus*), adquirida no comércio local de Toledo e o resíduo agroindustrial casca de arroz (*Oryza sativa*) (Figura 6), adquirido da empresa Moinho Iguazu Ltda –Itaipulândia PR.



Figura 6. Substratos, semente de girassol (A) e casca de arroz (B). (Fonte: O autor, 2019)

4.5.1. Preparação do Inóculo

Para a preparação do inóculo foram utilizados frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio BDA – cloridrato de tetraciclina (250 mg L^{-1} de meio BDA) e cloranfenicol (1% m/v). O fungo foi incubado em estufa a 28°C por sete dias. Após o crescimento foi feita a solução de esporos (Figura 7) com pérolas de vidro e adição água estéril. Logo após, foi determinado o número de esporos em suspensão na solução, utilizando microscópio óptico (marca Bioval) com aumento de 400x e câmara de Neubauer (Raimbault & Alazard, 1980, citados por PARIS, 2008).

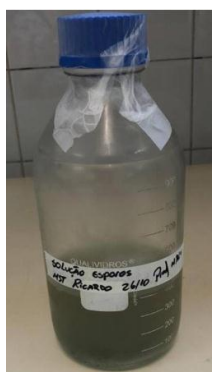


Figura 7. Solução de Esporos. (Fonte: O autor, 2019).

Para a realização da contagem, foi separado uma alíquota de 1 mL do inóculo da solução mãe de esporos e adicionado solução tampão fosfato para diminuir sua concentração de acordo com as variáveis requerida para o experimento. Essa diluição foi necessária para a possível contagem. Posteriormente a diluição, 1 gota da solução foi transferida para a superfície da câmara de Neubauer, preenchendo apenas um lado da câmara. Após, foram contadas as células nos 04 campos de um lado da câmara (quadrante A) e 1 no centro, (quadrante C), conforme Figura 8.

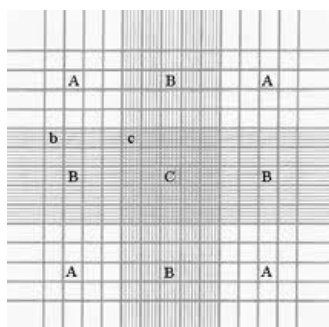


Figura 8. Marcações em quadrantes da câmara de Neubauer. (Fonte: GONÇALVES, 2011).

O cálculo da concentração de esporos foi feito de acordo com a Equação 01, utilizado como referência o método proposto por PARIS (2008), com pequenas modificações.

$$C_{\text{esp}} \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) = \text{n}^\circ \text{ médio de esporos contados} \times 5 \times 10^4 \times \text{fator de diluição} \quad (01)$$

4.5.2. Condições de Cultivo

Nos estudos preliminares, avaliou-se a cinética de produção de lipases de *Penicillium sumatrense*, utilizando-se a semente de girassol (*Helianthus annuus*) como substrato e o resíduo agroindustrial casca de arroz (*Oryza sativa*), durante 168 h de fermentação, contendo uma solução de esporos de 10^8 esporos g^{-1} , a 28°C , 55 % de umidade (tampão fosfato 50 mM, pH 7,0) e granulometria do substrato entre 1,19 mm (16 Mesh) e 2,0 mm (10 Mesh) de diâmetro. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores de atividade lipolítica foram obtidos pelo método titulométrico, conforme item 5.7.1.

Os ensaios de FES foram realizados conforme metodologia descrita por Fernandes (2007) com adaptações.

4.5.2.1. Cinética de Produção de Lipases com diferentes proporções de substratos

Nestes estudos de FES, foram realizados estudos cinéticos em cinco diferentes proporções: 0%, 25%, 50%, 75% e 100%, em que 0% refere-se somente a CA e 100% refere-se somente a FSG. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o preparo, os substratos foram inoculados assepticamente com o inóculo. Nos estudos cinéticos, os sólidos foram incubados em estufa a 28°C durante 24, 48, 72, 96 e 120, 144 e 168 h. Este estudo cinético foi realizado para se determinar o pico máximo de produção de lipases. A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica (método titulométrico) no material fermentado. A atividade lipolítica é expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido fermentado (U gss^{-1}).

4.5.2.2. Cinética de Produção de Lipases com adição de indutor

Nestes estudos de FES, foram realizados estudos cinéticos em três diferentes proporções de indutor (glicerol): 1%, 3% e 5%. Nestes estudos, utilizaram-se 25 % de FSG e 75% de CA. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o preparo, os substratos foram inoculados assepticamente com o inóculo. Nos estudos cinéticos, os sólidos foram incubados em estufa a 28°C durante 24, 48, 72, 96 e 120, 144, 168 e 192 h. A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica (método titulométrico) no material fermentado.

4.5.3. Secagem do Sólido Fermentado

Em todos os experimentos envolvendo FES, os sólidos fermentados foram congelados a 0°C, por 24 h, para interromper o crescimento fúngico. Após esse período, foram secos em estufa em circulação de ar por 48 h à 30°C, acondicionados em embalagens plásticas e armazenados em geladeira.

4.6. BIOCATALISE

4.6.1. Estudo de Reação de Síntese do éster Oleato de Etila

O estudo da síntese foi realizado de maneira direta utilizando, o sólido fermentado. Neste estudo, a enzima foi produzida através da FES utilizando-se a CA e o FSG, no pico máximo da produção da enzima.

4.6.1.1. Ensaios de Síntese do éster Oleato de Etila (Planejamento Experimental 2³)

Foram realizados estudos para determinar qual condição é necessária para se obter um maior rendimento em éster. Utilizou-se como reagente ácido oleico e o etanol (RM 1:3, 1:6 e 1:9), a atividade enzimática (30,0, 60,0 e 90,0 U), em n-heptano nas temperaturas de (30, 37 e 44°C), conforme Tabela 3. As reações foram realizadas em incubadora shaker a 200 rpm por

9 horas, retirando-se amostras a cada hora. A resposta do Planejamento foi a conversão em éster (%), avaliada pelo método espectrofotométrico de Lowry-Tinsley (1976).

Tabela 3. Planejamento Experimental 2³.

Experimento	Temperatura (°C)	Atividade (U)	RM (ácido/álcool)
1	-1 (30,0)	-1 (30,0)	-1 (3,0)
2	-1 (30,0)	+1 (90,0)	-1 (3,0)
3	+1 (44,0)	-1 (30,0)	-1 (3,0)
4	+1 (44,0)	+1 (90,0)	-1 (3,0)
5	-1 (30,0)	-1 (30,0)	+1 (9,0)
6	-1 (30,0)	+1 (90,0)	+1 (9,0)
7	+1 (44,0)	-1 (30,0)	+1 (9,0)
8	+1 (44,0)	+1 (90,0)	+1 (9,0)
9*	0 (37,0)	0 (60,0)	0 (6,0)
10*	0 (37,0)	0 (60,0)	0 (6,0)
11*	0 (37,0)	0 (60,0)	0 (6,0)

* Pontos centrais em triplicata.

Para cada ensaio, foi realizado o branco contendo somente o material fermentado, sem a presença do ácido oleico, tendo como objetivo a confirmação que o estudo da reação de síntese do éster oleato de etila ocorra exclusivamente pela presença da lipase.

4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico

A dosagem da atividade enzimática foi determinada pelo método titulométrico descrito por Stuer *et al.* (1986), com adaptações. Para as dosagens foi preparada uma emulsão contendo óleo de oliva (7,15% m/v) emulsão de goma arábica (7% m/v) em tampão fosfato 2,5 mM e pH 7,0. O ensaio foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL, adicionando-se 20 mL da emulsão e 1 grama do sólido fermentado moído. As amostras foram incubadas em Shaker, sob agitação, por 20 minutos, a 37°C. A reação foi paralisada adicionando-se 20 mL de

solução de etanol/acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados em solução de NaOH (0,05 M) até pH 10 (Figura 9).



Figura 9. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico. (Fonte: Autor, 2019).

A atividade lipolítica foi determinada de acordo com a Equação 02, no qual, uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, sendo o resultado expresso em unidades totais por fermentação.

$$A = \frac{\Delta V}{\Delta t} \cdot \frac{NaOH \cdot Fc \cdot 60s}{1000ml \cdot 1min} \quad (02)$$

Em que:

A: Atividade Enzimática ($\text{U}_{\text{gss}}^{-1}$ – Unidades por grama de substrato seco);

ΔV : volume de NaOH utilizado na titulação (mL);

Δt : tempo de hidrólise (s)

$NaOH$: Molaridade da solução de hidróxido de sódio (mol L^{-1})

Fc = fator de correção do NaOH

4.7.2. Determinação de Atividade Lipolítica-Método Espectrofotométrico

O método espectrométrico (Lowry & Tinsley, 1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácidos graxos durante a síntese enzimática do éster do biodiesel, a partir do ácido oleico.

Este método serve para quantificar o teor residual de ácidos graxos durante a síntese do éster oleato de etila, possibilitando os cálculos dos rendimentos de esterificação e da

atividade enzimática de hidrólise. Na reação de esterificação, a atividade é calculada pela ausência do ácido graxo ao meio reacional. Uma unidade de atividade de esterificação condiz com a quantidade de enzima que ocasiona a síntese de 1 μmol de éster na unidade de tempo nas condições do experimento. Na reação de hidrólise, a atividade é calculada a partir da liberação dos ácidos graxos no meio reacional, assim, uma unidade de atividade de hidrólise corresponde com a quantidade de enzima que ocasiona a liberação de 1 μmol de ácido graxo na unidade de tempo.

O método baseia-se na ligação entre os ácidos graxos livres e os íons Cobre II em meio orgânico, possibilitando a avaliação do percentual de ácidos graxos convertidos a ésteres (Figura 10).

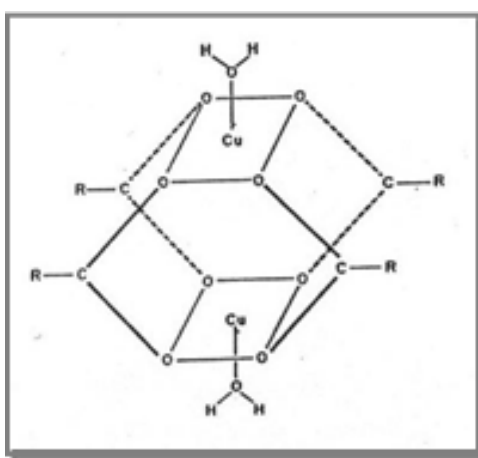


Figura 10. Complexo formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres (FERNANDES, 2007).

Adicionou-se 0,2 mL do meio reacional a 2,4 mL de tolueno e 0,5 mL da solução de piridina e acetato de cobre II (5%). As reações foram agitadas em vórtex por 30 segundos e a fase orgânica lida em espectrofotômetro em 715 nm. A conversão dos ésteres foi calculada a partir do consumo do ácido graxo no meio reacional.

A concentração de ácido graxo no meio é referente entre a absorvância pela curva de calibração feita com o ácido oleico (Dinâmica Química Contemporânea, 98% de pureza) que foi obtida nas mesmas condições do ensaio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

A composição físico-química dos resíduos, casca de arroz (CA-*Oriza sativa*) e farelo de semente de girassol (FSG-*Helianthus annuus*), como cinzas, umidade e teor de óleo (lipídios), apresentada na Tabela 4, foi determinada no Laboratório de Qualidade de Alimentos (LQA) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, campus Toledo.

Tabela 4. Composição físico-química da casca de arroz (*Oriza sativa*) e girassol (*Helianthus annuus*).

Parâmetro	Resíduo	
	Arroz (CA)	Girassol (FSG)
Cinzas	20,64% ± 0,78	3,51% ± 0,34
Umidade	8,93% ± 0,03	4,44% ± 0,17
Teor de Óleo	0,47% ± 0,12	48,9% ± 0,12

Ao analisar os resultados da Tabela 4, verifica-se que o teor de óleo da CA é extremamente baixo (menor que 1%) em comparação à FSG (48,9%). A CA foi utilizada como suporte para a produção de lipases fúngicas por FES, enquanto o girassol como substrato. Este substrato é de fácil obtenção, se tornando ótima opção para a FES e produção de enzimas, uma vez que a FSG servirá como fonte de lipídios, que induzem a produção de lipases.

Conhecidos também a umidade de cada um dos substratos, pode-se ajustar a umidade disponível durante a fermentação de modo a favorecê-la.

Após determinar a composição físico-química dos substratos, realizou-se então um estudo cinético de fermentação para os dois substratos escolhidos para o estudo.

5.2. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE SUBSTRATOS

Para a determinação da atividade enzimática, foram realizados estudos cinéticos em cinco diferentes proporções, 0%, 25%, 50%, 75% e 100% de FSG. Nestas proporções 0% refere-se somente a CA e 100% refere-se somente ao FSG.

A FES foi realizada com granulometria dos substratos entre 10 (2,0 mm) e 16 Mesh (1,19 mm), 55% de umidade, 27°C e 168 h de fermentação. Os experimentos foram realizados em triplicata. Partindo-se desse ponto, foi possível determinar o pico máximo de produção de enzima. Os valores da atividade enzimática foram obtidos pelo método titulométrico (4.7.1). A Figura 11 apresenta os resultados obtidos.

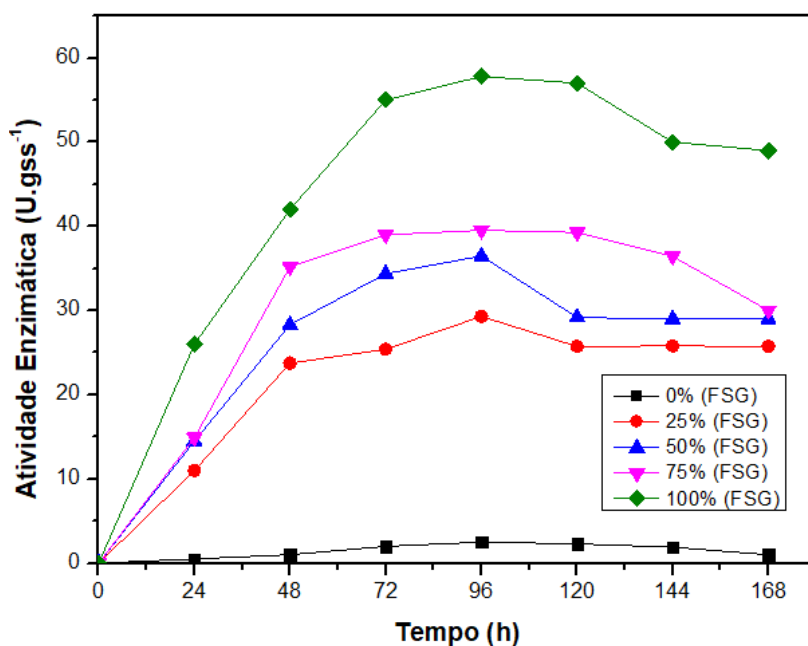


Figura 11. Cinética de produção de lipases de *Penicillium sumatrense* por FES. Os ensaios foram realizados em triplicatas, com umidade de 55% em 27°C.

O material sólido escolhido como substrato para a FES foi à casca de arroz, CA (*Oryza sativa*), proveniente de resíduos agroindustriais e farelo da semente de girassol, FSG (*Helianthus annuus*), adquiridas no comércio local. A CA serviu como suporte físico, pois aponta baixo teor de lipídio (menor que 1%), enquanto o FSG atuou como fonte de carbono, nitrogênio e outros componentes fundamentais, tal como o lipídio (48,9%), necessário para o desenvolvimento do microrganismo no meio fermentativo (Figura 12). Para determinar a atividade lipolítica, utilizou-se o método titulométrico (4.7.1).

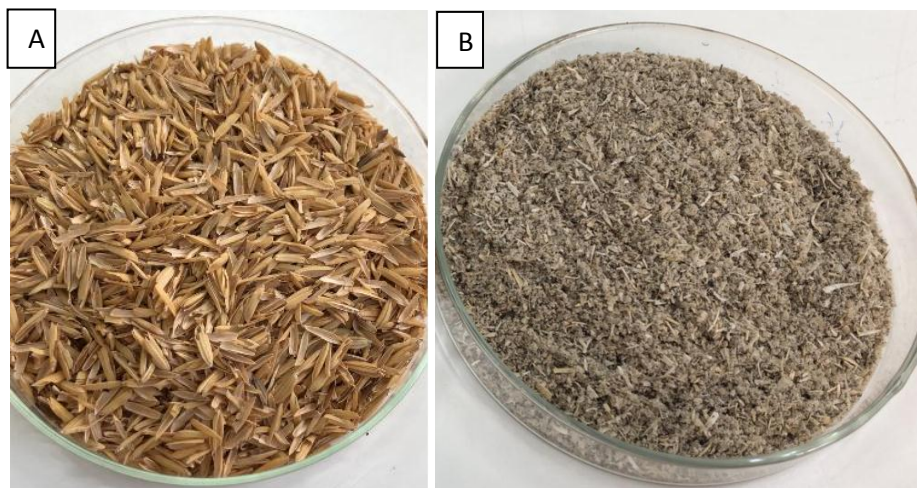


Figura 12. CA como suporte físico (A), enquanto o FSG (B) atuou como fonte de carbono. (Fonte: O autor, 2019).

Os resultados observados na Figura 11 demonstraram que após ser acrescentado o FSG com suas respectivas porcentagens, houve um aumento de atividade enzimática. Isso ocorreu devido à disponibilidade de nutrientes existentes no substrato, principalmente o lipídio (48,9%).

Nota-se também que o melhor resultado ocorreu com 96 h de fermentação, obtendo-se uma atividade enzimática de $55,8 \text{ Ugss}^{-1}$ com 100% de girassol; $39,3 \text{ Ugss}^{-1}$ com 75%; $35,8 \text{ Ugss}^{-1}$ com 50%; $29,3 \text{ Ugss}^{-1}$ com 25% e de $4,6 \text{ Ugss}^{-1}$ com 0% de FSG (Figura 13).



Figura 13. Resultado com 96 h de fermentação, obtendo-se uma atividade enzimática de $29,3 \text{ Ugss}^{-1}$, utilizando 25% de FSG acrescentado na CA. (Fonte: O autor, 2019).

Após esse tempo, nota-se uma estabilidade ou até mesmo uma diminuição em sua atividade, possivelmente devido à diminuição da fonte de nutriente presente no substrato e a

produção de protease pelos fungos, os quais passam a utilizar outras fontes de carbono menos abundante, sendo capazes de fazer a hidrólise em ligações peptídicas contidas nas proteínas e nas outras enzimas, desnaturando e diminuindo a concentração de lipase (OLIVEIRA, 2013).

O item mais importante para produção de enzima por FES é o substrato utilizado. Na FES, microrganismos se desenvolvem em substrato sólido, inertes, umedecidos ou na ausência de água livre (Mitchell *et al.*, 2006), sendo assim o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato ou sobre a sua superfície, absorvendo os nutrientes disponíveis e produzindo metabólitos, entre eles a enzima.

Ao analisar o trabalho de Krüger (2017), a qual realizou um estudo com torta de crambe (TC) como substrato na FES e o fungo *Penicillium sumatrense* como produtor de lipases, verificou-se que a autora obteve uma atividade enzimática máxima de 24,30 Ugss⁻¹ em 96 h de fermentação, com 60% de umidade, granulometria de 28 mesh (0,6 mm) e temperatura de 27°C.

Outros trabalhos foram reportados na literatura e demonstram que o presente trabalho está de acordo com a literatura. Martins *et al.* (2016) utilizaram farelo de trigo como substrato e o fungo *Aspergillus sp* como produtor de lipase e obtiveram sua maior atividade lipolítica (68,53 Ugss⁻¹) em 168 h de fermentação, com temperatura de 35 °C e 65% de umidade.

Utilizando farinha de sementes de mangaba juntamente com *Aspergillus niger*, Souza *et al.* (2015) produziram lipase a partir da FES obtendo-se máxima atividade (244,98 Ugss⁻¹), com 70% de umidade em 168 h de fermentação com temperatura de 37 °C.

Para a produção da lipase utilizando o *Aspergillus niger*, Muruci *et al.* (2012), utilizaram farelo de trigo triturado com diferentes concentrações de borra de girassol e 60 mL de solução de sulfato de amônio como fonte de nutrientes, incubada a 32° C por 48 h contendo 10⁶ esporos/g de meio, onde obtiveram uma maior atividade lipásica de 238 Ugss⁻¹.

De acordo com o trabalho de Santos *et al.* (2012), utilizando farinha de sementes de abóbora como substrato e o fungo *Aspergillus niger* como produtor de enzima, através do FES obtiveram uma máxima atividade enzimática de 71,88 Ugss⁻¹ (30% de umidade, 30 °C e 120 h de fermentação).

No trabalho de Zago (2010), foram estudadas diferentes temperaturas e diferentes granulometrias utilizando-se o bagaço de cana como substrato e o fungo *Rhizopus microsporus* como produtor de lipases. A autora obteve maior atividade lipolítica (25,2 Ugss⁻¹) com o sólido moído nas frações entre 8 e 40 mesh e temperatura de 37 °C.

Vargas (2004) utilizou torta de soja e *Penicillium simplicissimum* como produtor de lipase, sendo determinada uma maior produção de enzima (30 Ugss^{-1}) com 67 h de fermentação, $27,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e 55% de umidade.

A Tabela 5 resume os dados apresentados nos textos para diferentes microrganismos, tipos de suportes e diferentes condições operacionais.

Tabela 5. Comparação dos dados obtidos com a literatura.

Microrganismo produtor da lipase	Tempo (h)	Umidade (%)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Atividade enzimática (Ugss^{-1})	Substrato	Referência
<i>P. sumatrense</i>	96	55	27,0	29,30	Casca de arroz	Este trabalho
<i>P. sumatrense</i>	96	60	27,0	24,30	Torta de crambe	Krüger (2017)
<i>Aspergillus sp</i>	168	65	35,0	68,53	Farelo de trigo	Martins <i>et al.</i> (2016),
<i>A. niger</i>	168	70	37,0	244,98	Farinha de sementes de mangaba	Souza <i>et al.</i> (2015)
<i>A. niger,</i>	48	---	32,0	238,00	Farelo de trigo	Muruci <i>et al.</i> (2012)
<i>A. niger</i>	120	30	30,0	71,88	Farinha de sementes de abóbora	Santos <i>et al.</i> (2012)
<i>R. microsporus</i>	---	---	37,0	25,20	Bagaço de cana	Zago (2010)
<i>P. simplicissimum</i>	67	55	27,5	30,00	Torta de soja	Vargas (2004)

5.3. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES COM ADIÇÃO DE INDUTOR

Um novo experimento cinético foi realizado para verificar o efeito da adição de um indutor, o glicerol (Figura 14), com a intenção de estimular o crescimento e o metabolismo do microrganismo e, assim aumentar a produção de lipases.

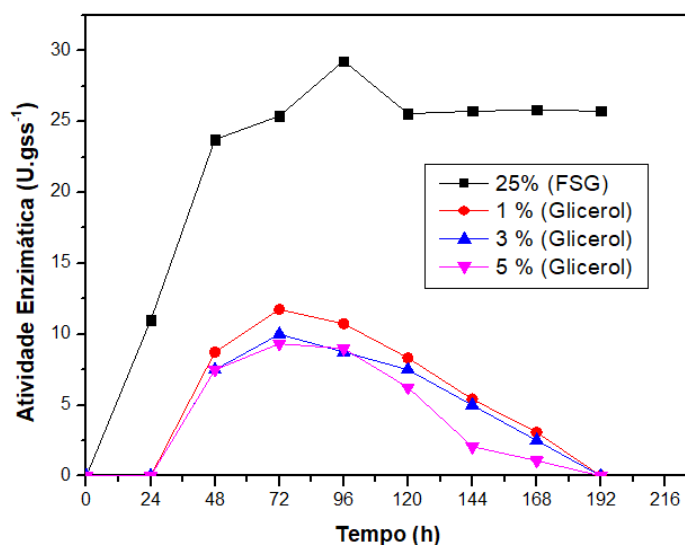


Figura 14. Cinética de produção de lipase fúngica de *Penicillium sumatrense* por FES utilizando diferentes proporções de glicerol. Os ensaios foram realizados com umidade de 55% e de 27 °C.

O glicerol foi escolhido como indutor, uma vez que o mesmo é considerado como fonte de carbono, a qual os fungos filamentosos utilizam para a obtenção de energia (ROSSI *et al.*, 2016). Além disso, o glicerol é um dos coprodutos gerados da síntese de biodiesel, correspondendo em cerca de 10% em relação à produção total do biocombustível (ROSSI, 2015).

Analisando-se a Figura 14, é possível observar que, embora o glicerol seja a fonte uma fonte de carbono extra para o microrganismo, a adição do mesmo inibiu a produção de lipases. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que o glicerol, dependendo da concentração utilizada, pode apresentar toxicidade, e com isso dificultar a assimilação dos substratos para a produção de enzima (DASARI, *et al.*, 2005).

Rossi (2015) avaliou a viabilidade da utilização do glicerol como fonte de carbono para o cultivo de *Aspergillus oryzae* em substituição à glicose para a produção de pectinases, utilizando o extrato de farelo trigo, determinando que a atividade enzimática utilizando o glicerol (11,4 UmL⁻¹) foi maior em relação ao que estava contendo somente a glicose (9,5 UmL⁻¹).

Em contrapartida, Reinehr (2016), verificou a produção de lipase por FES a partir da mistura de 85% de farelo de soja e 15% de casca de soja utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, estudando a influência do indutor (óleo de soja, glicerol) no processo. O autor obteve os melhores resultados das atividades de hidrólise utilizando 2% de

óleo de soja, com valores de atividade de 7,69 Ugss⁻¹ para o fungo *Aspergillus fumigatus*, e 1,03 Ugss⁻¹ para o fungo *Aspergillus niger*. Quando o autor aplicou glicerina (1%) como indutor, obteve resultados inferiores, 3,97 Ugss⁻¹ para o fungo *Aspergillus fumigatus* e não obteve atividade enzimática para o fungo *Aspergillus fumigatus*.

Isso indica que embora o glicerol seja assimilável por bactérias, fungos e leveduras, sob condições favoráveis, como principal fonte de carbono, pode ocorrer uma desaceleração durante o crescimento celular, justificando assim a menor ou nula produção de lipase com esse indutor.

Após realizar os ensaios cinéticos de produção de lipases com adição de indutor, iniciaram-se os estudos de síntese enzimática do éster oleato de etila.

5.4. RESULTADOS DO ENSAIO PRÉVIO PARA DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA REACIONAL

O oleato de etila, o éster sintetizado neste trabalho, tem por utilização como aditivo biológico, plastificante do policloreto de vinila (PVC), e também como fluido hidráulico (KRÜGER, 2017).

Nestes experimentos, utilizou-se 25% de FSG e 75% da CA, 55% de umidade, em 96 horas de fermentação e 27 °C. O substrato de fermentação foi utilizado inteiro e triturado (moído), para verificar se a granulometria das partículas afetava na síntese do éster oleato de etila.

Resultados anteriores demonstraram que o uso de 25% de FSG e 75% de CA atingiu uma atividade enzimática de 29,3 Ugss⁻¹. Estas condições foram utilizadas para a produção de lipases, que foram aplicadas como catalisadores na síntese do éster oleato de etila. Embora ao utilizar-se mais FSG (75%) a atividade enzimática tenha aumentado para 39,3 Ugss⁻¹, optou-se pela opção de 25%, tendo em vista que o FSG é um substrato de maior valor agregado.

Ensaio prévios da síntese do éster oleato de etila foram realizados antes dos testes do planejamento experimental. Os experimentos foram realizados a 37°C, razão molar 1:6 (ácido oleico: etanol) e atividade enzimática 60 U. Os resultados estão apresentados na Figura 15.

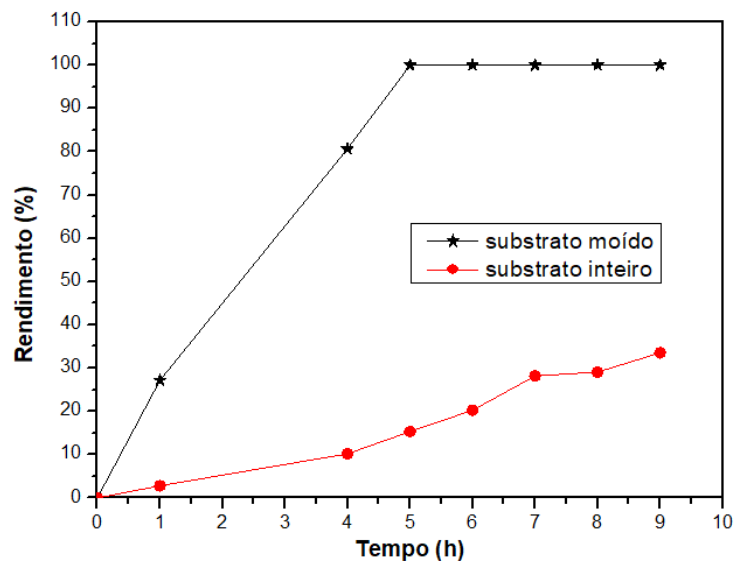


Figura 15. Variação no rendimento do éster oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, em substrato moído e em substrato inteiro, contendo a lipase de *Penicillium sumatrense* produzida por FES. Condições dos ensaios: 37°C, n-heptano, RM 1:6 (ácido:álcool) e 60,0 U de atividade enzimática.

Analisando a Figura 15, pode-se afirmar que a reação atinge o equilíbrio químico após 5 h de reação (100%) para o substrato moído, enquanto que para o substrato inteiro, obteve-se apenas 34% de conversão em éster, após 9 h de reação.

Os ensaios prévios mostraram que o melhor resultado foi obtido utilizando-se o sólido fermentado moído, onde a enzima catalisou a síntese do éster oleato de etila, após 5 h de reação (Figura 15), com a conversão em éster (100%) obtida a 37 °C.

Esses resultados estão relacionados, provavelmente, à exposição dos sítios ativos presentes na enzima. Quando a enzima estava aderida à casca de arroz, uma parte da sua área estava coberta, o que dificultou ou até impediu a ocorrência da reação catalítica, enquanto que ao ser moída e separada (peneiramento) da casca de arroz, toda área superficial da enzima estava disponível, o que justifica o aumento na taxa de reação, uma vez que maior quantidade de sítios ativos estava disponível para que a reação pudesse ocorrer (Figura 16).

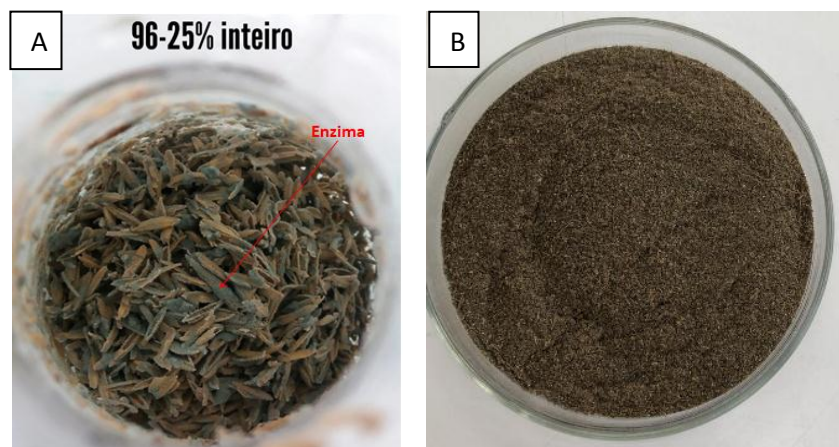


Figura 16. Enzima lipase aderida à casca de arroz (A) e material sólido fermentado moído (B). Fonte: O autor.

Após a realização dos ensaios prévios de síntese do éster oleato de etila e a escolha da melhor condição física do sólido fermentado, realizou-se um planejamento experimental, para determinar o efeito da razão molar, temperatura e atividade enzimática na reação de conversão em oleato de etila.

5.5. ENSAIOS DE SÍNTESE DO ÉSTER OLEATO DE ETILA (PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³)

Posteriormente aos ensaios preliminares da cinética de produção de enzima, utilizando-se 25% de FSG com 75% da CA moída na FES, foi realizado um delineamento fatorial para otimizar a síntese do éster oleato de etila (Figura 17).

Os níveis propostos para este planejamento fatorial 2³ foram baseados em ensaios previamente realizados. Para este experimento, foi assumido o valor de p igual a 0,05, que indica a probabilidade do resultado obtido ter uma confiança de 95%. O delineamento experimental e as análises dos efeitos gerados pelas variáveis bem como seus valores de p foram calculados empregando o software *Statistica 7.0*.

Verificou-se então o efeito da temperatura, razão molar e atividade enzimática na síntese do éster oleato de etila. Os resultados dos ensaios realizados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados experimentais do delineamento fatorial 2^3 aplicado no estudo da síntese do éster oleato de etila durante 4 h de reação.

Exp	Temperatura (°C)	Atividade U	RM (ácido: álcool)	% Éster
1	-1 (30,0)	-1 (30,0)	-1 (3,0)	18,6 ± 0,35
2	-1 (30,0)	+1 (90,0)	-1 (3,0)	45,6 ± 0,00
3	+1 (44,0)	-1 (30,0)	-1 (3,0)	34,0 ± 3,09
4	+1 (44,0)	+1 (90,0)	-1 (3,0)	8,90 ± 0,07
5	-1 (30,0)	-1 (30,0)	+1 (9,0)	14,5 ± 2,04
6	-1 (30,0)	+1 (90,0)	+1 (9,0)	36,7 ± 0,38
7	+1 (44,0)	-1 (30,0)	+1 (9,0)	28,1 ± 3,26
8	+1 (44,0)	+1 (90,0)	+1 (9,0)	12,1 ± 2,24
9	0 (37,0)	0 (60,0)	0 (6,0)	59,6 ± 2,38
10	0 (37,0)	0 (60,0)	0 (6,0)	64,3 ± 2,38
11	0 (37,0)	0 (60,0)	0 (6,0)	62,6 ± 2,38

Com o propósito de avaliar o efeito das condições operacionais investigadas foi utilizado o gráfico de Pareto a um nível de significância de 5%, representado pela Figura 18.

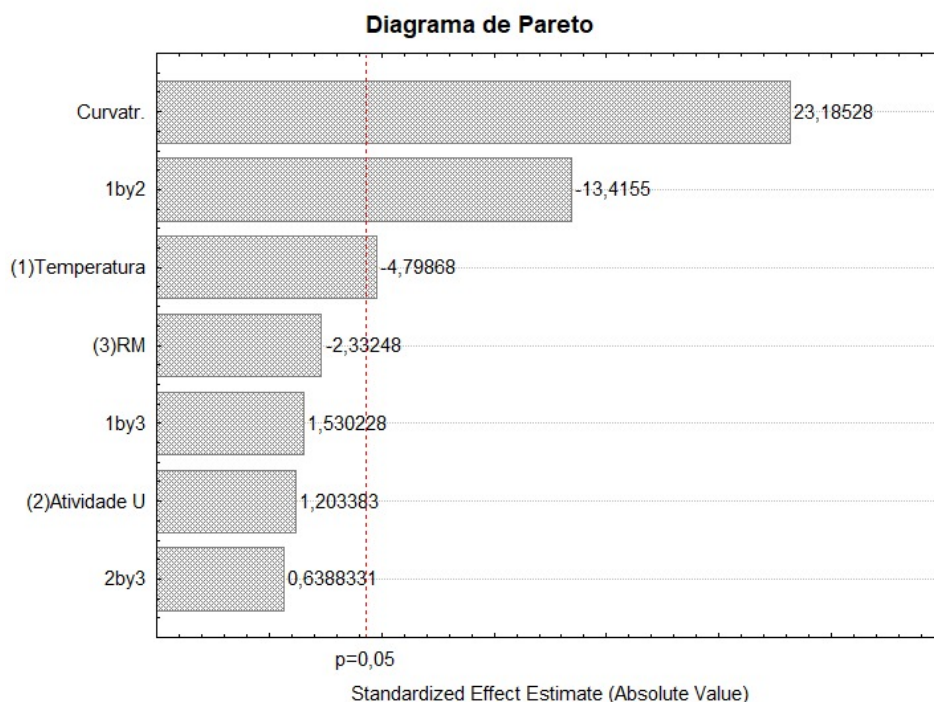


Figura 17. Gráfico de Pareto na interação dos efeitos das variáveis na síntese do éster oleato de etila, com um intervalo de 95% de confiança.

Ao analisar a Figura 18, é possível observar as variáveis Curvatura e Temperatura, bem como a interação entre Temperatura e Atividade Enzimática são estatisticamente significativas dentro dos níveis avaliados a 95% de confiança.

O modelo foi validado a partir do valor de F obtido (Tabela 7), para o intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) do modelo para a síntese do éster oleato de etila.

	SQ	GL	SM	F
Modelo	4272,77	8,00	534,10	94,31
Erro	11,33	2,00	5,66	
Total	4284,10	10,00		

SQ: Soma dos Quadrados; GL: Graus de Liberdade; SM: Soma dos Quadrados Médios; F: Distribuição F de Fisher-Snedecor

Observa-se pela Tabela 7 que o valor F de Fisher-Snedecor obtido para o modelo é 94,31. Com os valores dos graus de liberdade do modelo e do erro, encontrou-se o valor do F tabelado como sendo 19,37. Como o valor F obtido é superior ao valor F tabela, o modelo é considerado significativo e válido. O modelo obtido, em variáveis codificadas, é apresentado na Equação 03.

$$\%Éster = 24,813 - 4,037 \cdot T + 1,012 \cdot U - 1,962 \cdot RM - 11,288 \cdot T \cdot U + 1,288 \cdot T \cdot RM + 0,537 \cdot U \cdot RM + 1,738 \cdot T \cdot U \cdot RM + 32,35 \cdot PtCt \quad (03)$$

Os resultados da distribuição dos valores observados e previstos pelo modelo são apresentados na Figura 19. Percebe-se na Figura 19, que os pontos observados e preditos não se distanciam da reta identidade, afirmando que o modelo segue uma distribuição normal. Além de tudo, o modelo expõe a distribuição do erro de forma aleatória, indicando a eliminação da existência de erros sistemáticos ou em outras palavras, que a análise seja tendenciosa, atribuindo uma maior confiabilidade ao modelo.

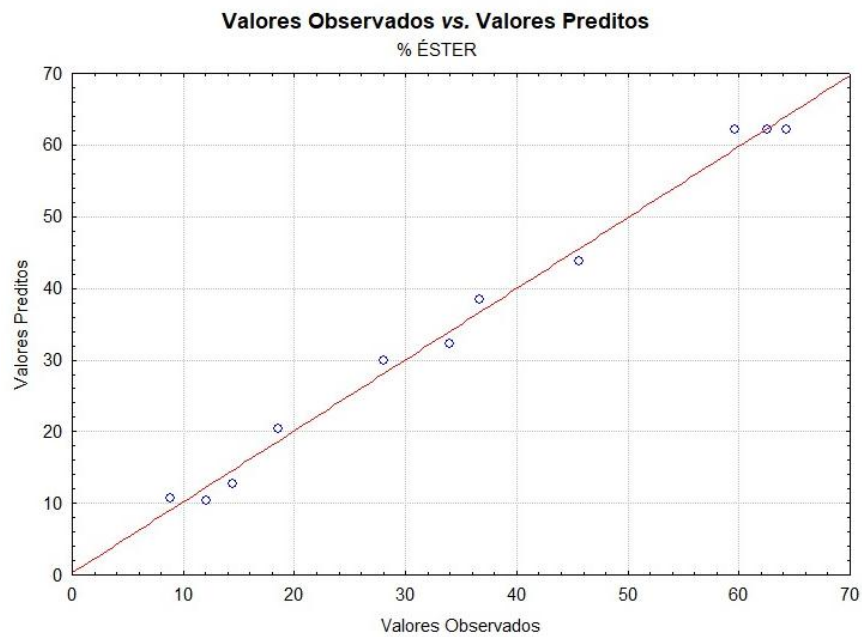


Figura 18. Gráfico de paridade para mostrar a distribuição dos valores observados e os valores preditos para a síntese do éster oleato de etila.

Os gráficos de contorno e de superfícies de respostas obtidas são apresentados na Figura 20, concluindo que a síntese do éster oleato de etila é influenciada pelo efeito combinado da temperatura e atividade enzimática.

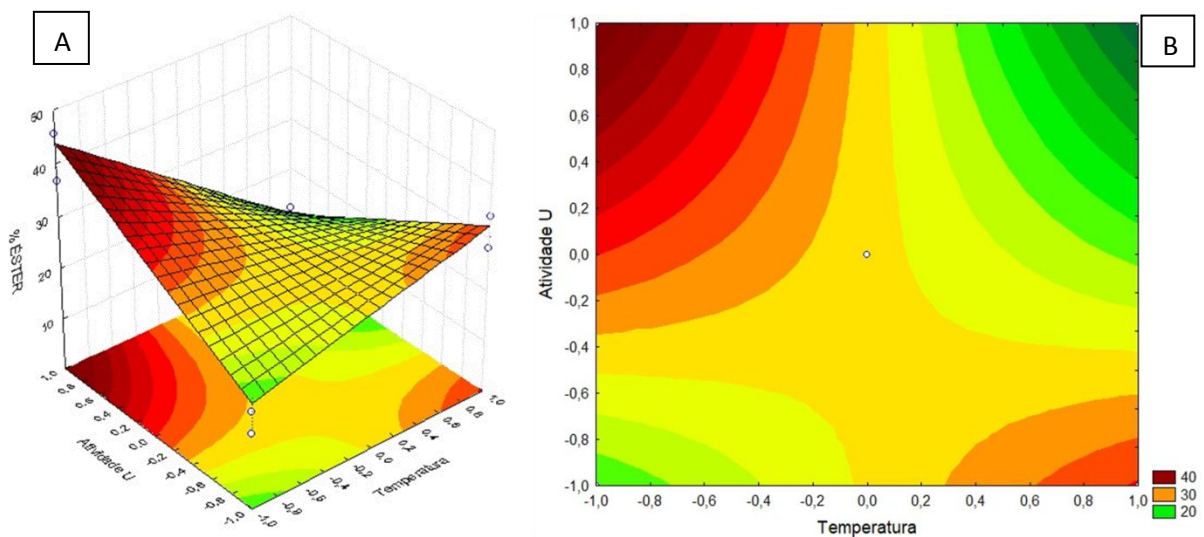


Figura 19. Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) que apresenta a interação entre as variáveis Atividade Enzimática e Temperatura para a síntese do éster oleato de etila.

Ao observar o gráfico de superfície de resposta (Figura 20), nota-se que com uma temperatura mais baixa e com uma atividade enzimática maior, obtêm-se as melhores

conversões em éster. Entretanto, isto não foi notado na prática, visto que os melhores resultados e conversão em éster apresentaram-se com 37°C, ao invés de 30°C e com atividade de 60 U e não de 90 U. Sendo assim, ao analisar o gráfico de Pareto (Figura 18), verifica-se que o fator curvatura é uma variável significativa, implicando na realização de pontos axiais nos experimentos, entretanto, os novos testes deveriam ser realizados a 24, 25, 48 e a 76 °C. Porém, nas temperaturas de 24 e 25 °C, sugere-se que a enzima apresentaria uma baixa atividade enzimática e nas temperaturas de 48 e 76 °C, a enzima estaria desnaturando, reduzindo o seu poder catalítico e com isso, baixos resultados de conversão em éster. Dessa maneira, realizou-se a cinética final a 37 °C, 60 U, e razão molar 1:6.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura. No trabalho de Krüger (2017), foram encontrados resultados similares, o qual estudou a lipase de *Penicillium sumatrense* imobilizada na torta de crambe para síntese do éster oleato de etila, obtendo os melhores rendimentos a 37 °C, 60 U e razão molar (ácido:álcool) 1:3, 1:6 e 1:9, com máxima conversão em éster em 30 min. de reação, independentemente da razão molar.

Gomes *et al.* (2017), ao aplicar enzimas comerciais (Novozym® 435, Lipozym® TL-IM e Lipozym® RM-IM), através do uso combinado de 75% de Lipozym® RM-IM e 25% de Novozym®435 alcançou o melhor resultado da produção de oleato de etila, conversão de 86,54% utilizando razão molar 1:1 (ácido/etanol) a 37 °C em 24 h.

No trabalho de Silva *et al.* (2016), foi utilizada a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por adsorção física em fibra de dendê para produção de ésteres etílicos na reação de transesterificação, obtendo a máxima conversão de ésteres etílicos (72%) nas seguintes condições: razão molar de 1:7 (óleo de coco/etanol) a 40 °C por 96 h.

De acordo com trabalho de Dantas *et al.* (2016), utilizando lípase obtida de *Burkholderia cepacia* na produção de ésteres etílicos do óleo de canola em um planejamento fatorial 2³, variando: temperatura (30 – 60° C), quantidade de enzima (5 – 10%) e razão molar álcool/óleo (6:1– 12:1), obtiveram os melhores resultados de conversão (31,18%) nas condições de 60° C, razão molar 6:1 (álcool/óleo) e 10% de enzima em relação meio reacional em 24 h.

No trabalho de Dias (2015), foi utilizada a lipase nativa de *Aspergillus Niger* imobilizada em nanotubos de carbono para síntese do éster oleato de etila, obtendo a máxima conversão de ésteres etílicos (66%) quantificada pelo método Lowry-Tinsley e (91%) quantificada por CG-FID na proporção de 15 mg de lipase, razão molar (1:1) ácido/etanol e temperatura de 30 °C em 6 horas de reação.

5.6. CINÉTICA ENZIMÁTICA DO OLEATO DE ETILA APÓS OTIMIZAÇÃO

Após obter os melhores resultados de conversão em éster, os resultados da cinética de síntese do éster oleato de etila obtidos estão apresentados na Figura 21.

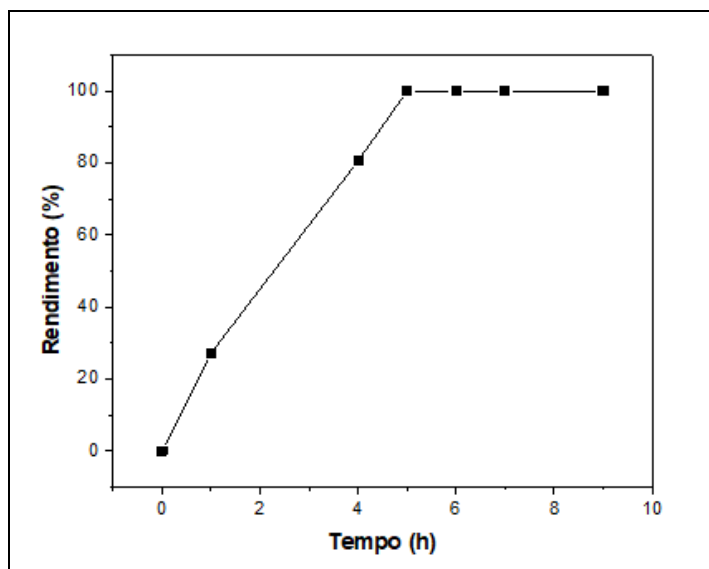


Figura 20. Variação da conversão do oleato de etila em função do tempo, utilizando o sólido fermentado contendo a lipase de *Penicillium sumatrense* produzida por FES.

Analisando-se a Figura 21, verifica-se novamente o comportamento obtido nos ensaios prévios da cinética reacional (Figura 15), em que, a partir de 5 horas atingiu-se o equilíbrio, com 100% de conversão.

Como observado no planejamento experimental, a conversão máxima em éster alcançada (100%) foi em 37°C. Além disso, a elevação da temperatura para 44°C e a diminuição da temperatura para 30 °C, causa um significativo decréscimo da conversão, como pode ser visualizado na Tabela 5, com 4 horas de experimento. A estabilidade da lipase utilizada neste estudo tem um papel fundamental nos resultados obtidos (OLIVEIRA, 2013).

Desta forma, verifica-se que a temperatura ideal para a atividade enzimática está intimamente relacionada com dois fatores (ESTEVES, 2018):

(1) O aumento do número de choques efetivos entre as moléculas, que irão causar um aumento da velocidade; (ESTEVES, 2018).

(2) Desnaturação da enzima pela temperatura, o que levaria a uma menor velocidade de reação, e por isso, diminuição da produtividade e da eficiência da conversão em éster (MACRAE, 1983; FUKUDA *et al.*, 2001; NOUREDDINI *et al.*, 2005; AL-ZUHAIR *et al.*, 2007; ESTEVES, 2018).

Também há pesquisas que indicam que a estabilidade térmica da lipase imobilizada é maior do que da enzima livre. Neste caso a casca de arroz e o farelo de semente de girassol serviram de suporte para a lipase, pois, o suporte evita que a haja mudança conformacional da enzima em altas temperaturas (KIM *et al.*, 2004).

Portando, observou-se que a temperatura ideal para a atividade enzimática está relacionada com dois fatores: um deles é o aumento de contato de superfície entre as moléculas ocorrendo assim o aumento da velocidade e o outro é a desnaturação da enzima pela temperatura, ocasionando uma queda na velocidade de reação, desta maneira melhorando a produtividade e a eficiência da conversão em éster (KRÜGER, 2017).

Botton (2014), utilizando a lipase *Rhizopus microsporus* produzida no bagaço de cana para síntese do éster oleato de etila obteve conversões em éster de 98% durante 4 h de reação nas condições de razão molar 1:10 (ácido:álcool), a 40 °C.

Fernandes (2007) trabalhou com a torta de milho e FSG como substrato para produção de lipases, com *Burkholderia cepacia*. No estudo foram utilizados 60 Ugss⁻¹ do material fermentado, em n-heptano, a 37 °C, com razão molar 1:5 (ácido:álcool). Nas análises, obteve-se como resultado um rendimento menor (76,4%) da síntese do éster oleato de etila utilizando FSG do que com a utilização da torta de milho (94%), porém em relação ao tempo para atingir o equilíbrio, com o FSG foi menor (8 h) do que quando comparado com a torta de milho (18 h).

Dessa maneira, independente dos substratos que foram utilizados na síntese da lipase, a temperatura influencia no rendimento, de certa forma, as temperaturas ideais para a conversão em éster em reações de esterificação encontradas nos trabalhos apresentados estão entre 37-40 °C.

5.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados expostos acima, buscando a imobilização da lipase pelo fungo *Penicillium sumatrense*, utilizando a casca de arroz como suporte e o farelo de semente de girassol (FSG) como fonte de nutrientes, com o intuito de produzir enzimas e de estudar da síntese do éster oleato de etila, observa-se que os resultados foram satisfatórios, produzindo lipases nas condições ótimas de 55% de umidade, 25% de FSG, em 96 h de fermentação com atividade catalítica ($29,3 \text{ Ugss}^{-1}$) suficiente para a reação da síntese.

Em busca da maximização da produção do oleato de etila, foi determinada a melhor condição física (substrato moído), Razão Molar 1:6 (ácido/álcool), temperatura 37° C e atividade enzimática (60 Ugss^{-1}), chegando nas melhores condições experimentais (100%) de conversão em éster em 5 horas de reação.

O estudo da aplicação de uma maior quantidade de FSG (75%) na produção de lipase constatou uma maior atividade catalítica ($39,3 \text{ Ugss}^{-1}$), contudo optou-se pela redução dos custos, pois os resultados obtidos com uma quantidade menor de FSG (25%) para a síntese do éster oleato de etila foram satisfatórios.

Tendo em vista estes resultados, torna-se possível indicar a casca de arroz e o FSG como suporte necessário para o desenvolvimento do microrganismo no meio fermentativo para a produção da lipase e assim realizar a síntese do éster oleato de etila.

6. CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados neste trabalho, pode-se concluir que:

1) Na etapa de produção de enzimas por FES utilizando-se resíduos agroindustriais:

- Foi possível produzir a lipase de *Penicillium sumatrense* por FES utilizando como substratos a casca de arroz (CA) e o (FSG). A lipase apresentou uma atividade enzimática de $29,3 \text{ Ugss}^{-1}$ com 25% de FSG, 55% de umidade, 27°C de temperatura ótima, em 96 horas de fermentação.

2) Nos ensaios de síntese do éster oleato de etila:

- A adição do sólido fermentado mostrou-se viável na síntese do éster oleato de etila.
- As melhores condições para a conversão do éster (100%), temperatura de 37°C , RM de 1:6 e quantidade de enzima no meio reacional de $60,0 \text{ Ugss}^{-1}$ em 5 horas de reação.

Diante do exposto resultado obtido neste trabalho será capaz de serem realizados estudos para verificar a possibilidade de reutilização do material fermentado na síntese do éster oleato de etila.

7. REFERÊNCIAS

- AL-ZUHAIR, S.; JAYARAMAN, K.V.; KRISHNAN, S.; CHAN, W.H. **The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 212-217, 2007.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. **Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v.7, n.1, p. 257-270. February. 2016.
- ANP, **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=73292&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1434584998677>>.
- BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. **Biorreactors with immobilized lipases,** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416, 1996.
- BARRIOS- GONZÁLES, J. **Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications.** *Process Biochemistry*. v.47, n.2, p. 175-185. February. 2012.
- BIROLI, W.; FERREIRA, I.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D.; MATOS, I. **Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview.** *Biotechnology Advances*. v.33, n.5, p.481-510. October. 2015.
- BORNSCHEUER, U. **Optimizing lipases and related enzymes for efficient application.** *Trends in Biotechnology*. V.20, n.10. p.433-473. October. 2002.
- BOTTON V. **Síntese de ésteres etílicos catalisada pela adição direta de sólido fermentado de cbpqa 312-07 drm em sistema livre de solventes.** Tese de Doutorado, Programa de pós-graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná – UFPR, 2014.
- CASTELLANI, A. - **Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches.** *J. trop Med. Hyg.*, 70: 181-184,1967.
- CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; JR, G.L.S. **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, p. 239-247, 2000.
- CASTRO, H.F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CAVALCANTE, P. A. W.; COELHO, D. F.; SILVA; C. F.; ABUD, A. K. S.; SOUZA, R. R. **Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulasas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido.** *Scientia Plena*, v. 14, n. 6, 2018.

CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. **Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects**. *Biotechnol Adv.*, v. 33 n. 7, p. 1443–54, 2015, 2015.

CONAB – Companhia Nacional Abastecimento. **Histórico mensal de Arroz Fevereiro/Março De 2019**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-arroz>>

CONTESINI, F.J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P. O. ***Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, 163–171, 2010.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI- ALAOU, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. **Lipase production by solid state fermentation of olive oil cake and sugar cane bagasse**. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.*, v. 5, p. 75-78, 1998.

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. **Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2)**. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 42, p. 381-388, 2008

DANTAS, J. H.; HARTH, M. L.; SOSTER, E. F.; MARCHINI, P. T.; CARMINATTI, R. A. Q.; MORAES, F.F.; ZANIN G.M. **Produção de ésteres etílicos utilizando lipase obtida de *Burkholderia cepacia*: uma análise utilizando planejamento experimental e superfícies de respostas**. *Revista UNINGÁ*. v. 28, n.1, p. 07-12, 2016.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. **Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol**. *Applied Catalysis A: General*, v. 281, n. 1, p. 225-231, 2005.

DELLA, V., P. KÜHN, I. HOTZA, D. **Reciclagem de resíduos agroindustriais: cinza de casca de arroz como fonte alternativa de sílica**. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Santa Catarina, 2005

DIAS, Michele R.G. **Síntese do oleato de etila catalisada pela lipase nativa de *Aspergillus Niger* imobilizada em nanotubos de carbono**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química). 2015,83 f. - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Curitiba, 2015

DIAZ, J.C.M. **Novos instrumentos para a biocatálise: Rastreamento, Purificação e Caracterização de lipases fúngicas termofílicas**. Universidade de la Mediterranee Aix-Marseille II. 190 páginas, 2005. Tese (doutorado)

DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N.P. **Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum***. *App. Biochem. Biotechnol.*, v. 113, p. 173-180, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Arroz**. 15/07/18. Disponível em: www.embrapa.br/agrossilvipastoril/sitiotecnologico/trilhatecnologica/tecnologias/culturas/arrozo>

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa pesquisa produção de biodiesel com catalisadores enzimáticos**, 12/03/13. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1473585/embrapa-pesquisa-producao-de-biodiesel-com-catalisadores-enzimaticos>>

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. ISSN 1679-6535, Fortaleza-CE. 2005.

ESTEVES, A. B. **Uso de enzimas como biocatalisador para reação de síntese do éster do biodiesel**. Trabalho de conclusão de curso (TCC). Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo – PR, 2018.

FARIAS, C. M. M. **Produção e caracterização de lipases por aspergillus da micoteca urm utilizando resíduo de licuri (*syagrus coronata*) (*martius*) *beccari* como substrato** Dissertação de Mestrado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE, 2013.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**. 6a. ed. Springer, 2011.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Springer: Berm. 2004.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Tese de Doutorado, Programa de pós-graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná, UFPR, 2007.

FOLETTI, E.L.; HOFFMANN, R.; JAHN, S.L.R. **Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz**. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1055-1060, 2005.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. **Biodiesel fuel production by transesterification of oils: review**. *Journal of the Bioscience and Bioengineering*, v. 92, p.405-416, 2001.

GANDHI, N. **Applications of lipase**. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v.74, n. 6. p. 621-634, 1997.

GAZZOLA, A.; FERREIRA, J. R.; C. T.G.; CUNHA, D. A.; BORTOLINI, E.; PAIAO, G. D.; PRIMIANO, I. V.; PESTANA, J.; D'ANDRÉA, M. S. C.; OLIVEIRA, M. S. **A cultura do girassol**. Piracicaba: FEALQ, 2012. 69 p

GOMES, P.H.L.; SANTOS, J.C.S.; FONSECA, A.M.; FEITOSA, M.R.C.; SOUZA, M.C.M. **Produção de oleato de etila: estudo da eficiência catalítica de enzimas combinadas**. Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, 2017.

GONÇALVES, V. N. **Técnica Câmara de Neubauer** – Pesquisa Laboratorial do Mestrado – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, 2011.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, v.39, p.235-251, 2006.

HOTTA, Y.; EZAKI, S.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. **Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic Archaeon**. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 68, p. 3925-3931, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - Estatística da Produção Agrícola do mês de janeiro 2019**. Disponível:<biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2019_jan.pdf>

JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.V.; MISSET, O. **Bacterial lipases**. FEMS Microbiology Reviews, v. 15, p. 29-63, 1994.

KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N., MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. **Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7**. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic., v. 22, p. 307–313, 2003.

KAMINI E PUVANAKRISHNAN, **Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake**. Process Biochem., v. 33 (5), p. 505-511, 1998.

KIM, H.J.; KANG, B. S.; KIM, M.J.; PARK, Y.M.; KIM, D.K.; LEE, J.S.; LEE, K.Y. **Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogeneous base Catalyst**, Catalysis Today, n. 93-95, p. 315-320, 2004.

KODA, R.; TOMADA, T. **Ethanolysis of rapeseed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by *Fusarium heterosporum* lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalysts**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. V.66, n.1, p. 101-104. September. 2010.

KRÜGER, C. **Síntese enzimática de éster do biodiesel a partir de lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* produzidas por fermentação no estado sólido**. Dissertação (mestrado em Bioenergia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo – PR, 2018.

- LAGE, F.A.P.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.C.; TODERO, L.M.; LUIZ, J.H.H.; MENDES, A.A. **Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system.** *Enzyme Microbiology and Technology* v. 84, p. 56–67, 2016.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. **Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations.** *Bioresource Technology*, v. 87, n. 2, p.167-198, 2003.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2001.
- LINO, C. I. S. **Desenvolvimento de catalisadores heterogêneos nanoestruturados para produção de biodiesel.** Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica. ISEL - Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. 2019.
- LIU, G., LU, S., JIANG, Y., WU, Y., **Production and characteristics of thermostable lipolytic enzymes from *Monascus fuliginosus*.** *Weishengwu Xuebao.*, v. 35 (2), p.109-114, 1995.
- LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. **Rapid colorimetric determination of free acids.** *Journal of American Oil Chemist's Society*, v. 53, p. 470-472, 1976.
- MACRAE, A.R. **Lipase – catalyzed interesterificação of oils and fats.** *Journal of American Oil Chemist's Society*, v. 60, p. 243-246, 1983.
- MADALOZZO; A.D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae*.** Universidade Federal do Paraná – UFPR. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Bioquímica, 2011.
- MALAJOVICH, M. A. **Biotechnology.** *Axcel Books do Brasil* Ed. p. 344, 2004.
- MARTINS, P.A.; SCIUTO, D.L.; FÁVARO, L.C.L.; PACHECO, T.F.; SALUM, T.F.C. **Otimização da produção de lipases de *Aspergillus sp.* BDA-FI 7 por Fermentação em Estado Sólido para a síntese de biodiesel.** III Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia. Brasília/DF Anais, 2016.
- MATOS, L. J. B. L. **Imobilização da lipase tipo b de *candida antarctica* em sílica macroporosa e polimetilmetacrilato visando a síntese do oleato de etila.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará – UFC, 2014.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. **Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Ed. Springer, p. 13-32, Heidelberg, 2006.

MORAES, D. C.; PAULA, D. **Processamento do óleo de girassol como estratégia para a produção de cosméticos orgânicos**. Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO / Departamento de Farmácia/Guarapuava, PR - Eclética Química, 38, 187-201, 2013.

MURUCI, L. N. M.; CONCEIÇÃO, M. A. O.; SANTOS, R. R.; PENHA, E. M.; SILVA, J. P. L.; COURI, S.; DAMASO, M. C. T. **Produção de lipase de *Aspergillus niger* utilizando co-produtos da indústria de refino de óleos**. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. **Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil**. Bioresource Technology, v. 96, p.769–777, 2005.

NYARI, N.L.D.; PAULAZZI, A.R.; ZAMADEI, R.V.; FICANHA, A.M.M.; ANTUNES, A.; LEVANDOSKI, K.; ZENI, J.; DALLAGO, R.M. **Otimização do processo de produção de oleato de etila via catalise enzimática imobilizada in situ em poliuretano em sistema livre de solvente**. XI congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, UNICAMP, 2015.

OLIVEIRA, A.C. **Síntese enzimática do biodiesel de microalgas a partir de lipases produzidas por fungos endofíticos**. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais) Departamento de Microbiologia e Bioquímica, Universidade Federal do Paraná – UFPR. 2013.

OLIVEIRA, A.C.D., WATANABE, F.M.F., RODRIGUES, M.L.F. **Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para a produção de alfa-amilases por *Penicillium sp.* e caracterização da enzima**. Biociências, Biotecnologia e Saúde, v. 1, p. 43– 54, 2011.

OLIVEIRA, J. M.; GIANNETTI, A. A. M; LUCARINI, A. C. **Estudo do uso da lignina-peroxidase para remoção de 2-clorofenol em efluente líquido**. The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC, v. 3 n. 02, p. 144–157, 2017.

OLIVEIRA, P. F. S.; BRITO, G. **Reciclagem de óleo e gordura residual para a produção de biodiesel.** Disponível em:

<<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAYtEAH/reciclagem-oleo-gordura-residual-a-producao-biodiesel#>>

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, JA. **Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações.** SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PALMA, M.B.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITZ, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. **Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate.** Appl. Biochem. Biotechnol., v. 84-86, p. 1137-1145, 2000.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal. 81-84. (2003).

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes.** Curr. Sci., v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A; BENJAMIN, S; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. **The realm of microbial lipases in biotechnology.** Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 29, n. 2, p. 119-131, 1999.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 13, p.81-84, 2013.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. **New developments in solid state fermentation: I.** Bioprocesses and products. *Proc. Biochem.* **35**: 1153–1169. 1999

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

PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional.** - Tese de mestrado, UNIOESTE, Toledo - PR 2008.

PELEGRINI, B. **Girassol: uma planta solar que das Américas conquistou o Mundo.** São Paulo: Ícone, 1985. 117p.

POUEY, M.T.F. **Beneficiamento da cinza de casca de arroz residual com vistas à produção de cimento composto e/ou pozolânico.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, 2006.

RAIMBAULT, M. **General and microbial aspects of solid state fermentation. In: International training Course on Solid State Fermentation, FMS 97, p. 6-10 OCTOBRE, Curitiba, Brasil, Documento ORSTOM, Montpellier, França, 1997.**

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A.K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. **Coconut oil cake- a potencial raw material for the production of α -amylase**. *Bioresource Technol.*, v. 93, p 169-174, 2004.

RAMOS, L.P.; KOTHE, V.; OLIVEIRA, M.A.F.C.; WYPYCH, A.S.M.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F.; CORDEIRO, C.S. **Biodiesel: Matérias-primas, tecnologias de produção e propriedades combustíveis**. *Rev. Virtual Quim.* 317-369. 2017.

REINEHR, C.O.; BORTOLUZZI, L.; MORAIS, V.Q.; SMANIOTTO, T.M.; ZEN, C.K.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L.M. **Produção de lipases com atividade de hidrólise por *Aspergillus* utilizando subprodutos agroindustriais, óleo de soja e glicerol**. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 18, n 1, 2016.

RIBEIRO, A.V.A.; SANTOS, A.A.M.M.; GODOY, M.A.; TEMÓTEO, R. L.; VARGAS, A. M. P. **Avaliação de produção de enzima celulolíticas a partir da cultura de *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar**. *Anais: VI SIMPAC*, v. 6, n. 1, Viçosa–MG, p. 167-172, 2014.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. Curitiba: Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação (Mestrado).

ROSSET, I.G. **Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação**. 152 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade de São Paulo – USP, São Carlos, 2011.

ROSSI, C.; POZZA, A.; MENEGHEL, L.; SILVEIRA, M. M. **Efeito da fonte de carbono sobre a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em meio líquido**. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC. Universidade de Caxias do Sul – UCS, 2016.

ROSSI, C.; SILVEIRA, M.M.; **Avaliação de fontes de carbono em meio de cultivo de produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* ipt-301**. XXVII SIC. Universidade de Caxias do Sul – UCS, 2015.

SALIHU, A.; ALAM, M.; **Solvent tolerant lipases: A review**. *Process Biochemistry* . v. 50, n.1, p.86-93. january. 2015;

SALUM, TFC; VILLENEUVE, P; BAREA, B; YAMAMOTO, CI; CÔCCO, LC; MITCHELL, DA; KRIEGER, N. **Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11**. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1348–1354, 2010.

- SANTOS, A.P.B.; PINTO, A.C. **Biodiesel: uma alternativa de combustível limpo**. Química Nova, v. 31 N° 1, 58-62, 2009.
- SANTOS, F.; REZENDE, C.A.; MARTINEZ, J. **Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide**. The Journal of Supercritical Fluids, p.107, 2016.
- SANTOS, L.K. **Avaliação da aplicação do processo de hidroesterificação na produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade**, Unesp – Universidade Estadual Paulista. Campus de Araraquara. Programa de Pós-Graduação Em Química – PGQ, 2016.
- SANTOS, L. K.; CALERA, G.C.; STRINGACI, J.C.T.; VILAÇA, S.M.; VIVIANI, V.E.; FLUMIGNAN, D.L. **Estado da arte da aplicação do processo de hidroesterificação na produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade**. Divulgação científica e tecnológica do IFPB N° 28 - edição especial. Revista Principia. 2015.
- SANTOS, R.C.A.; ARAÚJO, K.B.; SOARES, CM.F.; AQUINO, L.C.L. **Evaluation of temperature and moisture response surface on the lipase from pumpkin seeds fermentation using *Aspergillus niger***. Acta Scientiarum. Technology, v. 34, n. 3, p. 255-260, 2012.
- SANTOS, S.L. **Produção e purificação de frutossiltransferase por *Aspergillus flavus* utilizando borra de café (*coffea sp.*) através da Fermentação em Estado Sólido**. Universidade Federal Rural De Pernambuco, Recife - UFRPE, 2018.
- SCHRAG, J.; CYGLER, M. **Lipases and $\alpha\beta$ hydrolase fold**. Methods in Enzymology. V.284, p.85-107. 1997.
- SILVA, I.P.; LIMA, R.M.A.; RUZENE D.S.; SILVA D.P. **Resíduos agroindustriais como biomassa alternativa para geração de energia distribuída em comunidades rurais**. Repositório Institucional da Universidade Federal de Sergipe (RIUFS), p. 189-211, 2019.
- SILVA, J.F.R.; SILVA, L.S.A.; SILVA, D.D.; CONCEIÇÃO, M.M.; SOUZA, A.G. **Otimização da síntese do biodiesel de girassol utilizando misturas de metanol e etanol**. I Congresso nacional de engenharia de petróleo, gás natural e biocombustíveis. Campina Grande- PB, 2015.
- SILVA, K.C.; MARQUES A.N.; BARBOSA, A.S.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. **Adsorção física de lipase de *Burkholderia cepacia* em fibras naturais de dendê para produção de ésteres etílicos**. 18ª Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes. “A prática interdisciplinar alimentando a Ciência”. ISSN: 1807-2518. 24 a 28 de outubro de 2016.

SILVA, L. A. **Produção e caracterização de protease alcalina a partir de substratos do coco babaçu (*Orbignya speciosa*)**. Universidade Federal Do Maranhão – UFMA. Trabalho de Conclusão de Curso, 2017.

SILVA, L. T. **Utilização de enzima no pré tratamento de substrato têxtil de poliamida 6.0** - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Engenharia Têxtil. 2019.

SILVA, L.; RODRIGUES, M.L.F. **Estudo de diferentes substratos na FES para produção de enzimas hidrolíticas**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, 2017.

SIMONS, J.W.F.A.; GÖTZ, F.; EGMOND, M.R.; VERHEIJ, H.M. **Biochemical properties of staphylococcal (phospho)lipases**. Chem. Phys of Lipids., v. 93, p. 27-37, 1998.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. **Recent advances in solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOCCOL, C.R; COSTA, E.S.; LETTI, L.A.; KARP, S. **Recent developments and innovations in solid state fermentation**. Biotechnology research & inivation. v.1, n.1, p. 20, 2017.

SNA – Sociedade Nacional de Agricultura. **Arroz: produção mundial em 2018 deverá ser superior a 700 milhões de toneladas**. Disponível em:< sna.agr.br/arroz-producao-mundial-em-2018-sera-superior-a-700-milhoes-de-toneladas/ >

SOUZA, F.M.; TRAVÁLIA, B.M.; LIMA, A.S., SOARES, C.M.F.; SANTANA, L.C.L. A. **Produção de lipase de *Aspergillus niger* e imobilização em membranas de poliétersulfona**. V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, 2015.

SOUZA, M.C. **Imobilização de lipase de *Candida antartica* do tipo B em nanoparticulas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. Universidade Federal do Ceará – UFC. P.88, 2013.

STRINGARI, D. **Sistemática e diversidade genética de isolados de *guignardia spp.* e *phyllosticta sp.* nos estados do paraná e São Paulo**, Universidade Federal do Paraná. 2009.

STUER, W.; JAEGER, E.; WINCLER, A. **Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa***. Journal bacteriology. V.168, n.3, p.1070-1074. December. 1986.

TEIXEIRA, R. D. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido utilizando cepas fúngicas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2015

TEODORO, A. F. S., **Aproveitamento de resíduos para produção de lipases fúngicas via fermentação em estado sólido**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2018

UNGARO, M.R.G. **O girassol no Brasil**. O Agrônomo, Campinas, v.34, p.43-62, 1982.

VARGAS, G.D.L.P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, 2004.

WALTER, J. P.; ROSSATO, M. V.; **Destino do resíduo casca de arroz na microrregião de Restinga Seca - RS: um enfoque à responsabilidade sócio ambiental.** VI CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO. Niterói, RJ, Brasil, 2010.

WAKABAYASHI, H. **Enzyme-catalyzed transformations of sulfur-containing flavor precursors.** Tese de Doutorado em Ciências, Departamento Geral de Tecnologia de Alimentos, Universidade Técnica de Munique, Munique, 2004.

ZAGO, E.C. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido.** Universidade Federal do Paraná – UFPR, 2010.

ZORN, K.; GUINEA, I.; BRUDIEK, H.; BORNCHUEUR, U. **Engineering and application of enzymes for lipid modification, an update.** Progress in Lipid Research. V. 63, n.1, p.153-164, 2016.