

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
BIOENERGIA – NÍVEL DE MESTRADO

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

CÍNTIA KRÜGER

TOLEDO
SETEMBRO /2017

CÍNTIA KRÜGER

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTER DO BIODIESEL 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.

Orientador: Professora Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

Co-orientadoras: Professora Dra. Flávia Giovana Manarin

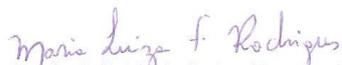
Professora Dra. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca

TOLEDO
SETEMBRO /2017

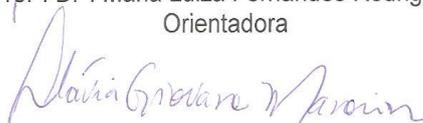
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por CÍNTIA KRUGER
perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 06 de
setembro de 2017

COMISSÃO JULGADORA



Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Fernandes Rodrigues
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Flávia Geovana Manarin
Coorientadora



Prof^a Dr^a Rosemeire Aparecida da Silva De Luca
Coorientadora



Prof^a. Dr^a. Karina Graziella Fiametti Colombo

Membro



Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Membro

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

K94s	<p>Krüger, Cíntia Síntese enzimática de éster do biodiesel a partir de lipases fúngicas de <i>Penicillium sumatrense</i> produzidas por fermentação no estado sólido / Cíntia Krüger. -- Toledo, PR : [s. n.], 2017. 84 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Maria L. Fernandes Rodrigues Coorientadora: Profa. Dra. Flávia Giovana Manarin Coorientadora: Profa. Dra. Rosemeire A. da S. de Lucca Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.</p> <p>1. Bioenergia – Dissertações 2. Lipases 3. Cinética de enzimas 4. <i>Penicillium</i> 5. Fermentação 6. Ésteres 7. Resíduos industriais I. Rodrigues, Maria Luiza Fernandes, orient. II. Manarin, Flávia Giovana III. Lucca, Rosemeire Aparecida da Silva de IV. T.</p> <p>CDD 20. ed. 577 662.8</p>
------	--

SUMÁRIO

2.1. LIPASES- ASPECTOS GERAIS	15
2.1.1. Definição	15
2.1.2. Aspectos Estruturais e Mecanismo Catalítico das Lipases	17
2.1.3. Fontes de Lipases.....	19
2.1.4. Características Cinéticas e Físico-químicas das Lipases Fúngicas	23
2.1.5. Aplicação das lipases	25
2.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	27
2.2.1. Substratos utilizados na FES para a produção de lipases	29
2.3. BIOCATÁLISE EM AMBIENTES AQUO-RESTRITOS	33
2.3.1. Importância Industrial dos Ésteres	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5.1. REAGENTES	41
5.2. MICRORGANISMO	41
5.3. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS	41
5.4. ESTOQUE E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS.....	41
5.5. SELEÇÃO DA LINHAGEM COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA	42
5.6. MANUTENÇÃO DA CEPA.....	42
5.7. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS.....	42
5.7.1. Determinação do teor de Umidade	42
5.7.2. Determinação do teor de Cinzas	43
5.7.3. Determinação do teor de Óleo.....	43
5.8. PRODUÇÃO DA LIPASE.....	43
5.8.1. Preparação dos Substratos	44
5.8.2. Condições de Cultivo no Meio Sólido	44
5.8.3. Secagem do Sólido Fermentado	44
5.8.4. Efeito da Granulometria do Substrato	45
5.8.5. Efeito da Umidade	45
5.8.6. Otimização da FES através do Delineamento Fatorial	45
5.8.6.1. Otimização da produção de lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> utilizando planejamento experimental 2 ²	45
5.9. BIOCATÁLISE	46
5.9.1. Adição Direta do Material Fermentado.....	46
5.9.1.1. Ensaios Prévios utilizando a enzima produzida com a torta de crambe.....	46
5.9.1.2. Reutilização do Material Fermentado	47
5.10. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	47
5.10.1. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico	47
5.10.2. Método de Lowry-Tinsley	48
5.10.3. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	48
6.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO.....	50

6.2. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE <i>PENICILLIUM SUMATRENSE</i>	51
6.2.1. Ensaios preliminares	51
6.2.1.1. <i>Produção de Lipases</i>	51
6.3. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES DE <i>PENICILLIUM SUMATRENSE</i> POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	52
6.3.1. Cinética de Produção da Enzima	52
6.3.2. Otimização de Produção de lipases por delineamento fatorial	53
6.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARELURA (MEV)	59
6.5. BIOCATALISE: ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA	60
6.5.1. Adição Direta do Material Fermentado	60
6.5.1.2. <i>Ensaios Prévios utilizando a Enzima Produzida com a Torta de Crambe</i>	61
6.5.1.3. <i>Estudo da influência da temperatura na Síntese do Oleato de Etila</i>	62
6.5.1.4. <i>Estudo da influência da Razão Molar na Síntese do Oleato de Etila</i>	65
6.5.1.5. <i>Reutilização do Material Fermentado</i>	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações de hidrólise de um triacilglicerol catalisadas por lipase. (Fonte: FUREBY <i>et al.</i> , 1997).....	15
Figura 2. Reações de síntese catalisadas por lipases (Fonte: PAQUES & MACEDO, 2006). 16	
Figura 3. Representação de uma reação de esterificação por via enzimática em um sistema heterogêneo. (Fonte: STRAATHOF & ADLERCEUTZ, 2000).....	17
Figura 4. Estrutura da lipase de <i>Rhizopus oryzaea</i> na presença do substrato tricaprilina. (Fonte: DIAZ, 2005).	17
Figura 5. Modelo estrutural de α/β hidrolases. (Fonte: POUDEROYEN <i>et al.</i> ,2001).....	18
Figura 6. Mecanismo catalítico proposto para lipases. (Fonte: JAEGER <i>et al.</i> , 1994).	19
Figura 7. Imagem da microscopia ótica do Fungo <i>Penicillium sumatrense</i> , num microscópio Olymous CX31. (Fonte: O autor, 2017).....	21
Figura 8 . Reação de síntese do oleato de etila catalisada pela lipase. Erro! Indicador não definido.	
Figura 9. Complexo formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres. Erro! Indicador não definido.	
Figura 10. Imagem da câmara de UV. Produção de fluorescência do fungo <i>Penicillium sumatrense</i> . (Fonte: Oliveira e Rodrigues, 2017).....	51
Figura 11. Cinética de produção de lipase fúngica de <i>Penicillium sumatrense</i> por fermentação no estado sólido. Os ensaios foram realizados com umidade de 60 %. Experimentos realizados em triplicata com temperatura de 27°C.....	52
Figura 12. Gráfico de pareto na interação dos efeitos das variáveis na atividade enzimática, com um intervalo de 95% de confiança	55
Figura 13. Gráfico de paridade para mostrar a distribuição dos observados e os valores previstos para produção de lipase.	57
Figura 15. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) do substrato após a fermentação (A) e antes da fermentação (B).....	60
Figura 16. Variação na conversão do oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, contendo a lipase de <i>Penicillium sumatrense</i> produzida por FES. Os ensaios foram realizados a 37 °C em 50,0 mL de n-heptano, com razão molar 1:3 (ácido:álcool) e quantidade de sólido suficiente para obter uma atividade lipolítica de 60,0 U.	62
Figura 17. Variação na conversão do oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, contendo a lipase de <i>Penicillium sumatrense</i> produzida por FES. Os ensaios foram realizados a 30°C (-■-), 37 °C (-●-) e 43°C(-▲-), em 50,0 mL de n-heptano, com razão molar 1:3 (ácido:álcool) e quantidade de sólido suficiente para obter uma atividade lipolítica de 60,0 U.....	64
Figura 18. Variação na conversão do oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, contendo a lipase de <i>Penicillium sumatrense</i> produzida por FES. Os ensaios foram realizados a 37 °C; RM (ácido:álcool) 1:3 (-■-), RM 1:6 (-●-) e RM 1:9 (-▲-) , em 50,0 mL de n-heptano, e quantidade de sólido suficiente para obter uma atividade lipolítica de 60,0 U.....	66
Figura 19. Variação na conversão do oleato de etila em função do número de utilizações do biocatalisador da mesma amostra do sólido fermentado contendo a lipase de <i>Penicillium sumatrense</i> . Condições: 50,0 mL de n-heptano, 60,0 Unidades Totais, U e RM (ácido:álcool) 1:3, 37 ⁰ C.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alguns fungos com importância biotecnológica.....	22
Tabela 2- Importância dos fungos na indústria de alimentos.....	23
Tabela 3- Aplicações industriais das lipases.....	27
Tabela 4- Principais microrganismos envolvidos na produção de lipases por Fermentação no Estado Sólido (FES).....	32
Tabela 5- Resultados experimentais do delineamento fatorial 2^2 aplicado no estudo da fermentação da torta de crambe, utilizando-se o sólido fermentado produzindo a lipase de <i>Penicillium sumatense</i>	46
Tabela 6. Resultados experimentais do delineamento fatorial 2^2 aplicado no estudo da fermentação da torta de crambe, utilizando-se o sólido fermentado produzindo a lipase de <i>Penicillium sumatense</i>	54
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de atividade enzimática obtida pelo fungo <i>Penicillium sumatense</i>	56
Tabela 8- Resultados experimentais dos estudos prévios da síntese do éster oleato de etila utilizando a torta de crambe fermentada com <i>Penicillium sumatense</i>	61
Tabela 9- Resultados experimentais dos estudos de otimização da temperatura na síntese do éster oleato de etila utilizando a torta de crambe fermentada com <i>Penicillium sumatense</i>	63
Tabela 10- Resultados experimentais dos estudos de otimização da Razão Molar na síntese do éster oleato de etila utilizando a torta de crambe fermentada com <i>Penicillium sumatense</i>	66

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

μmol - Micromol

BDA - Ágar Batata Dextose

CO_2 - Dióxido de Carbono

EDS - Espectroscopia de Energia Dispersiva

FES - Fermentação no Estado Sólido

FS - Fermentação Submersa

g L^{-1} - Grama por Litro

GRAS - generally recognized as safe

h - Horas

His - Histidina

K_2HPO_4 - Hidrogenofosfato de potássio

KDa - Quilodalton

m/m - massa por massa

MEV - Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura

mg L^{-1} - Miligrama por Litro

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Sulfato de magnésio Heptahidratado

mm - Milímetro

mM - Milimolar

NaOH- Hidróxido de Sódio

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

nm - Nanômetros

RM – Razão molar

s - segundo

Ser - Serina

TAGs - triacilgliceróis

TC - Torta de Crambe

TLL - *Thermomyces lanuginosa*

U - Unidades totais

U gSS^{-1} - Unidade por grama de sólido seco

UV - Ultravioleta

v/v - Volume por Volume

AGRADECIMENTOS

Durante esses quase três anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a Profª. Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues, por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Mesmo chegando sem me conhecer direito, você abriu as portas, como uma mãe que abre os braços para receber um filho. Nesse mundo, repleto de pessoas ruins, você me faz acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos, orientações, palavras de incentivo, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientada.

À minha família amada. Em especial aos meus pais Dilma e Pedro, peças chave na minha formação, sempre dispondo de muito amor, confiança e apoio mútuo. Ao meu irmão Gabriel pelas conversas, palavras de amor, e conselhos únicos, sem você não conseguiria. A minha cunhada Bruna e sobrinho Arthur por estarem comigo me apoiando em qualquer circunstância.

Aos Prof. Dr. Edson Antônio da Silva, Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba, Profª. Drª. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca, Profª. Drª. Flávia Giovana Manarin e Prof. Dr. Fernando Palú muito obrigada pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições.

Aos companheiros de laboratório, Aline, Pedro, Leonardo, Rafaela, Bruna, Monique e Karina que contribuíram para construção do trabalho, ajudando no que fosse preciso.

À CAPES pelo auxílio e apoio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção da lipase de *Penicillium sumatrense* por Fermentação no Estado Sólido (FES), utilizando como substratos resíduos agroindustriais à produção de uma enzima com características especiais para utilização em biocatálise. Foi estudado como substrato, o resíduo agroindustrial, torta de crambe (*Crambe abyssinica hochst*), fornecida pela Fundação MS, Mato Grosso do Sul. A atividade enzimática foi determinada pelo método titulométrico utilizando-se o óleo de oliva como substrato. Para otimizar a produção de lipases foi realizado um planejamento experimental 2^2 , visando avaliar os efeitos das variáveis envolvidas no processo (granulometria do substrato e umidade). A variável resposta escolhida foi a atividade enzimática em U (Unidades totais), de cada meio fermentado. As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 7.0. Os resultados do planejamento experimental indicaram que a atividade enzimática foi máxima (243,0 U) quando utilizamos uma umidade do substrato de 60 % (m/m, base úmida) granulometria do substrato de 28 mesh, 29°C, após 96 h de fermentação. O sólido fermentado seco produzido a partir do resíduo industrial torta de crambe (24,3 U gss⁻¹) foi empregado nos estudos da síntese do oleato de etila em n-heptano estudando-se as variáveis temperatura e razão molar (RM, ácido:álcool). O rendimento em éster foi avaliado pelo método de Lowry-Tinsley. As melhores condições para a produção do éster foram 37°C, RM de 1:3 e a quantidade de enzima no meio reacional de 60,0 U, obtendo-se um rendimento ou conversão em éster de 100,0% após 30 min de reação. Verificou-se também que o tempo necessário para atingir o equilíbrio químico foi de 40 min. A torta de crambe foi reutilizada 10 vezes para a reação de síntese do oleato de etila. Na sexta reutilização a enzima atingiu a metade do rendimento obtido inicialmente (tempo de meia vida). Os resultados obtidos neste trabalho são inéditos, uma vez que não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando-se a lipase de *Penicillium sumatrense* produzida por FES com aplicações em biocatálise e mostram a viabilidade de utilização de sólidos fermentados diretamente em reações de síntese de ésteres em solventes orgânicos.

Palavras-chave: enzimas; FES; oleato de etila.

ABSTRACT

The objective of this study was to produce the lipase of *Penicillium sumatrense* by solid-state fermentation (SSF), in this manner taking advantage of agroindustrial residues for the production of an enzyme that is useful in biocatalysis. It was studied as a substrate, the agroindustrial residue, crambe cake (*Crambe abyssinica hochst*), provided by MS Foundation, Mato Grosso do Sul. The enzymatic activity was determined by the titrimetric method, using olive oil as substrate. In order to optimize the lipase production, was performed an experimental design 2^2 , aiming to evaluate the effects of the variables involved in the process (substrate granulometry and moisture). The response variable chosen was the enzymatic activity in U (Total Units), of each fermented environment. Statistical analyzes were performed by the software Statistica 7.0. The results of the experimental design indicated that the enzymatic activity was maximum (243,0 U) when using a substrate moisture of 60 % (m/m, wet basis), substrate granulometry of 28 mesh, 29°C, after 96 h of fermentation. The dry fermented solid produced from the industrial waste crambe cake (24,3 U gss⁻¹) was used in the synthesis studies of ethyl oleate in n-heptane studying the variables temperature and molar ratio (MR, acid:alcohol). The ester yield was evaluated by the method of Lowry-Tinsley. The best conditions for ester production were 37°C, MR of 1:3 and the amount of enzyme in the reaction of 60,0 U, obtaining a yield or conversion in ester of 100,0% after 30 min of reaction. It was also found that the time required to reach equilibrium was 40 min. The crambe cake was reused 10 times for the synthesis reaction of ethyl oleate. In the sixth reuse the enzyme reached half of the yield initially obtained (half life time). The results obtained in this work are inédited, since no papers were found in the literature using lipase of *Penicillium sumatrense* produced by solid-state fermentation with applications in biocatalysis and show the feasibility of using fermented solids directly in reactions of ester synthesis in organic solvents.

Key-words: enzymes; SSF; ethyl oleate.

1. INTRODUÇÃO

A fermentação em estado sólido (FES) aparece como uma tecnologia promissora para produção de enzimas, pois além de usar substratos de baixo custo como resíduos agroindustriais, o biocatalisador pode ser produzido em sua forma mais concentrada, o que pode facilitar a sua recuperação do meio de fermentação, quando for o caso.

Em diversas regiões do país a agricultura atinge níveis de produção cada vez mais elevados. Os resultados dessa produção necessitam de processamento industrial para atingir seu consumidor final, seja ele para alimentação humana, animal ou para a produção de biocombustíveis. A maioria das técnicas industriais utilizadas atualmente gera grande quantidade de resíduos, que são descartados ou utilizados como biomassa para a produção de energia. Desta forma, têm sido realizados estudos buscando alternativas diferenciadas para a destinação desses resíduos gerados.

Ferramentas microbiológicas se apresentam como soluções viáveis, suprindo as necessidades desse processo de tratamento de resíduos. Os processos microbiológicos apresentam geralmente um ganho em relação a processos convencionais, ao gerarem um co-produto de interesse tecnológico ou comercial. Nesse aspecto, aparecem os fungos como micro-organismos viáveis para essas aplicações, devido à suas características de cultivo, trazendo certa flexibilidade para os procedimentos empregados.

Fungos são, por característica do seu reino, decompositores de matéria orgânica que possuem diversificadas fontes de energia, sendo assim propícios receptores de resíduos agroindustriais para fermentação. Fungos filamentosos, componentes do filo *Ascomycota*, são eficazes decompositores de matéria orgânica (MALAJOVICH, 2004), sendo sua principal vantagem sobre os diversos outros fungos a produção de enzimas extracelulares que agem sobre componentes específicos do seu substrato.

Fungos filamentosos podem ser utilizados em procedimentos de FES para produção de lipases, que são secretadas em meio extracelular e, “*in vivo*”, hidrolisam óleos e gorduras produzindo ácidos graxos livres e mono e diacilgliceróis. A produção de lipase em substratos agroindustriais por meio da fermentação em estado sólido proporciona uma aplicabilidade para este resíduo, assim, reduzindo o impacto ambiental.

Outro aspecto vantajoso é o custo destes catalisadores. As fermentações comumente usadas para obtenção de enzimas microbianas geralmente necessitam de nutrientes de custo

elevados. Porém, com métodos alternativos de obtenção de enzimas, como é o caso da fermentação no estado sólido (FES) é possível empregar resíduos como substrato e suportes inertes, que podem ser reutilizados, tornando a utilização destes biocatalisadores mais viáveis economicamente (BARRIOS-GONZÁLES, 2012; BUSSAMARA *et al.*, 2010).

Tendo em vista a importância econômica das lipases em diversos processos industriais e a vasta gama de aplicabilidade dessas enzimas em diferentes áreas, bem como o baixo custo da fermentação em estado sólido, o estudo de novos micro-organismos e de vias para a produção de lipases faz-se necessário. Além disso, a enzima pode ser imobilizada em diferentes suportes, reduzindo o custo do processo, uma vez que poderá ser reutilizada, podendo ser empregada na produção de diversos compostos, dentre eles os biocombustíveis, um mercado em alta devido à grande demanda desses produtos em substituição aos combustíveis fósseis (STERGIOU *et al.*, 2013).

O oleato de etila, sintetizado neste trabalho, é um éster graxo, sendo um dos ésteres do biodiesel. É utilizado como aditivo para diesel combustível, na indústria cosmética e alimentícia (SOUZA, 2013).

A produção de enzimas por FES, com aproveitamento de resíduos agroindustriais de diversas fontes, justifica plenamente este trabalho, considerando o aumento dos volumes de resíduos agroindustriais gerados nas indústrias, associado à crescente preocupação com os impactos ambientais e uma legislação ambiental cada vez mais rígida, tornam-se viáveis as aplicações na síntese de ésteres do biodiesel.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LIPASES- ASPECTOS GERAIS

2.1.1. Definição

Segundo a NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), as lipases (triacilglicerol éster acilhidrolase, E.C. 3.1.1.3) são pertencentes ao grupo das serina hidrolases. São enzimas hidrolíticas que “in vivo” catalisam a hidrólise da ligação éster presentes em triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), sendo a trioleína o seu substrato padrão, em monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol na interface água óleo (Figura 1). As lipases constituem uma classe especial de carboxil éster hidrolases. Já as esterases são enzimas que hidrolisam triacilgliceróis de cadeia curta (menor que de 10 átomos de carbono) (DOS SANTOS *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016; MESSIAS *et al.*, 2011).

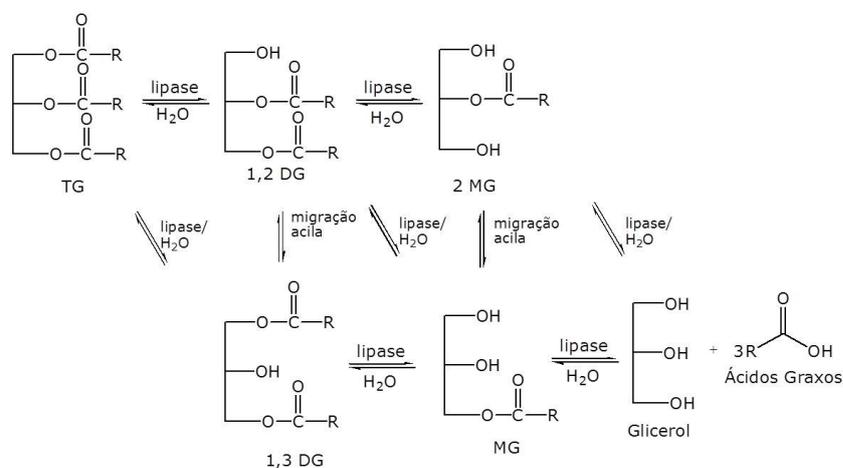


Figura 1. Reações de hidrólise de um triacilglicerol catalisadas por lipase. (Fonte: FUREBY *et al.*, 1997).

Em ambientes aquo-restritos, as lipases catalisam reações de biotransformação (Figura 2), como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólises e acidólises), bem como aminólise (síntese de amidas) e lactonização, em meios aquo-restritos, quando a quantidade de água do sistema é suficientemente baixa para deslocar o equilíbrio no sentido da síntese (DOS SANTOS *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006; PAQUES & MACEDO, 2006; RASSY *et al.*, 2004).

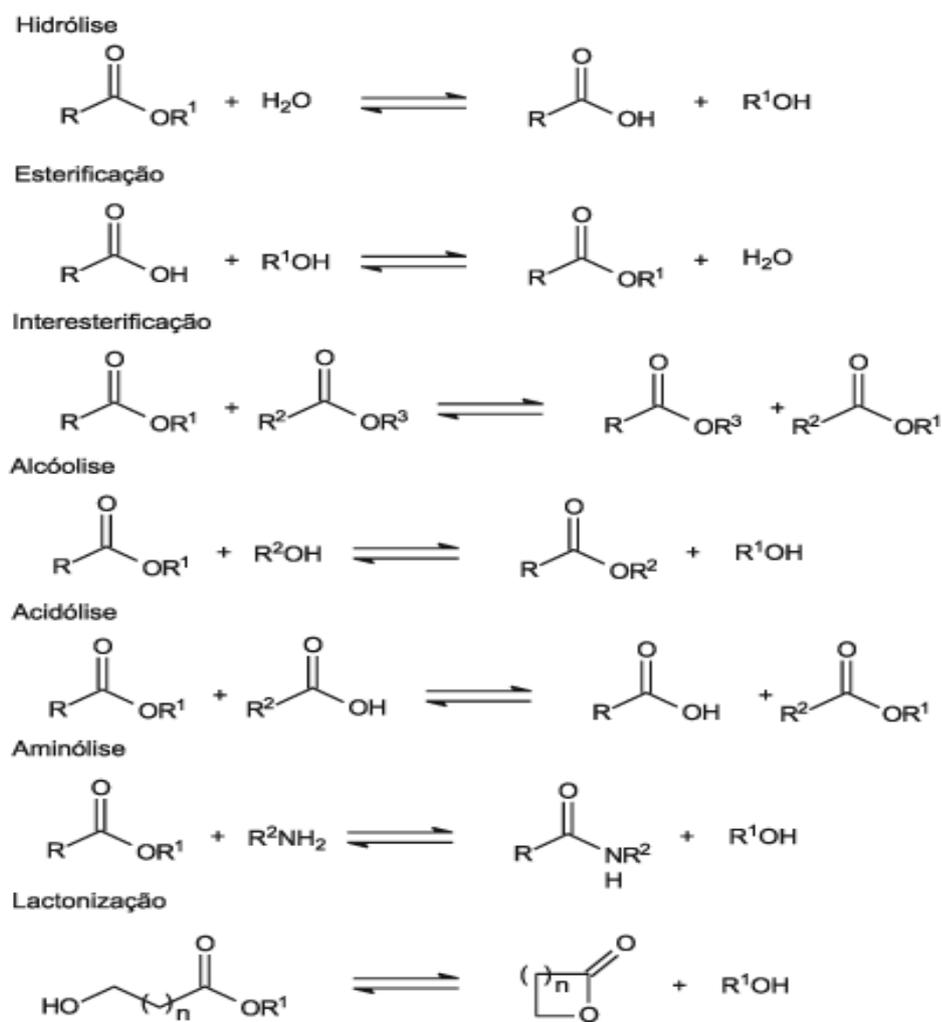


Figura 2. Reações de síntese catalisadas por lipases (Fonte: PAQUES & MACEDO, 2006).

As lipases geralmente não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, são relativamente estáveis a altas temperaturas e apresentam especificidade (regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade) (ZORN *et al.*, 2016; PANDEY *et al.*, 1999; GANDHI, 1997).

Na maioria das lipases, existe um “flap” ou “lid” (tampa hidrofóbica), que cobre o sítio catalítico das enzimas. O lado da “tampa” voltado para o sítio catalítico, assim como as cadeias proteicas ao redor deste, são compostos principalmente por cadeias laterais hidrofóbicas. Em ambientes aquosos, a “tampa” cobre o sítio catalítico, a lipase é inativa, e diz-se que ela está na sua forma “fechada”. Na presença de substratos hidrofóbicos na interface, a tampa hidrofóbica se move e sofre uma mudança conformacional, expondo o seu sítio ativo e permitindo a catálise da reação (ZORN *et al.*, 2016). Esta mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces água/óleo é conhecida como “ativação interfacial”.

Segundo Holwerda *et al.* (1938), este fenômeno se caracteriza por uma elevada atividade enzimática em substratos pouco solúveis em meio aquoso, e sistemas com grande área interfacial (Figura 3).

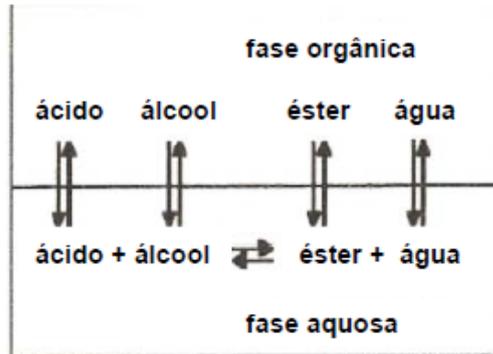


Figura 3. Representação de uma reação de esterificação por via enzimática em um sistema heterogêneo. (Fonte: STRAATHOF & ADLERCEUTZ, 2000).

2.1.2. Aspectos Estruturais e Mecanismo Catalítico das Lipases

Com relação à estrutura de lipases, estudos de raio-X demonstraram que a sua estrutura tridimensional apresenta um padrão conformacional comum denominado de conformação α/β hidrolase, composto de uma sequência de α -hélices e folhas β -pregueadas (BORNSCHEUER, 2002; SCHRAG & CYGLER, 1997; JAEGER *et al.*, 1994).

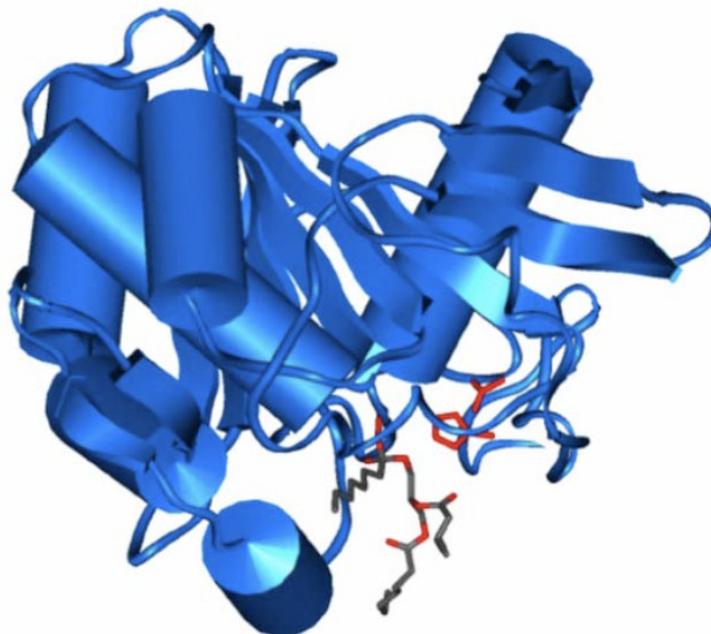


Figura 4. Estrutura da lipase de *Rhizopus oryzae* na presença do substrato tricaprilina. (Fonte: DIAZ, 2005).

Este tipo de estrutura apresentado na Figura 4 é composto por um núcleo central combinado por fitas β paralelas rodeado por porções em α -hélice. As fitas β têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si. O sítio catalítico das lipases é composto por uma tríade catalítica (Ser, Asp/Glu e His) semelhante à observada primeiramente em serina-proteases. O sítio ativo está localizado no lado C-terminal das fitas β . O nucleófilo catalítico (serina) está localizado especificamente no C-terminal da fita $\beta 5$ apresentado na Figura 5 em um pentapeptídeo altamente conservado G-X₁-S-X₂-G, onde G= glicina; S= Serina; X₁= histidina e X₂= ácido glutâmico ou aspártico, que constitui o ângulo nucleofílico (JAEGER & REETZ, 1998; SCHRAG & CYGLER, 1997; EGLOF *et al.*, 1995; JAEGER *et al.*, 1994).

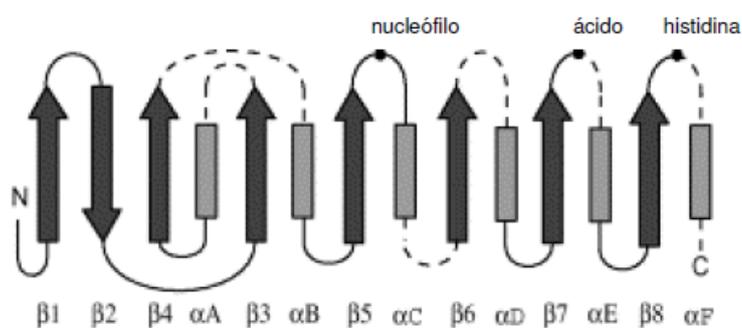


Figura 5. Modelo estrutural de α/β hidrolases. (Fonte: POUDEROYEN *et al.*, 2001).

Lipases são hidrolases que agem em ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, na interface água óleo. Como detalhado anteriormente o sítio ativo consiste na tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu. O mecanismo catalítico para lipases segue, uma serina protease (Figura 6) devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo de lipases e proteases (MADALOZZO, 2017; BORNSCHEUER, 2002).

O mecanismo catalítico de hidrólise ou síntese de ésteres é semelhante para lipases e proteases e ocorre em quatro etapas. Inicialmente, o aminoácido histidina da tampa hidrofóbica aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila do aminoácido serina do sítio catalítico. Ocorre, então, um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico. O anel imidazólico da histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido. O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas ligações de hidrogênio formadas com ligações amida dos resíduos de aminoácidos. Uma molécula de álcool é liberada, deixando um complexo acil-enzima. Em um segundo ataque

nucleofílico por um íon hidroxila, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada (BORNSCHEUER, 2002; JAEGER *et al.*, 1994).

Evidências deste mecanismo têm sido confirmadas por estudos de ligação de inibidores a lipases e pela análise estrutural destas proteínas (JAEGER *et al.*, 1999).

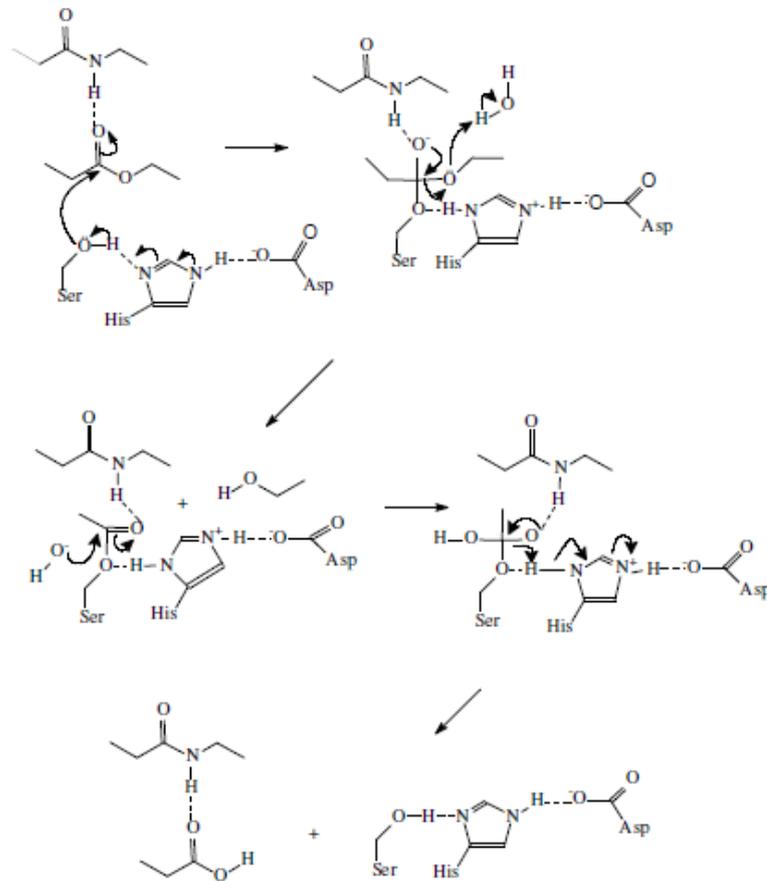


Figura 6. Mecanismo catalítico proposto para lipases. (Fonte: JAEGER *et al.*, 1994).

2.1.3. Fontes de Lipases

As lipases são naturalmente encontradas nos tecidos de animais, principalmente no pâncreas, de onde inicialmente eram obtidas; em plantas como a mamona (*Ricinus communis*) e a canola (*Brassica napus*) e, em micro-organismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo os gêneros *Rhizopus*, *Candida*, *Penicillium* e *Pseudomonas* considerados as principais fontes produtoras desta enzima (LAGE *et al.*, 2016; JAEGER *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 1999).

A obtenção de enzimas, produzidas industrialmente por empresas como Novozyme e Sigma, pode ser a partir de fontes vegetais, animais, ou microbianas (GANGADHARA *et al.*, 2009; PAQUES *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2005). Do ponto de vista industrial, as lipases

microbianas são as fontes mais utilizadas, pois têm maior estabilidade frente ao pH e temperatura, especificidade ao substrato e os custos de produção são mais baixos quando comparados com outras fontes. Além disso, a grande biodiversidade de microrganismos aumenta a sua importância biotecnológica e justifica a busca de novas lipases microbianas (LAGE *et al.*, 2016; CONTESINI *et al.*, 2010).

As indústrias têm utilizado os microrganismos como uma grande fonte de enzimas comerciais. As enzimas são muito importantes nas indústrias de processamento de alimentos. Algumas das maiores aplicações industriais incluem produção de xarope de milho, clarificação de bebidas, cervejaria, panificação, tenderização de carne, e preparação de leite deslactosado para pessoas com intolerância à lactose (DAVIDS *et al.*, 2013).

Existem várias vantagens no uso de enzimas microbianas em processos industriais como, por exemplo, atividades enzimáticas elevadas, à produção de enzimas por processos fermentativos de baixo custo e reprodutíveis. São inúmeros os aspectos que devem ser considerados na seleção de um microrganismo como fonte de uma enzima: o microrganismo deve ser capaz de produzir rendimentos elevados de enzima no menor tempo de fermentação; selecionar microrganismo produtores de enzimas extracelulares porque elas são mais fáceis de serem produzidas e isoladas; um microrganismo deve ser reconhecido como GRAS (Generally Regarded as Safe), ou seja, que não produza nenhuma substância tóxica ou nociva à saúde humana e, deve crescer em meios com baixo custo contendo substratos baratos, já que o custo da matéria prima é a maior despesa em um processo fermentativo (BIROLI, 2015; DAVIDS, 2013; LEE, 1996).

Dentre as enzimas microbianas, os principais produtores de lipases são os fungos filamentosos e ultimamente são as fontes preferenciais, uma vez que produzem lipases extracelulares (BIROLI, 2015; CONTESINI *et al.*, 2010; BORNSCHEUER, 2002) e também porque muitos fungos não são nocivos à saúde humana. (DAVIDS, 2013; JAEGER *et al.*, 1994).

Dentre as espécies mais utilizadas são as dos gêneros *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.* (BIROLI *et al.*, 2015; HITA *et al.*, 2009). O uso de técnicas como a evolução dirigida, engenharia genética e de proteínas pode ser muito favorável para selecionar lipases com propriedades desejadas (CONTESINI *et al.*, 2010).

A maior parte dos fungos são microrganismos aeróbios que formam longos filamentos, células nucleadas conhecidas como *hifas*. Suas células são maiores do que as de bactérias. As

hifas crescem entrelaçando-se para formar micelas. A classificação dos fungos é baseada mais nas características morfológicas e em reações bioquímicas (BIROLI *et al.*, 2015; LEE, 1996).

Os fungos apresentam uma estrutura vegetativa chamada de *micélios*, que é um sistema de tubos altamente ramificado. Dentro desses tubos há uma massa móvel de citoplasma contendo muitos núcleos. Os longos e finos filamentos de células nos micélios são chamados de hifas apresentado na Figura 7. Os fungos são organismos sem motilidade que não contêm clorofila, e a reprodução, que pode ser sexuada ou assexuada, é realizada por meio de esporos. As classes de fungos industrialmente importantes são *Aspergillus* e *Penicillium*.

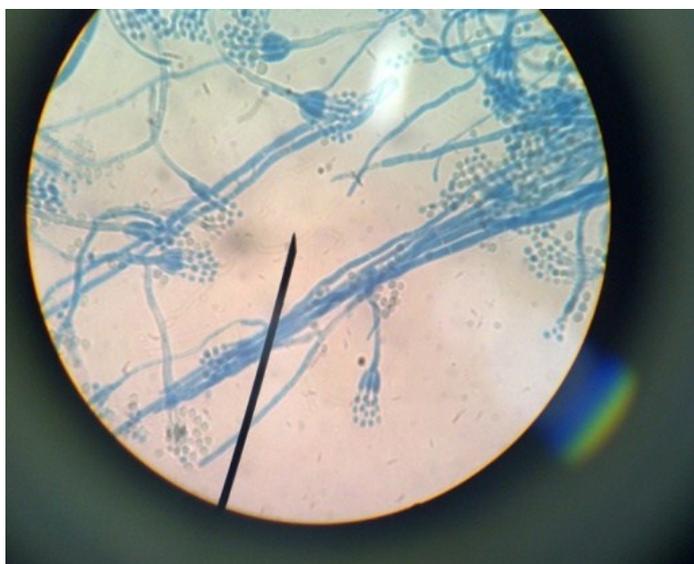


Figura 7. Imagem da microscopia ótica do Fungo *Penicillium sumatrense*, num microscópio Olymous CX31. (Fonte: O autor, 2017).

Os principais produtos destes microrganismos são antibióticos, ácidos orgânicos (ácido oxálico, ácido cítrico), e catalisadores biológicos (enzimas). Os fungos de importância biotecnológica estão apresentados na Tabela 1 como podemos destacar os do gênero *Rhodotorula* que produzem lipídios, e os dos gêneros *Mucor* e *Rhizopus* produtores de enzimas.

Tabela 1- Alguns fungos com importância biotecnológica.

Gênero	Produtos
<i>Mucor</i>	Ácidos orgânicos, enzimas
<i>Rhizopus</i>	Ácidos orgânicos, enzimas
<i>Blackeslea</i>	β-Caroteno
<i>Choanephora</i>	β-Caroteno
<i>Ashbya</i>	Riboflavina
<i>Cryptococcus</i>	Riboflavina
<i>Candida</i>	Ácido Cítrico
<i>Rhodotorula</i>	Lípideos
<i>Saccharomyces</i>	Etanol, Vinho, Cerveja
<i>Saccharomycopsis</i>	Proteínas
<i>Torulopsis</i>	Ácido Cítrico
<i>Aspergillus</i>	Enzimas, Antibióticos, Ácidos Orgânicos
<i>Cephalosporium</i>	Antibiótico
<i>Penicillium</i>	Antibiótico, Ácido Orgânico, Enzimas
<i>Fusarium</i>	Proteína, Gordura
<i>Altemaria sp.</i>	Compostagem
<i>Trichoderma sp.</i>	Bioinseticida

Fonte: ANGAJALA *et al.*, 2016; COUTO & SANROMAN, 2006; LEE, 1996.

As enzimas industriais têm diversas áreas de aplicações, com destaque no ramo alimentício.

Elas são usadas na produção ou processamento de alimentos como o amido, as farinhas, queijos, sucos de frutas, adoçantes artificiais e carnes, e também são frequentemente usadas nas indústrias de cerveja e vinho. As enzimas também são usadas na agricultura; por exemplo, os fazendeiros utilizam a silagem como alimento, facilmente estocado para as vacas. A fermentação reduz o pH da silagem, o que inibe o crescimento de organismos deterioradores. As enzimas celulasas são comumente adicionadas à silagem a fim de aumentar a quantidade de açúcares fermentecíveis (ANGAJALA *et al.*, 2016; JOHNSON-GREEN *et al.*, 2002).

Financeiramente as enzimas industriais são muito importantes, o mercado mundial chega a 1 bilhão de dólares; pelo menos 400 companhias fabricam enzimas, embora 12 delas

dominem o mercado. A maior parte das enzimas produzidas por essas companhias são obtidas a partir de microrganismos e são usadas por cervejarias, produtores de vinho, processadores de amido, laticínios, e muitos outros processadores de alimentos e bebidas. As enzimas, tais como proteases e lipases são utilizadas em produtos de limpeza de roupas, sabão em pó (ANGAJALA *et al.*, 2016; JOHNSON-GREEN *et al.*, 2002). Na Tabela 2 estão citadas algumas aplicações dos fungos na indústria de alimentos.

Tabela 2- Importância dos fungos na indústria de alimentos.

Fungo	Característica	Alimento Relacionado
<i>Agaricus, Bisporus e outros</i>	Formação do corpo do fruto	Cogumelo Comestível
<i>Penicillium roquefortii e camembertii</i>	Crescimento em queijos	Queijo azul e comembert
<i>Kluyveromyces lactis e Aspergillus nidulans</i>	Leveduras recombinantes com o gene da quimosina	Produção de quimosina para queijo
<i>Mucor miehei e outros</i>	Proteases Aspárticas	Produção de queijo
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Produção de lactase	Diminuição da intolerância à lactose
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produção de Etanol	Bebidas Fermentadas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produção de CO ₂	Produtos de Panificação
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Rápido crescimento	Uso direto em alimentos
<i>Aspergillus niger</i>	Produção de Enzimas	Processamento de amidos e sucos
<i>Aspergillus niger</i>	Produção de ácido cítrico	Ingredientes de Alimentos
<i>Aspergillus oryzae</i>	Produção de aromas	Molho se soja
<i>Aspergillus oryzae</i>	Produção de aromas	Molho se soja
<i>Penicillium notatum</i>	Crescimento em queijos	Queijos
<i>Trichoderma harzianum</i>	Produção de Enzimas	Processamento de amidos

Fonte: PANDEY *et al.*, 2013; COUTO & SANROMAN, 2006; JOHNSON-GREEN *et al.*, 2002.

2.1.4. Características Cinéticas e Físico-químicas das Lipases Fúngicas

Os fungos são de particular interesse para a produção de enzimas, incluindo as lipases, devido ao menor tempo de produção em relação às bactérias, exigências nutricionais

relativamente simples, e porque as enzimas por eles produzidas normalmente são mais estáveis, possuem alto rendimento de conversão de substrato em produto, bem como o fato de serem extracelulares, facilitando sua recuperação do meio de fermentação (HASAN *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2005). As fontes fúngicas têm sido também preferencialmente utilizadas porque na sua grande maioria não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS (Generally Regarded as Safe) (CORADI, 2012; JAEGER *et al.*, 1994).

Em condições apropriadas de cultivo, algumas espécies de fungos filamentosos produzem lipases extracelulares, sendo estas separadas do meio de cultivo e da massa micelial por filtração simples e centrifugação (TREICHEL *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2001). Os fungos filamentosos são reconhecidamente como fontes produtoras de lipases, com várias patentes depositadas, sendo amplamente estudados do ponto de vista genético e bioquímico. Porém, apesar do grande número de lipases descritas na literatura, as enzimas produzidas por cada espécie possuem características únicas e, portanto, diferentes aplicações em reações de síntese ou hidrólise (CORADI, 2012).

Büchner, em 1897, foi quem primeiro extraiu enzimas ativas a partir de células vivas, demonstrando que estes catalisadores atuantes em organismos vivos também podem agir em sistemas *in vitro*, completamente independentes de qualquer processo de vida. Os estudos do primeiro isolamento de uma enzima pura por Summer em 1926 revelaram que o material era uma proteína com atividade catalítica. O número de enzimas conhecidas aumentou rapidamente no século passado, atingindo quase 1500 (DAVIDS *et al.*, 2013; LEE, 1996).

Embora muitas enzimas exijam cofatores não protéicos ou grupos prostéticos, elas são proteínas com peso molecular elevado. A massa molar de lipases microbianas varia entre 19 a 65 KDa, sendo que as cutinases são as menores lipases (19 KDa) de estrutura conhecida (CYGLER & SCHRAG, 1997; YAO & KOLLER, 1994). A elevada massa molecular dessas enzimas favorece a formação destas estruturas tridimensionais bem definidas e estabilizadas por interações (ligações de hidrogênio e dissulfeto, interações hidrofóbicas e interações iônicas) entre os aminoácidos que as constituem. Estas conformações são decisivas para uma das mais importantes características das enzimas: a habilidade de reconhecer e agir especificamente sobre um determinado substrato, como por exemplo, em misturas racêmicas (DAVIDS *et al.*, 2013; LEE, 1996).

As enzimas agem sob condições brandas de pH e temperatura. Em contrapartida as reações químicas que utilizam catalisadores químicos requerem condições extremas de pHs e temperaturas muito baixos ou muito elevados. O uso de biocatalisadores é uma característica

atrativa em relação à economia de energia e à preservação do meio ambiente (GALAN *et al.*, 2013; LEE, 1996).

As lipases microbianas geralmente apresentam atividade máxima em pH entre 6,0 e 8,0. A temperatura ótima varia entre as lipases microbianas. As lipases bacterianas frequentemente apresentam temperaturas elevadas entre 40 e 70 °C (FERNANDES, 2007).

Com relação à estabilidade ao pH das lipases bacterianas observa-se uma tendência de maior estabilidade em valores alcalinos de pH; sendo que verifica-se com frequência estabilidade em faixas de pH desde fortemente ácido (pH 2,0) a fortemente alcalino (pH 12,0) (FERNANDES, 2007).

A termoestabilidade é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial como as lipases, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50 °C. Lipases microbianas têm sido estudadas com relação à termoestabilidade; entretanto, não há padronização nas metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa (FERNANDES, 2007).

Há vários exemplos de lipases fúngicas estáveis em temperaturas elevadas, como as lipases de *F. oxysporum* em que Prazeres *et al.*, (2006) avaliaram que a atividade enzimática máxima ocorreu em uma temperatura de 50°C (ZAGO, 2010). Lage *et al.* (2016) estudaram a lipase microbiana de *Thermomyces lanuginosa* (TLL). Eles determinaram que a lipase é uma proteína com uma cadeia polipeptídica contendo 269 aminoácidos e uma massa molecular de 31,7 KDa. O pH ótimo da enzima estudada é 9,0 e a temperatura ótima varia entre 55 e 60 °C (LAGE *et al.*, 2016). Outros autores como Lima *et al.* (2004 a, c) determinaram que a lipase de *B. cepacia* apresenta massa molar de aproximadamente 33 kDa e boa estabilidade frente ao pH (3 a 10) e à temperatura (20 a 55 °C) (LIMA *et al.*, 2004 a,c).

2.1.5. Aplicação das lipases

O uso de enzimas em processos industriais apresenta uma série de vantagens sobre o processo químico como a seletividade, atuação em condições brandas de pH e temperatura, catálise sem geração de produtos tóxicos ou poluentes (white biotechnology) e economia de água e energia (HEUX *et al.*, 2015; FREIRE & CASTILHO, 2008).

As lipases representam cerca de 30% das enzimas usadas em processos de biotransformação pela indústria, sendo que o uso como aditivos em detergentes (biosurfactantes) ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas. Isso se deve ao fato de que as lipases utilizadas para este fim não necessitam de um alto grau de pureza nem de especificidade, o que resulta em enzimas de menor custo de produção. Entretanto, a capacidade hidrolítica das lipases tem sido explorada em vários outros campos de atividade, como, por exemplo, na indústria de papel e celulose, para remoção de material hidrofóbico como triacilgliceróis e ceras que são indesejáveis na manufatura de papel, na indústria do couro, em processos de biodegradação e tratamento de águas residuárias (efluentes) ricas em gorduras, provenientes de fábricas, frigoríficos, laticínios, ou de indústrias de refinação de óleos e gorduras que poluem solos e águas (ANGAJALA *et al.*, 2016; JAEGER *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 1999). Outra área em que as lipases são largamente empregadas é na indústria alimentícia, para modificar as propriedades organolépticas do alimento, como textura e sabor; na produção de flavorizantes, aromatizantes e na maturação do queijo (PANDEY *et al.*, 2013).

As lipases também são utilizadas na indústria farmacêutica, na síntese de medicamentos quirais, como por exemplo, (S)-ilbuprofeno e (S)-cetoprofeno. Para que a enzima seja utilizada na indústria farmacêutica é necessário um alto grau de pureza e especificidade (BIROLI *et al.*, 2015; CONTESINI *et al.*, 2010).

Existem inúmeros trabalhos sobre as aplicações biotecnológicas envolvendo lipases. As lipases produzidas por *Fusarium* têm sido relatadas recentemente. Na área de biocombustíveis e bioenergia, alguns autores demonstraram a possibilidade de produção de biodiesel via transesterificação enzimática por *Aspergillus oryzae* e lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por FES (ZAGO, 2016; KODA *et al.*, 2010; HAMA *et al.*, 2008).

Mais uma importante aplicação das lipases é na sanitização de ambientes hospitalares. Estudos reportaram que a lipase produzida por uma cepa de *F. oxysporum* em combinação com um biosurfactante foi utilizada com eficiência na inibição do crescimento de bactérias de contaminação hospitalar (QUADROS *et al.*, 2011).

Na Tabela 3 estão citadas algumas aplicações industriais das lipases.

Tabela 3- Aplicações industriais das lipases.

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	Remoção de Lipídios	Cosméticos em geral
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico

Fonte: SALIHU & ALAM, 2015; SILVA, 2007; CASTRO *et al.*, 2004.

2.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Há dois tipos básicos de fermentação para produção de ácidos, enzimas, antibióticos, bipesticidas e outros metabólitos: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES).

A FES é um processo em que os microrganismos crescem em um ambiente sem água livre ou com baixo teor de água livre. Este processo tem uma grande importância histórica

para a humanidade, principalmente no processamento de alimentos. A FES é utilizada em vários ramos industriais como a produção de biomoléculas; alimentos; produtos farmacêuticos e têxteis (SOCCOL *et al.*, 2017; PANDEY *et al.*, 2003).

As lipases têm sido produzidas por fermentação principalmente por microrganismos (bactérias, fungos e leveduras). As lipases podem ser produzidas tanto pelo método de FS como por FES. No que se diferem pelo meio em que o organismos crescem, na FS os microrganismos crescem em meio líquido, com alto teor de água livre. Em quaisquer dos casos a produção de lipases está relacionada à composição do meio de cultivo e das condições de fermentação, sendo influenciada por fatores como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono, água, agitação, presença de sais minerais e vitaminas (FARINAS, 2015; LIMA *et al.*, 2003).

Na FES, o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato que compõe o meio (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo-os e secretando os metabólitos. O material sólido e geralmente insolúvel age como suporte físico e como fonte de nutrientes para o microrganismo. O material sólido poderá ser um substrato sólido natural, como resíduos agroindustriais, ou um suporte inerte, como poliuretano ou resinas poliméricas, que servem apenas como suporte de crescimento dos microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2017; SOCCOL *et al.*, 2017; HAMA *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2005; PANDEY *et al.*, 2003).

Há inúmeras vantagens na FES em relação à FS como: (1) meio de cultivo mais barato por ser geralmente constituído de resíduos de produtos agrícolas não refinados (por exemplo, palhas, bagaços e tortas vegetais), que muitas vezes são até descartados pelas indústrias de beneficiamento agrícola; (2) reproduz as condições de vida natural de baixa atividade da água adequada aos fungos; (3) é menos suscetível à contaminação bacteriana; (4) tem várias vantagens ambientais, uma vez que permite o uso de resíduos industriais sólidos como fonte de substrato e energia; (5) além de menor geração de efluentes (SOCCOL *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2011; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Como um processo biotecnológico, a FES é uma técnica de interesse econômico especialmente em países com grande geração de resíduos de biomassa e da agroindústria, como por exemplo, o Brasil, pois estes resíduos podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo. Além disso, a tecnologia envolvida nesses processos é simples e barata, em comparação com a fermentação submersa (FS). A FES é particularmente mais adequada à produção de enzimas por fungos filamentosos, uma vez que reproduz as condições de vida

natural de baixa atividade da água adequada a esses fungos. Este é o principal fator por que eles se adaptam bem e geram produtos com altos rendimentos em FES, quando comparados com a FS (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Como um processo biotecnológico, a FES é muito utilizada em países da África, do Oriente, Europa e América na preparação ou enriquecimento de alimentos. Atualmente estes países estão estudando a FES como uma alternativa para o aproveitamento de resíduos, que podem ser utilizados para enriquecimento proteico em rações animais; para detoxificação, com eliminação de substâncias recalcitrantes; e para compostagem, bem como para produção de metabólitos de alto valor agregado como enzimas, etanol, ácidos orgânicos, biopesticidas, e antibióticos (PANDEY *et al.*, 2013). A FES também pode ser empregada na produção de esporos e cogumelos.

2.2.1. Substratos utilizados na FES para a produção de lipases

Substratos derivados de grãos ricos em conteúdo lipídico, usados na indústria de óleos, como soja, girassol, milho, babaçu, crambe e azeitona são usados para produção de lipases por fungos e bactérias em FES; subprodutos como farelo de casca de trigo, farelo de cevada e arroz, dentre outros, também vem sendo utilizados (CORADI, 2012; FERNANDES *et al.*, 2007).

Nesse sentido, uma nova e promissora fonte de óleo para a indústria do biodiesel e mais uma alternativa de substrato para FES é o crambe (*Crambe abyssinica*), um vegetal que possui de 28 a 38% de óleo em sua semente, além do alto teor de proteína. É uma cultura de fácil manejo, pois se assemelha muito a da soja e com um ciclo mais rápido. O óleo produzido é rico em ácido erúcido e, por isso, não é comestível, sendo exclusivamente usado para fins industriais. (GUIRRA, 2009; SOUZA *et al.*, 2009).

Originário da Etiópia, país africano de clima quente e seco, e domesticado na Europa, na região do Mediterrâneo, o crambe (*Crambe abyssinica*) pertence à família das crucíferas, a mesma da colza e da canola. Seus grãos oleaginosos contêm um óleo não comestível usado em produtos industriais. A planta é encontrada em áreas tropicais e subtropicais da África, no Oriente Médio, na Ásia Central e Ocidental, na Europa, nos Estados Unidos e na América do Sul. O óleo de crambe é utilizado para fabricar uma infinidade de itens de consumo industrial nos países norte-americanos, tais como lubrificantes, fluidos de transferência de calor, surfactantes, cosméticos, poliésteres, plásticos e nylons (*Economic Research Service*; VOSS,

2006). No Brasil seu cultivo iniciou-se em 1995, sendo o único país que estuda a viabilidade do cultivo voltado à produção de biodiesel, uma das apostas do governo visando o crescente mercado de bicompostíveis (GUIRRA, 2009).

A semente do crambe (Figura 8) fornece até 38% de óleo, bem como alto teor de proteínas (PILAU *et al.*, 2011, SOUZA *et al.*, 2009).



Figura 8. Foto das sementes de Crambe (*Crambe abyssinicia hochst*). Fonte: Fundação MS- Mato Grosso do Sul.

O óleo de crambe é menos susceptível a oxidação do que os óleos de soja e girassol, isso por que no óleo de crambe, o ácido graxo predominante é o ácido erúcido (58,5%), que é monoinsaturado (22:1), enquanto que os óleos de soja e girassol contêm quantidades mais expressivas de ácidos graxos poli-insaturados, como o linoléico (18:2) e o linolênico (18:3) (SILVA *et al.*, 2009; VOSS *et al.*, 2006).

A Fundação MS, a qual forneceu o substrato (torta de crambe) para o desenvolvimento deste trabalho, está situada em Maracaju/MS e é a pioneira no país nos estudos com o crambe, e detém os direitos de comercialização das sementes do cultivar FMS Brilhante. O plantio apresenta produtividade que pode variar de 1000 a 1500 Kg por hectare, o ciclo produtivo é rápido e a cultura é rústica e de baixo custo. A tecnologia para a cultura do crambe é simples, uma vez que a maquinaria da soja pode ser facilmente adaptada para o uso, além da simplicidade nos métodos de extração do óleo por meio de prensa ou extrusora. Sobretudo, a cultura do crambe visa favorecer a agricultura familiar, segmento econômico visto como importante produtor de oleaginosas para a produção de biodiesel. Pelas características apresentadas, o crambe é tido como uma importante alternativa de matéria prima para o

biodiesel: possui boa quantidade de óleo, baixo custo de plantio, boa produtividade e precocidade de colheita (CORADI, 2012).

Estudos recentes comprovam a viabilidade do óleo de crambe para produção de biodiesel e síntese de ésteres (SOUZA, 2013; SILVA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2009; STEINKE *et al.*, 2000). Uma das vantagens em se utilizar o óleo de crambe é que se gera um resíduo sólido após a extração do óleo, chamado de torta de crambe, sendo uma importante fonte de substrato para a FES visando à produção de lipases, especialmente pelo alto teor de óleo encontrado nesta semente (28 a 38%). (CORADI, 2012).

Existem inúmeros resíduos agrícolas, que são fontes de carbono e nitrogênio e, que podem ser utilizados como recursos renováveis para o crescimento de microrganismos e a produção de metabólitos, tais como torta de crambe, torta de milho, torta de soja e bagaço de cana-de-açúcar, sendo que os bagaços são ricos em carbono e materiais celulósicos. As tortas são subprodutos da agroindústria e são obtidas após a extração do óleo por prensagem mecânica ou com solventes orgânicos. A sua composição varia dependendo das condições de crescimento e métodos de extração. As tortas podem ser classificadas em tortas que podem ser utilizadas como ração animal (peixes, suínos e aves) e, tortas que não podem ser utilizadas como ração (OLIVEIRA *et al.*, 2017; FREIRE & CASTILHO, 2016; SANTOS *et al.*, 2005), como por exemplo, a torta de crambe, devido à sua toxicidade por alto teor de ácido erúico e de glicosinolatos (CORADI, 2012).

As tortas agroindustriais têm sido utilizadas em processos fermentativos para produção de antibióticos e biopesticida; na produção de cogumelos; como agente de controle biológico e na produção de energia. (CORADI, 2012).

Neste contexto, foi utilizado neste trabalho a lipase de *Penicillium sumatrense* produzida por FES, na síntese de ésteres, utilizando-se como substratos os resíduos agroindustriais (torta de crambe). O uso de resíduos apresenta-se como uma possibilidade interessante, particularmente porque o próprio sólido fermentado contendo a enzima pode ser utilizado neste trabalho diretamente para catálise da reação, conforme descrito por outros autores como SALUM *et al.* (2010) e FERNANDES *et al.* (2007).

Estudos de FES para produção de lipases reportados na literatura utilizam apenas fungos e leveduras, sendo citados *Fusarium oxysporum*, *Penicillium candidum*, *Mucor miehei*, *P. camembertii*, *Monascus fuliginosus*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus microsporus* e *R. rhizopodiformis* utilizando bagaço de cana (AGUIEIRAS *et al.*, 2014; ZAGO, 2014; CORADI, 2012; GOMBERT *et al.*, 1999; CORDOVA *et al.*, 1998);

Aspergillus niger utilizando torta de gergelim (KAMINI *et al.*, 1998); *P. restrictum*, *Penicillium brevicompactum* e *Rhizomucor miehei* utilizando torta de babaçu (AGUIEIRAS *et al.*, 2017; TODESCHINI *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2011; PALMA *et al.*, 2000); *P. simplicissimum* e *Aspergillus niger* utilizando torta de soja (COLLA *et al.*, 2016; CAVALCANTI-OLIVEIRA *et al.*, 2011; DI LUCCIO *et al.*, 2004); *Burkholderia cepacia*, utilizando óleo de coco (CARVALHO *et al.*, 2014), *Penicillium brevicompactum*. utilizando torta de mamona (SILVA *et al.*, 2011). Com relação à produção de lipases por fermentação em estado sólido por bactérias, podemos citar a bactéria *Burkholderia cepacia*, utilizando-se como substratos o bagaço de cana de açúcar e o girassol (SERRES *et al.*, 2017).

A Tabela 4 apresenta os principais microrganismos envolvidos na produção de lipases por Fermentação no Estado Sólido (FES).

Tabela 4- Principais microrganismos envolvidos na produção de lipases por Fermentação no Estado Sólido (FES).

Microrganismo	Substrato	Referências
<i>Fungos</i>		
<i>Aspergillus oryzae</i>	Torta de óleo de coco	RAMACHANDRAN <i>et al.</i> , 2004.
<i>Aspergillus niger</i>	Torta de gergelim	KAMINI <i>et al.</i> , 1998.
	Farelo de trigo e soja	COLA <i>et al.</i> , 2016.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Torta de soja	REINEHER, 2014.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Torta de crambe	CORADI, 2012.
<i>Penicillium camembertii</i>	Bagaço-de-cana	RIVERA-MINÓZ <i>et al.</i> , 1991.
<i>Penicillium candidum</i>		
<i>Mucor miehei</i>		
<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu	CASTILHO <i>et al.</i> , 2000.
		PALMA <i>et al.</i> , 2000.
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Torta de soja	DI LUCCIO <i>et al.</i> , 2004.
	Torta de babaçu	ALMEIDA, 2017
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Torta de amêndoa	UL-HAQ <i>et al.</i> , 2002.
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Bagaço-de-cana	RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2006.
		DIAZ <i>et al.</i> , 2006.
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	Bagaço-de-cana	CORDOVA <i>et al.</i> , 1998.
<i>Rhizomucor pusillus</i>		

2.3. BIOCATALÍSE EM AMBIENTES AQUO-RESTRITOS

Os estudos sobre catálise enzimática geralmente são realizados em meios aquosos. Mas quando se utiliza um substrato hidrofóbico e a água é um produto da reação, então, o meio aquoso não é adequado, resultando em baixos rendimentos. Neste caso, poderemos utilizar um meio de solvente orgânico, ou seja, um meio aquo-restrito, pois geralmente as lipases têm alta estabilidade em solventes orgânicos, principalmente em solventes orgânicos de baixa polaridade. Além disso, os solventes apolares solubilizam a maioria dos compostos do meio reacional, facilitando o contato da enzima com o substrato e evitando-se a inibição pelo excesso de produto, pois o produto encontra-se diluído no meio (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A partir da década de 70, uma variedade de proteínas, enzimas e suas atividades catalíticas têm sido estudadas em solventes orgânicos em ambientes aquo-restritos, dentre as quais as lipases, que têm mostrado atividade e estabilidade em solventes orgânicos (SCILLIPOTI *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2015; AGUIEIRAS *et al.*, 2015; SALUM *et al.*, 2010; LIMA, 2004 a; LIMA *et al.*, 2004 b; LIMA *et al.*, 2004 c). A enzima, na forma sólida e completamente sem a camada de hidratação, pode ter a capacidade de se manter ativa no meio orgânico, possivelmente devido à formação, na superfície da partícula sólida da enzima, de uma camada de proteína desnaturada, que protege as camadas interiores do contato com o solvente orgânico evitando-se a desnaturação (CHOWDARY *et al.*, 2002).

Considerando os sistemas reacionais utilizados na biocatálise, os meios aquo-restritos podem ser classificados em sistemas macro-heterogêneos (sistemas bifásicos ou trifásicos), em que se observa a separação de fases e, micro-heterogêneos (sistema de micelas reversas), no qual a separação de fases não pode ser observada macroscopicamente. Nos sistemas macro-heterogêneos, a enzima ou o solvente orgânico não são miscíveis em água (SCILLIPOTI *et al.*, 2017).

Os sistemas bifásicos aquo-restritos, geralmente contêm um reagente hidrofóbico solúvel no solvente orgânico e um biocatalisador solúvel em água. A fase orgânica pode ser um solvente orgânico, um solvente supercrítico ou um líquido iônico. O uso de um sistema bifásico permite o deslocamento do equilíbrio da reação, que favorece a reação direta (síntese) em relação a reação inversa (hidrólise). Além disso, a separação dos produtos da reação é facilitada, uma vez que os produtos são solúveis na fase orgânica e o catalisador na fase

aquosa. Os catalisadores enzimáticos têm sido aplicados em sistemas bifásicos, na química fina e na síntese de produtos farmacêuticos (SCILLIPOTI *et al.*, 2017).

Um dos principais tipos de sistemas bifásicos, e que foi utilizado neste trabalho é o sistema sólido-líquido. Neste sistema, a enzima está na forma sólida liofilizada ou “imobilizada” no sólido fermentado, em suspensão com a fase orgânica que contém os substratos. Mesmo quando a enzima está na forma liofilizada, o sistema pode ser considerado como bifásico, pois a maioria das lipases é insolúvel em solventes orgânicos. A água forma uma camada de hidratação ao redor da enzima, protegendo-a da desnaturação pelo solvente. Este tipo de sistema tem sido utilizado principalmente em reações de esterificação e transesterificação, conduzindo normalmente a conversões bastante elevadas, mas com atividades catalíticas baixas devido a problemas difusionais e de transferência de massa entre a enzima e os substratos e produtos (AGUIEIRAS *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2007).

As lipases microbianas, as quais são frequentemente obtidas de bactérias e fungos filamentosos, têm um grande potencial como biocatalisador em sistemas aquosos e aquo-restritos, devido as suas características como: não requerem cofatores; catalisam uma grande variedade de substratos e são estáveis em solventes orgânicos (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Por exemplo, a lipase de *B cepacia* apresenta uma excelente estabilidade em solventes orgânicos. Quando incubada por 1 h em diferentes solventes hidrofílicos (etanol, isopropanol, acetona), a enzima apresentou ativação até a proporção de 80% de solvente na mistura solvente:água, sendo a maior ativação em etanol (atividade residual de $195\% \pm 23$). Com 100% de solvente a atividade decresceu em todos os solventes, com exceção do isopropanol (atividade residual de $97\% \pm 18$). Com os solventes pouco polares (n-butanol) e apolares a 100% (v/v) (tolueno, n-hexano, n-heptano e isooctano), a enzima apresentou maior ativação em n-heptano (atividade residual de $121\% \pm 6$), e somente em isooctano não houve ativação (LIMA, 2004 a; LIMA *et al.*, 2004 b).

2.3.1. Importância Industrial dos Ésteres

A esterificação e a transesterificação são reações industrialmente importantes. Com relação às aplicações, a esterificação é utilizada na produção de flavorizantes e aromatizantes, enquanto que a transesterificação é mais utilizada na produção de ésteres do biodiesel

(AGUIEIRAS *et al.*, 2017; AGUIEIRAS *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2013; CONTENSINI *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2007).

As reações de transesterificação normalmente são realizadas com catalisadores químicos, no entanto, as rotas químicas apresentam várias desvantagens. Por exemplo, a rota química envolve catálise ácida ou básica e resíduos ácidos ou básicos nos produtos da reação são indesejáveis. Outra desvantagem é que a rota química envolve temperaturas elevadas, aumentando o consumo energético e possibilitando a degradação dos ésteres de biodiesel (ANGAJALA *et al.*, 2016; CONTENSINI *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2007).

As lipases (E.C. 3.1.1.3) catalisam reações de esterificação e transesterificação em meio de solvente orgânico, e, portanto, a produção de ésteres por via biocatalítica se apresenta como uma rota sintética atrativa. O uso de lipases apresenta vantagens em relação à catálise química como a alta seletividade, alta especificidade e condições operacionais suaves. (FERNANDES *et al.*, 2007).

A reação de formação de ésteres a partir de um ácido graxo e um álcool é chamada de reação de esterificação. Nesta reação obtém-se o éster como produto principal e a água como subproduto.

A reação de modelo utilizada neste trabalho, a síntese do oleato de etila está representada na Figura 9.

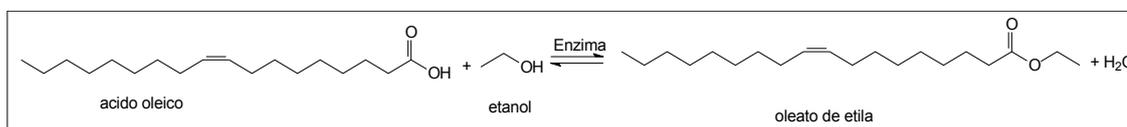


Figura 9. Reação de síntese do oleato de etila catalisada pela lipase.

Existem algumas variáveis importantes que influenciam a síntese enzimática de ésteres como: a razão molar (RM) ácido:álcool; natureza do solvente e a temperatura (SCILLIPOTI *et al.*, 2017).

Em alguns trabalhos encontrados na literatura, os autores utilizaram lipases imobilizadas (DOS SANTOS *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016; PANG *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2012) ou o sólido fermentado contendo o biocatalisador, nas reações de síntese de éster (AGUIEURAS *et al.*, 2017; BI *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2007). Em meio a estes fatores, citam-se a origem da enzima, quantidade de enzima no meio reacional, razão molar entre os reagentes, tipo de álcool utilizado, uso ou ausência de solventes na reação, quantidade de água adicionada no meio e temperatura da reação (BOUAID *et al.*, 2007), cujos efeitos serão citados a seguir.

Estes efeitos quase sempre são independentes do tipo de reação, esterificação ou transesterificação.

Uma das variáveis de maior influência na reação de síntese de ésteres é a razão molar dos substratos. Geralmente utiliza-se um excesso de álcool a fim de assegurar uma alta velocidade de reação e minimizar as limitações de difusão dos substratos (RIVERA *et al.*, 2009; SALIS *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008). Contudo, quantidades muito elevadas de álcool podem inibir a atividade enzimática, diminuindo a atividade catalítica ao longo da reação de esterificação (NOUREDDINI *et al.*, 2005). Conforme descrito por Yu *et al.* (2007), álcoois de cadeia curta, como o etanol, podem perturbar a estrutura funcional da enzima por remover sua camada de “água essencial”. Este efeito inibitório do etanol se deve ao fato desse substrato alterar a conformação molecular ativa da enzima, reduzindo sua atividade catalítica. As moléculas de água apresentam maior afinidade pela ligação com o álcool do que com a enzima. A desidratação da enzima pelo etanol diminui sua flexibilidade conformacional podendo levar à desnaturação. A água de hidratação da enzima, mantém a sua conformação nativa, evitando a perda da atividade catalítica e a desnaturação (STRAATHOF & ADLERCREUTZ, 2000).

Além do fato de que álcoois de cadeia menor, como metanol, etanol, apresentam uma solubilidade muito baixa nos ácidos graxos de cadeia longa, os quais são normalmente utilizados na síntese de ésteres do biodiesel. Em uma escala industrial, os solventes podem ser recuperados juntamente com o álcool, após a catálise enzimática (ROYON *et al.*, 2007), mas a síntese de ésteres de biodiesel em meio livre de solventes orgânicos é sempre desejada (química verde) (STRAATHOF & ADLERCREUTZ, 2000).

O uso de enzimas em meio de solventes orgânicos é de grande interesse e importância nos estudos de biocatálise, visto que permite a ocorrência de reações de síntese, as quais não ocorrem em quantidades elevadas de água. A atividade enzimática está diretamente relacionada com a polaridade do solvente orgânico, que pode provocar a desnaturação da enzima e levar à perda da atividade catalítica (ADNANI *et al.*, 2010; SÁNCHEZ-OTERO *et al.*, 2010; PIRES-CABRAL *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2004).

A velocidade de reação catalisada por enzimas pode ser afetada pela temperatura por dois mecanismos: o mecanismo químico, onde a velocidade de reação aumenta com a temperatura pelo aumento da energia cinética dos reagentes (substratos) e pelo aumento da transferência de massa, e o mecanismo associado à desnaturação da enzima pelo aumento da temperatura (AL-ZUHAIR *et al.*, 2007; NOUREDDINI *et al.*, 2005; FUKUDA *et al.*, 2001).

A síntese de ésteres geralmente baseia-se na esterificação química de ácidos graxos com álcool na presença de catalisadores inorgânicos em temperaturas elevadas (100°C). Porém, essas reações químicas são lentas, não seletivas e consomem uma grande quantidade de energia. A utilização de enzimas como biocatalisadores na síntese de ésteres permite o desenvolvimento de produtos com melhores propriedades, além de catalisar reações em condições suaves de pH e temperatura (ZAGO, 2010).

Os ésteres têm diversas aplicações industriais. Os ésteres etílicos, como o oleato de etila são compostos valiosos devido à sua maior volatilidade em relação aos ácidos graxos de origem, sendo utilizados na análise e caracterização de TAGs e, em larga escala, são empregados na formulação de medicamentos, lubrificantes, e são os principais componentes do biodiesel. Os ésteres de ácidos graxos possuem diversas aplicações como na indústria alimentícia, (aromas); produção de sabões; na fabricação de medicamentos perfumes e cosméticos; na produção e modificação de componentes alimentares (lipídios estruturados), e também na produção de biocombustíveis (STERGIOU *et al.*, 2013; ZAGO, 2010; JACKSON *et al.*, 2006).

Os principais constituintes do biodiesel são os ésteres, principalmente os metílicos e etílicos, de ácidos graxos de cadeia longa como os oleatos, palmitatos, ricinoleatos e linolenatos. O biodiesel é um biocombustível que vem sendo muito pesquisado e pode ser obtido por meio de reações de esterificação ou transesterificação. O método mais comum de produção do biodiesel é por catálise química, consistindo na transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta, como o metanol, na presença de ácidos ou bases como catalisadores (MARCHETTI *et al.*, 2007). O método químico para a síntese de biodiesel tem sido utilizado em escala industrial nos últimos anos. No entanto, o processo químico apresenta problemas relacionados à remoção do catalisador do meio reacional; elevadas temperaturas; dificuldade de separação do glicerol do meio reacional; reações laterais indesejáveis e o alto custo de refino do produto, o que torna este processo com custo elevado (OGNJANOVIC *et al.*, 2009).

Atualmente, a produção biotecnológica de biodiesel, com lipases, tem recebido considerável atenção e tem tido um rápido desenvolvimento, visto que a tendência de adotarem-se processos ecologicamente aceitáveis é crescente (RANGANATAHN *et al.*, 2008). O emprego de lipases como biocatalisadores nas reações de transesterificação permite que a reação ocorra em condições brandas, com facilidade na recuperação do glicerol e sem geração de sub-produtos. Além disso, no processo enzimático evita-se a formação de sabões,

o que ocorre no processo químico quando se utiliza um catalisador básico, como o hidróxido de sódio. Nestas reações enzimáticas, se a lipase estiver na forma imobilizada, além das vantagens citadas acima, existe a possibilidade de reutilização do biocatalisador (DUTRA, 2011; DIZGE *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICATIVA PARA ESCOLHA DA ENZIMA

A linhagem fúngica de *Penicillium sumatrense*, empregada nesse estudo foi isolada das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*) e identificada por sequenciamento de DNA ribossomal, de acordo com a metodologia descrita por STRINGARI (2009). Esta é uma enzima nova, produzida por uma linhagem selvagem isolada das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*). Poucos trabalhos foram encontrados na literatura utilizando-se o fungo *Penicillium sumatrense* (RODRIGUES *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A escolha por este microrganismo foi devida a algumas características importantes apresentadas pela lipase por ele produzida. Estudos prévios (Oliveira, 2013) demonstraram que a produção de lipases foi de 3183 U (31,83 U gSS⁻¹) em 100 g de substrato (girassol), frente ao método titulométrico. A atividade lipolítica produzida no meio de fermentação é alta quando comparada com a produzida por outros microrganismos selvagens (*Penicillium aurantiogriseum* 13 U mL⁻¹ em 72 h, *Penicillium corylophilum* 7 U mL⁻¹ em 120 h (LIMA *et al.*, 2003; BARON, 2003).

Com relação à utilização da lipase em biocatálise, uma das características imprescindíveis é a sua atividade catalítica na reação de esterificação. Como modelo para estudar a aplicação direta do sólido fermentado (contendo a lipase) e as variáveis que influenciam neste processo optou-se por testar o biocatalisador na esterificação do oleato de etila por se tratar de um éster do biodiesel de cadeia longa (substrato preferencial de lipases) e simples que facilitará nas análises qualitativas e quantitativas. Estudos prévios (Oliveira, 2013) demonstraram que a lipase de *Penicillium sumatrense* catalisou a reação do oleato de metila (60 U, RM 1:9, solvente hexano, 30 °C), obtendo-se 70,0 % de conversão em éster após 12 h de reação. A melhor condição encontrada para a produção de éster foi a razão molar ácido: álcool de 1:9 (97,73 ± 2,11 %).

Com relação aos estudos de reutilização do sólido fermentado, o catalisador foi reutilizado por 15 vezes na síntese do oleato de metila. Observou-se ainda que atividade decresceu 50% após o oitavo reciclo (tempo de meia-vida) (OLIVEIRA, 2013).

Estes resultados justificam a continuidade dos estudos da lipase de *Penicillium sumatrense* visando estudar os parâmetros que influenciam na catálise enzimática para potencializar ainda mais os resultados já obtidos.

Outro aspecto importante e que justifica este trabalho é que os resíduos gerados pelas indústrias aumentam cada vez mais, assim a preocupação em buscar uma utilização para este resíduo é inevitável.

A produção de enzimas por FES com aproveitamento de resíduos e a geração de produtos de alto valor agregado, como os ésteres do biodiesel, justificam plenamente este trabalho, considerando o aumento dos volumes de resíduos agroindustriais gerados nas indústrias, associado à crescente preocupação com os impactos ambientais destes e uma legislação ambiental cada vez mais rígida.

4. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da produção de lipase fúngica de *Penicillium sumatrense* por Fermentação no Estado Sólido (FES) utilizando como substrato a torta de Crambe e a sua avaliação catalítica em reações de síntese de ésteres em solventes orgânicos.

Objetivos Específicos

Estudos de Fermentação

- Otimizar a produção de lipases por FES utilizando substrato oriundo da agroindústria (Crambe), pelo estudo dos efeitos das seguintes variáveis: granulometria do substrato, umidade do substrato e tempo de cultivo.

Estudos de biocatálise

- Produzir a lipase nas condições otimizadas.
- Avaliar a cinética experimental de reação de formação do oleato de etila (reação modelo), utilizando o sólido fermentado.
- Otimizar a síntese do oleato de etila através das seguintes variáveis: RM ácido e temperatura, através da variável resposta que é a conversão em oleato de etila.
- Estudar a capacidade de reutilização (reciclos) da enzima.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, no Centro de Engenharia e Ciências Exatas – Campus Toledo se utilizando dos Laboratórios de Microbiologia e Laboratório de Processos de Separação.

5.1. REAGENTES

Foram utilizados reagentes de grau analítico como ácido cis-9-octadecenóico (ácido oléico, Dinâmica Química Contemporânea, 98 % de pureza), heptano (Neon, 99 % de pureza), tolueno (Sigma- Aldrich, 99,7 % de pureza).

5.2. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma cepa fúngica endofítica isolada das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*), identificada como *Penicillium sumatrense*. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa da professora M.Sc. Roseli Mello, da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba-PR.

O fungo endofítico *Penicillium sumatrense* já está identificado por sequenciamento de DNA ribossomal, de acordo com metodologia descrita por STRINGARI (2009).

5.3. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS

Para garantir condições estéreis de crescimento dos micro-organismos, 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 min.

5.4. ESTOQUE E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS

As linhagens foram inoculadas em meio BDA (ágar batata dextrose) contendo o antibiótico cloridrato de tetraciclina (250 mg L⁻¹ de meio BDA) e incubadas por 7 dias a 27°C, fazendo-se repiques mensais, sendo após o crescimento mantidas sob refrigeração (4°C).

5.5. SELEÇÃO DA LINHAGEM COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para verificar se a linhagem fúngica produz lipases, foram realizados testes em placas de Petri com meio ágar bacteriológico contendo o corante Rodamina B 0,001%, óleo de oliva 1% como única fonte de carbono, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ g L}^{-1}$; K_2HPO_4 $0,4 \text{ g L}^{-1}$; extrato de levedura $2,0 \text{ g L}^{-1}$ e Tween 80 0,01%. A produção de lipase em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fosforescentes ao UV quando observado ao ultravioleta a 350 nm, após 72 h de incubação em estufa a 27°C (OLIVEIRA, 2013).

5.6. MANUTENÇÃO DA CEPA

Para a manutenção, realizada a cada quatro meses, o fungo *Penicillium sumatrense*, foi incubado em meio BDA – cloridrato de tetraciclina (250 mg L^{-1} de meio BDA) em tubos inclinados e placas de Petri. O fungo foi incubado em estufa a 27°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.

5.7. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

A composição centesimal dos resíduos, como umidade, cinzas e teor de óleo foi determinada nos Laboratórios de Microbiologia e Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

5.7.1. Determinação do teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito conforme Zenebon *et. al* (2008). As amostras foram trituradas até a formação de um pó fino. Em seguida, suas massas (aproximadamente 1 g) foram acrescentadas em cadinhos, tratados em mufla a 650°C pesados anteriormente, utilizando balança analítica. Então foi colocado em uma estufa à temperatura de 110°C por 1 h. Colocou-se em um dessecador até atingir a temperatura ambiente, posteriormente, submetidas à nova pesagem até a obtenção do peso constante. Essas medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra.

5.7.2. Determinação do teor de Cinzas

A determinação quantitativa das cinzas totais foi realizada também de acordo com o método descrito por Zenebon *et. al* (2008). Para isso, foram pesados aproximadamente 1 g do substrato, transferido para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, as mesmas foram incineradas na temperatura de 700°C por 3 h. Após esta etapa foram calculadas as percentagens de cinzas em relação ao substrato que foi submetido ao processo de secagem. Essas medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra.

5.7.3. Determinação do teor de Óleo

Para a determinação do teor de óleo foi utilizado o extrator de Soxhlet, onde a amostra foi pesada em balança analítica e transferida para um cartucho tampado com algodão. O cartucho foi colocado em um extrator, encaixado em um balão volumétrico. Sobre o cartucho, foi vertido o solvente, responsável pela extração dos óleos. O condensador foi conectado e a manta de aquecimento ligada. O tempo de extração foi de 6 h após o início da ebulição. Após a amostra foi secada com a evaporação do solvente e novamente pesada (ZENE BON *et. al*, 2008).

5.8. PRODUÇÃO DA LIPASE

Para a produção da enzima, foi utilizado como substrato, o resíduo agroindustrial torta de crambe (TC), fornecidos pela Fundação MS- Mato Grosso do Sul, sem adição de indutores.

Foram determinadas as melhores condições de crescimento e de produção da enzima. Foram estudadas as seguintes variáveis: (1) granulometria do substrato; (2) umidade do substrato; (3) tempo do cultivo. Nestes estudos, as fermentações foram analisadas em termos de produção de atividade lipolítica, medida usando o método titulométrico (item 5.10.1) e expressa como Unidades por grama de sólido fermentado ($U\ gss^{-1}$).

5.8.1. Preparação dos Substratos

Nestes estudos utilizou-se um substrato com alto teor lipídico, a torta de crambe (*crambe abyssinica hochst*), fornecida pela Fundação MS- Mato Grosso do Sul. Este substrato foi previamente seco a 55-60 °C em estufa por 24 h. Depois de secos, os substratos foram moídos, tamisados e embalados em sacos plásticos, sendo utilizadas as frações da torta com granulometria entre 0,8 e 2,0 mm de diâmetro para os estudos de FES (Fernandes, 2007) .

5.8.2. Condições de Cultivo no Meio Sólido

Para avaliar a produção da enzima, utilizou-se como substrato a torta de crambe (*crambe abyssinica hochst*).

Os ensaios de FES foram realizados conforme metodologia descrita por Fernandes (2007). 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). O fungo foi incubado em estufa a 27°C por sete dias. Após o crescimento foi feita a maceração do meio através de pedras de porcelana e adição água estéril no material e solubilizado.

Para a FES foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL, contendo, 10 g de substrato torta de crambe (TC), com diferentes granulometrias (0,8 à 2,0 mm) e teores de umidade (50, 55 e 60%), utilizando-se tampão fosfato pH 7,0 (50 mM). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o preparo, os substratos foram inoculados assepticamente com o inóculo, variando-se a quantidade final no meio sólido. Em seguida, os sólidos foram incubados em estufa a 27°C durante 24, 48, 72, 96 e 120, 144 e 168 h. 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).

5.8.3. Secagem do Sólido Fermentado

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 48h à 30 °C, acondicionados em embalagens plásticas e armazenados em geladeira.

5.8.4. Efeito da Granulometria do Substrato

Foram estudadas três granulometrias diferentes da Torta do Crambe (TC), 10 mesh (2,0 mm), 20 mesh (0,8 mm) e 28 mesh (0,6 mm) utilizando-se da peneira de Tyler para fazer essa separação. O teor de umidade do substrato é de 7,35 % ($\pm 0,09$).

5.8.5. Efeito da Umidade

Foram estudadas três condições, 50%, 55 % e 60% de umidade inicial do substrato para a fermentação. Para tanto, colocou-se tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,0 para obter as umidades iniciais estudadas.

5.8.6. Otimização da FES através do Delineamento Fatorial

*5.8.6.1. Otimização da produção de lipases de *Penicillium sumatrense* utilizando planejamento experimental 2²*

Para otimizar a produção foi realizado um planejamento experimental 2², empregando as variáveis que influenciam na produção da enzima: granulometria do substrato e umidade. Todos os meios foram esterilizados em autoclave, e após atingir temperatura ambiente foram acrescidos de 10⁸ esporos g⁻¹ do inóculo. Os níveis das variáveis analisadas podem ser observados na Tabela 5. A variável resposta escolhida foi a atividade enzimática em U gss⁻¹ de cada meio fermentado. As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 7.0.

Tabela 5- Resultados experimentais do delineamento fatorial 2² aplicado no estudo da fermentação da torta de crambe, utilizando-se o sólido fermentado produzindo a lipase de *Penicillium sumatrense*.

Experimento	Granulometria (mesh)	Umidade (%)
1	28 (1)	50 (-1)
2	10 (-1)	50 (-1)
3	20 (0)	55 (0)
4	10 (-1)	60 (1)
5	28 (1)	60 (1)

Legenda: Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os experimentos foram realizados com diferentes combinações das variáveis independentes a fim de encontrar o melhor efeito desses fatores para a produção da lipase.

5.9. BIOCATALÍSE

Os estudos de síntese foram utilizados o sólido fermentado contendo a lipase por adição direta.

5.9.1. Adição Direta do Material Fermentado

Nestes experimentos, a enzima foi produzida por FES com a torta de Crambe (*Crambe abyssinica Hochst*) realizada nas melhores condições do planejamento, granulometria 28 mesh e umidade 60%.

5.9.1.1. Ensaios Prévios utilizando a enzima produzida com a torta de crambe

Foram realizados estudos cinéticos prévios para a verificação de síntese do oleato de etila. Foram testados como substratos o ácido oléico e o etanol (RM 1:3, 1:6 e 1:9). As reações foram realizadas utilizando-se 60,0 Unidades Enzimáticas (60,0 U), em n-heptano, nas temperaturas de 30, 37 e 44⁰C. As reações foram realizadas em Shaker, a 200 rpm e

acompanhadas durante 60 min. A conversão em éster foi avaliada pelo método de Lowry-Tinsley.

5.9.1.2. Reutilização do Material Fermentado

Estudou-se a possibilidade de reutilização do sólido fermentado para a síntese do oleato de etila. Para tanto, após a primeira utilização, a massa do biocatalisador foi recuperada por centrifugação por 10 min a 4000xg, lavada com n-heptano para eliminar todo o meio reacional e filtrada a vácuo. O biocatalisador reciclado foi então reutilizado para a esterificação do ácido oléico com etanol, em condições idênticas às anteriores. Esse procedimento foi repetido por 10 vezes utilizando a mesma amostra do biocatalisador. A cada vez que essa amostra foi reutilizada, ela foi pesada e o volume solvente e dos reagentes da reação foram corrigidos para um valor proporcional à quantidade do biocatalisador, visto que ocorreram pequenas perdas de massa do material no processo.

5.10. MÉTODOS ANALÍTICOS

5.10.1. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico

Neste método, utiliza-se o óleo de oliva como substrato para os ensaios de atividade frente à triacilgliceróis. Contudo, a determinação da atividade de lipases por titulometria é baseada no método proposto por Stuer *et al.* (1986), com modificações, segundo FERNANDES (2007). O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis.

O meio reacional para o substrato é previamente preparado na forma de emulsão. A emulsão é composta por solução de Tampão fosfato pH 7,0, goma arábica 10 % e pelo substrato óleo de oliva (1,0 mM). Os ácidos graxos liberados do substrato emulsificado pela ação da enzima à 37°C e pH 7,0 por 20 min, foram titulados com NaOH 50 mmol L⁻¹. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

5.10.2. Método de Lowry-Tinsley

Para a determinação da conversão de ácidos graxos em ésteres foi utilizado um método espectrométrico descrito por LOWRY-TINSLEY (1976).

Neste método, 0,2 mL do meio reacional são adicionados a 2,4 mL de tolueno e 0,5 mL da solução de piridina e acetato de cobre (5%). As reações foram agitadas em vórtex por 30 s e a fase orgânica separada para a leitura da absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 715 nm.

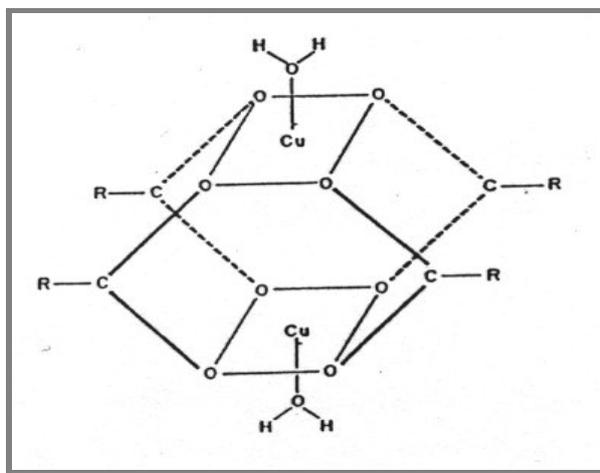


Figura 10. Complexo formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres (FERNANDES, 2007).

Este método espectrométrico (Lowry & Tinsley, 1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácidos graxos durante a síntese do oleato de etila. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres, solúveis em fase orgânica (Figura 10).

A conversão em éster foi calculada a partir do consumo do ácido graxo do meio reacional. A concentração de ácido graxo no meio foi relacionada à absorbância através da curva de calibração feita com ácido oléico (Dinâmica Química Contemporânea, 98 % de pureza) e nas mesmas condições do ensaio.

5.10.3. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As micrografias dos substratos (torta de crambe) antes e após a fermentação (pico máximo de produção de enzima), foram obtidas por um microscópio eletrônico de varredura (Tescan Vega 3) do LABCATPROBIO/UFPR/Campus Palotina. As amostras foram, anteriormente, cobertas com uma fina camada de ouro por um metalizado e depois fixadas em um suporte de amostra por meio de uma fita de carbono. Além das imagens, o equipamento contém um sistema de espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS) (Penta FET Precision - Oxford), que permite uma avaliação semi-quantitativa da composição química (RIBEIRO *et al.*, 2015).

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

As análises foram realizadas nos laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em Toledo-PR.

A torta de crambe (*Crambe abyssinica hochst*), fornecida pela Fundação MS, foi submetida á um processo de análise e avaliação das suas características físico químicas de acordo com os procedimentos descritos por ZENEBON *et al.* (2008).

Os procedimentos foram realizados em triplicata e os valores encontrados para o teor de cinzas determinado foi de 3,77% ($\pm 0,25$), porém quando comparados com valores em literatura de 6,80% encontrados por Souza *et al.*, 2009, é notável certa discrepância, que pode ter sido causado pela técnica empregada, pelo tempo de colheita, diversos tipos de semente ou pelas características das sementes utilizadas.

O teor de umidade foi novamente determinado em triplicata, obtendo um valor médio de 7,35% ($\pm 0,09$), estando em concordância com os valores de 8,8% encontrados por Souza *et al.*, 2009, estando dentro do erro do procedimento exposto pelo mesmo. Esse valor demonstrou uma umidade muito pequena do substrato puro, expondo a necessidade de adição de um volume considerável de água para atingir a umidade adequada.

Os valores do teor de óleo foram obtidos por procedimento em triplicata, obtendo o valor de 23,5% ($\pm 1,3$), semelhante ao encontrado por Tomasi *et al.*, 2014, em extração do tipo Soxhlet. Determinou-se também a acidez lipídica dos óleos presentes no substrato, atingindo o valor de 23,3%, valor este que representa a quantidade de ácidos graxos em relação à quantidade de ácidos graxos totais. A quantidade total de óleos presentes no substrato, enquanto fonte de carbono primária para o desenvolvimento fúngico permite o crescimento e produção de lipases sem que seja necessária a adição de indutores e óleos adicionais, como descrito por FERNANDES (2007).

Esses resultados demonstram que a torta de crambe (*Crambe abyssinica hochst*), sendo um resíduo da agroindústria, é um substrato viável, de baixo custo e de fácil obtenção para a produção de lipases fúngicas, logo tornando ótima opção para a fermentação e produção de enzimas.

Outras vantagens do uso de tortas agroindustriais é que o próprio material fermentado pode ser utilizado como suporte para a enzima, sendo empregado diretamente no meio

reacional, como será demonstrado em experimentos posteriores neste trabalho. Além disso, o crambe é uma oleaginosa que não é de uso alimentar, não podendo ser utilizada para ração animal devido à sua toxicidade por alto teor de ácido erúico e de glicosinolatos (CORADI, 2012).

6.2. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE *Penicillium sumatrense*

6.2.1. Ensaio preliminares

6.2.1.1. Produção de Lipases

Para verificar se a linhagem fúngica de *Penicillium sumatrense* estava produzindo lipase, ao longo deste trabalho, foram realizados testes sempre que foi realizada a FES, em duas etapas: a primeira em placas de Petri com meio em ágar contendo o corante Rodamina B e óleo de oliva e uma segunda etapa em meio líquido, acompanhando-se a atividade enzimática pelo método titulométrico (item 5.10.1).

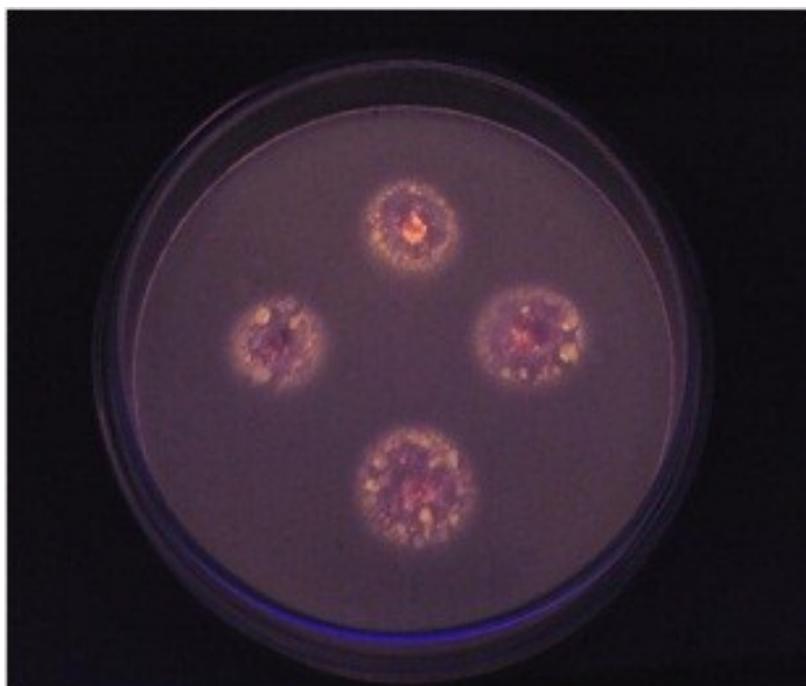


Figura 11. Imagem da câmara de UV. Produção de fluorescência do fungo *Penicillium sumatrense*.
(Fonte: Oliveira e Rodrigues, 2017).

A produção de lipase em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fosforescentes ao UV, após 72 h de incubação em estufa a 27⁰C (Figura 11). Após realizados estes testes preliminares, a linhagem fúngica foi utilizada para a produção de lipase por FES (OLIVEIRA, 2013).

6.3. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Penicillium sumatrense* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

6.3.1. Cinética de Produção da Enzima

Nos estudos prévios avaliou-se a cinética de produção de lipases de *Penicillium sumatrense*, utilizando-se a torta de crambe (TC) como substrato, durante 168 h de fermentação, a 27 °C, 60 % de umidade e granulometria do substrato de 20 mesh (0,8 mm). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores de atividade lipolítica foram obtidos pelo método titulométrico. Os resultados são apresentados na Figura 12.

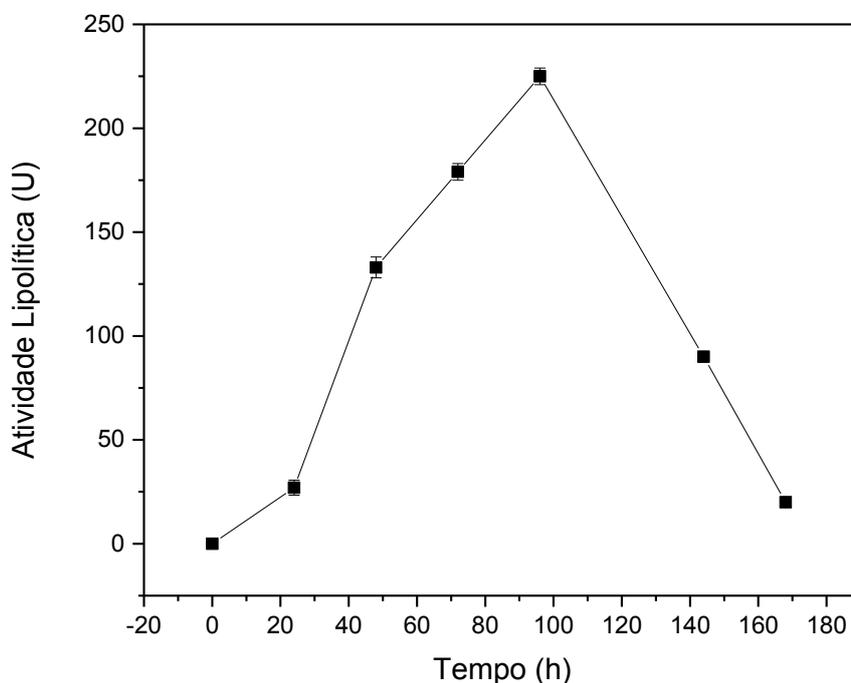


Figura 12. Cinética de produção de lipase fúngica de *Penicillium sumatrense* por fermentação no estado sólido. Os ensaios foram realizados com umidade de 60 %. Experimentos realizados em triplicata com temperatura de 27°C.

Os resultados mostraram que inicialmente houve um aumento de atividade lipolítica com o tempo de fermentação (Figura 12), devido ao maior crescimento do microrganismo por maior disponibilidade de substrato. A maior atividade lipolítica (225,0 U ou 22,50 U gss⁻¹) foi obtida após 96 h de fermentação.

Após o tempo de 96 h, nota-se uma diminuição dos valores de atividade lipolítica, provavelmente devido à diminuição da fonte de carbono dos óleos presentes no substrato (23,5%).

Analisando-se o teor dos óleos presentes no substrato, segundo ZENEBAON *et.al.*(2008), verificou-se que no início da fermentação o valor era de 23,5 % e após 96 h de fermentação o valor reduziu para 18,2 %.

A queda na atividade lipolítica ocorre porque o fungo começa a produzir proteases para processar as outras fontes de carbono menos abundantes. Essas proteases são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas presentes em proteínas e outras enzimas, desnaturando e diminuindo a concentração de lipases. (OLIVEIRA, 2013)

6.3.2. Otimização de Produção de lipases por delineamento fatorial

Após os testes preliminares da cinética de produção de lipases, foi realizado um delineamento fatorial, para otimizar a produção de lipase.

Os níveis propostos para este planejamento fatorial 2² foram baseados em ensaios previamente realizados. Para este experimento foi assumido o valor de *p* igual a 0,05, que indica a probabilidade de o 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 10.

Foi utilizado um método de regressão não linear para ajustar um polinômio de segunda ordem utilizando-se os dados experimentais. Isto permitiu identificar os termos relevantes do modelo.

Os resultados experimentais do delineamento fatorial 2² aplicado no estudo da FES podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados experimentais do delineamento fatorial 2^2 aplicado no estudo da fermentação da torta de crambe, utilizando-se o sólido fermentado produzindo a lipase de *Penicillium sumatrense*.

Experimento	Granulometria (Mesh)	Umidade (%)	Unidades Totais (U)
1	28 (1)	50 (-1)	107,87 ($\pm 0,05$)
2	10 (-1)	50 (-1)	103,00 ($\pm 0,45$)
3	20 (0)	55 (0)	136,75 ($\pm 0,10$)
4	10 (-1)	60 (1)	101,75 ($\pm 0,20$)
5	28 (1)	60 (1)	243,00 ($\pm 0,45$)

Legenda: Os experimentos foram realizados em duplicata.

Com intuito de avaliar o efeito das condições operacionais investigadas foi utilizado o gráfico de Pareto, o qual é apresentado na Figura 13. Este gráfico permite observar que a um nível de significância de 5%, as duas variáveis (umidade e granulometria) foram estatisticamente significativa, e também as interações entre elas, dentro dos níveis avaliados. Além disto, o gráfico de Pareto indica que maiores valores de atividade enzimática podem ser obtidos nos maiores valores de umidade e granulometria do substrato.

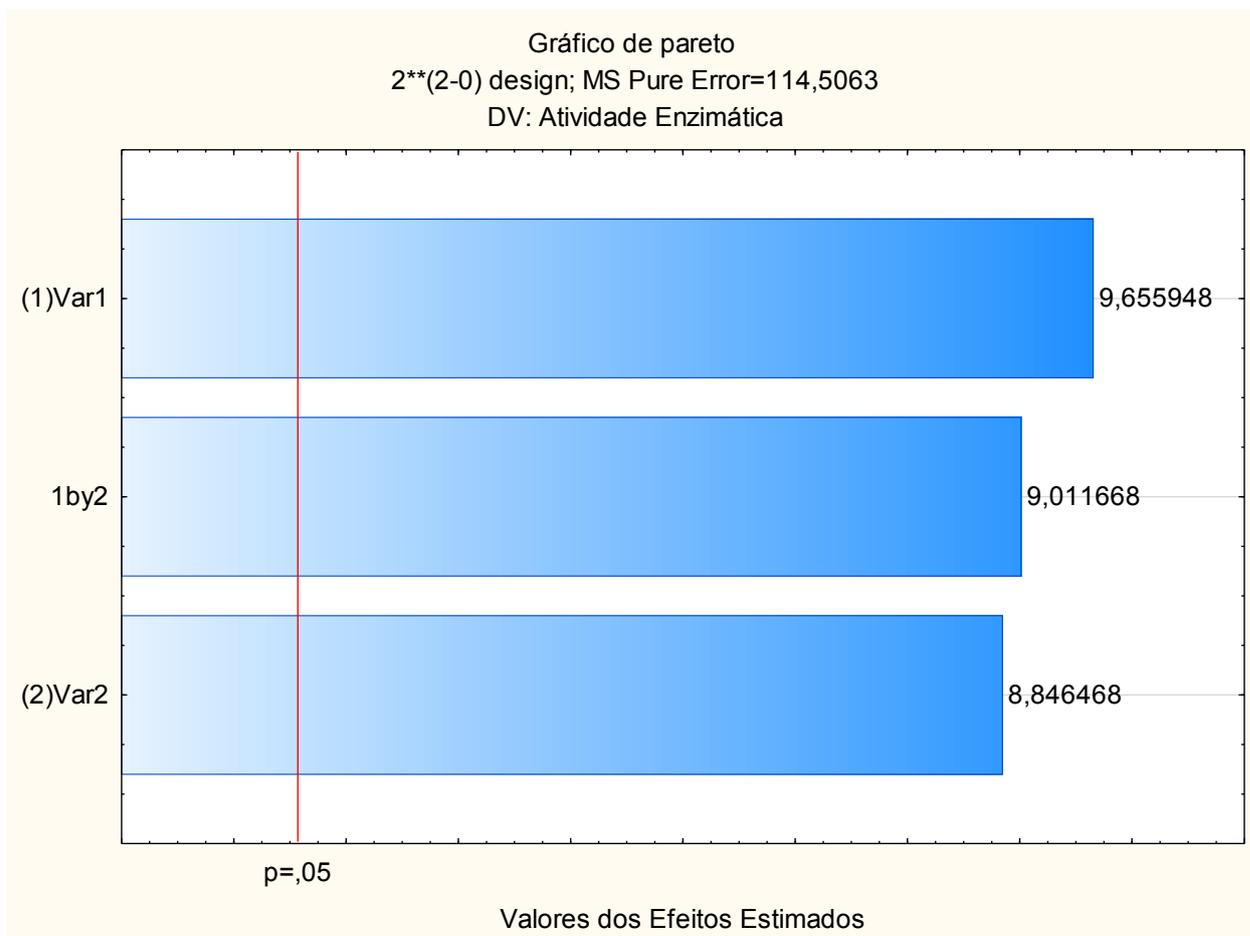


Figura 13. Gráfico de pareto na interação dos efeitos das variáveis na atividade enzimática, com um intervalo de 95% de confiança.

Analisando-se a Figura 13, verifica-se que valores de p menores que 0,05 sugerem termos de modelos significativos. A qualidade do ajuste do modelo foi verificada por determinação do coeficiente (R). O valor R varia entre 0 a 1,0 e o valor R perto de 1,0 implica uma ótima precisão do modelo. Analisando-se os resultados obtidos quando comparados com o valor escolhido para p observou-se que o modelo é significativo. O valor R elevado (0,99965) sugere boa correlação entre os valores experimentais e previstos. O modelo é válido para o intervalo de confiança de 95%, pois os altos valores de F obtidos (Tabela 7) nos dão uma proporção maior do que 4,0 o que nos permite afirmar que a equação da reta é adequada para descrever os dados (Haaland, 1989).

De acordo com Box & Wetz (1973) para uma regressão ser considerada significativa é sugerido que o valor de F_{cal} seja de 4 a 5 vezes maior que o valor de F_{tab} . Neste trabalho o valor de F_{cal} obtido foi de 99,7865 e o F_{tab} é 4,7570 mostrando uma significância para regressão, pois o valor foi de 20,97 vezes maior que o valor de F_{tab} .

A significância estatística da equação polinomial foi verificada pelo teste F. A análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático é dada na Tabela 7.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de atividade enzimática obtida pelo fungo *Penicillium sumatrense*.

Variáveis	SS	Df	F	P
Granulometria (Mesh)	10676,26	1	93,23734	0,000202
Umidade (%)	8961,26	1	78,25999	0,000307
Umidade X Granulometria	9299,07	1	81,21016	0,000281

Legenda: $R^2 = 0,99965$

Analisando-se a Tabela 7, verifica-se que as variáveis de efeito linear (Umidade e Granulometria) foram significativas. Isto sugere que os dois parâmetros influenciaram na produção de lipase por fermentação em estado sólido (FES) a partir do fungo *Penicillium sumatrense*.

Os experimentos foram realizados com diferentes combinações das variáveis independentes a fim de se encontrar o melhor efeito desses fatores para a produção da lipase. O modelo encontrado é expresso pela equação 1, que representa a atividade enzimática (Y) como uma função da granulometria do grão da torta de Crambe (X_1) e da umidade da fermentação (X_2).

$$Y: 138,47 + 36,53X_1 + 33,46X_2 + 34,09 X_1 X_2 \quad (1)$$

Os valores obtidos das atividades enzimáticas observadas e previstas pelo modelo são apresentados na Figura 14 e sugerem uma correlação satisfatória entre valores experimentais e previstos. Nota-se que os pontos observados e preditos não se distanciam muito da reta identidade, deste modo, torna-se possível afirmar que o modelo segue uma distribuição normal observando que há um bom ajuste. Além do mais, o modelo apresenta a distribuição

do erro de forma aleatória, fato que elimina a existência de erros sistemáticos ou de que a análise seja tendenciosa, o que atribui uma maior confiabilidade ao modelo.

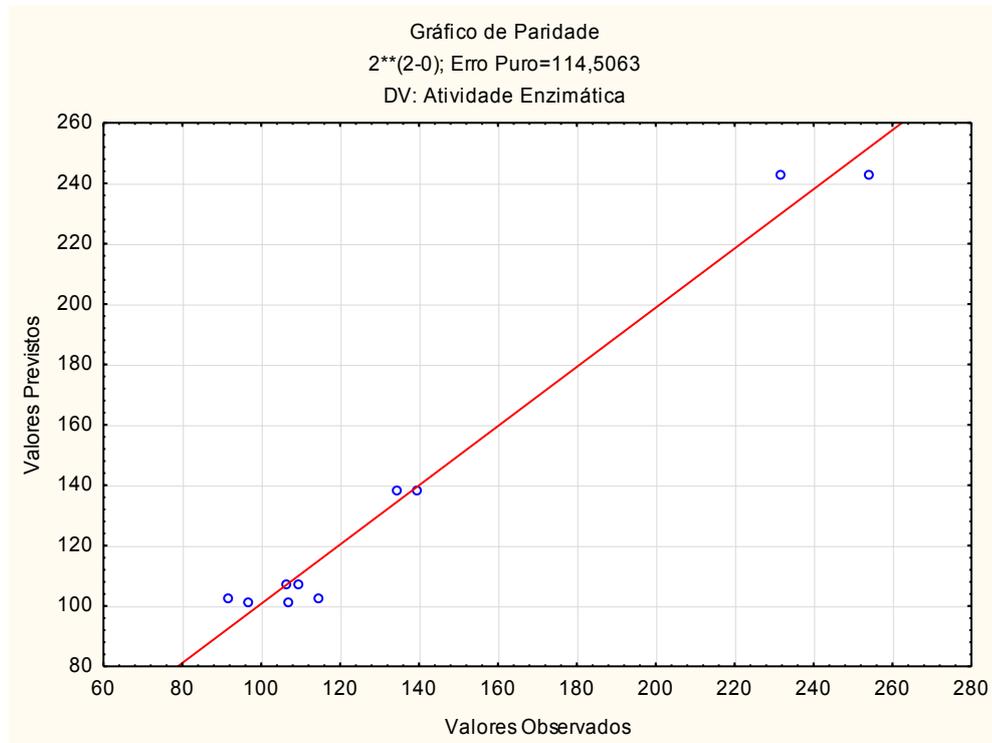


Figura 14. Gráfico de paridade para mostrar a distribuição dos observados e os valores previstos para produção de lipase.

As superfícies de respostas são mostradas na Figura 15 e pode-se concluir que o processo de produção da enzima é altamente influenciado pelo efeito combinado da granulometria e da umidade do meio fermentativo.

Com o auxílio do software Statistica 10 foi possível determinar os valores ótimos dos parâmetros, que foram: granulometria da torta do Crambe em 2,8 mesh e umidade do meio fermentativo em 60%, no qual podemos notar que com o aumento da granulometria e umidade há uma maior produção da enzima lipase.

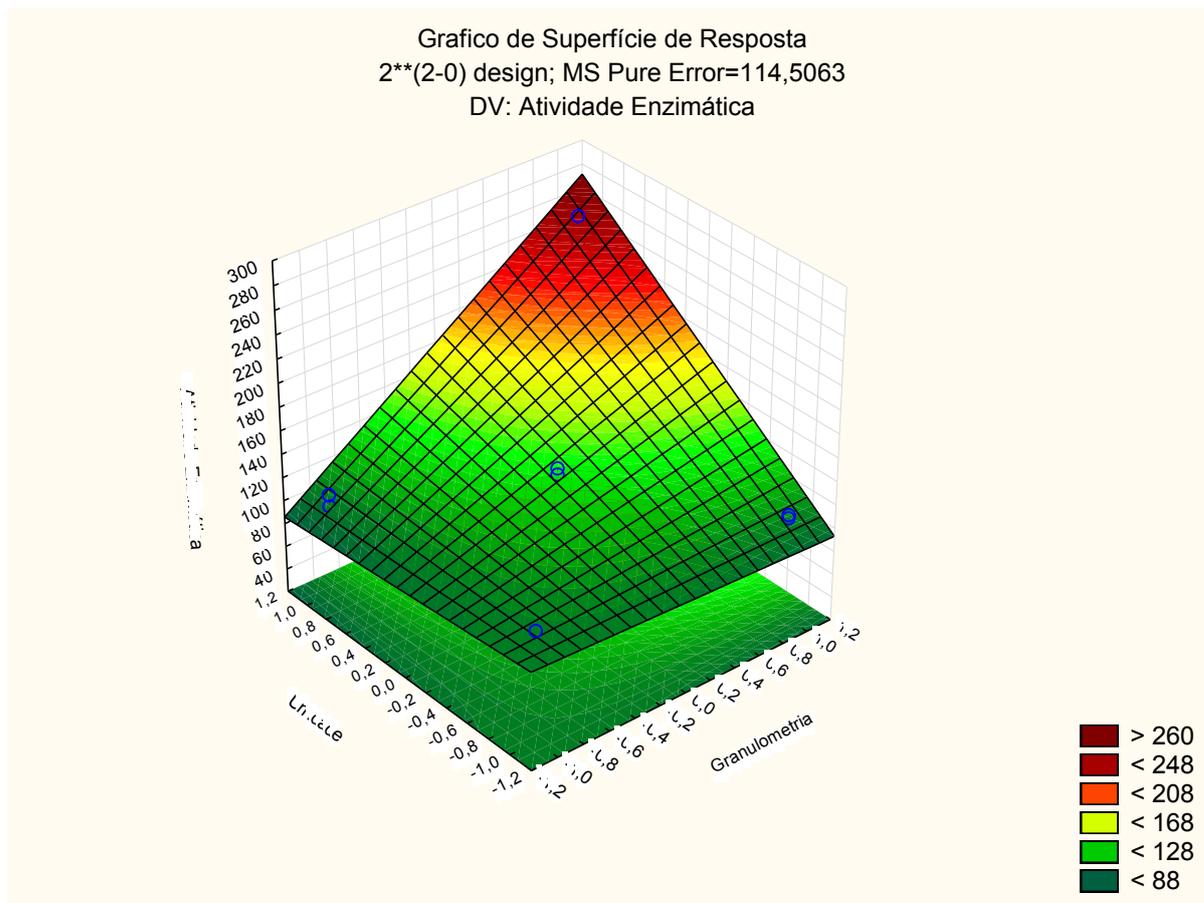


Figura 15. Gráfico de superfícies de resposta que apresenta a interação entre as variáveis Granulometria e Umidade para a produção de lipase.

A fermentação no estado sólido apresenta uma série de vantagens para o cultivo de fungos, pois além de fornecer os nutrientes para o desenvolvimento microbiano ainda apresenta um ambiente ideal para o crescimento. O ambiente sólido e úmido favorece o crescimento micelial, pois os fungos geralmente necessitam de uma superfície a qual possam se aderir (BARRIOS- GONZÁLES, 2012).

Um parâmetro importante para o crescimento e atividade microbiana no substrato é o tamanho das partículas (granulometria). Normalmente partículas menores fornecem uma grande superfície de contato com o microrganismo, mas resulta num baixo crescimento dos fungos. Em contrapartida, partículas maiores fornecem melhor aeração, troca gasosa e dissipação do calor, mas limitam a superfície de contato para o microrganismo. Portanto, a granulometria do substrato deve ser selecionada de acordo com cada processo em particular (PANDEY *et al.*, 1999).

Analisando-se o gráfico de superfícies de resposta, verifica-se que a condição ótima para a granulometria foi de 28 mesh (0,6 mm).

Entre todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES em virtude do elevado grau de interação com os componentes sólidos, sendo que não há líquido livre no sistema (PANDEY *et al.*, 1999).

O teor de umidade pode influenciar o estado físico do substrato, a disponibilidade e a difusão de nutrientes e a troca de oxigênio e de CO₂ no meio. O elevado teor de umidade inicial pode afetar o crescimento do microrganismo, pois a porosidade do meio e a difusão de oxigênio são reduzidas, dificultando a formação do produto. Por outro lado, em baixos teores de umidade inicial, a produção enzimática também pode ser reduzida porque o fungo sofre modificações na membrana celular, conduzindo a limitações de transporte e afetando o metabolismo microbiano.

Analisando-se a Figura 15, verifica-se que não obtemos as condições ótimas para a umidade, mas dentro das limitações do teor de umidade na FES (50 e 65 %), os resultados obtidos foram ótimos.

Quando a fermentação é conduzida com um alto índice de água livre, com uma umidade superior a 70%, permitindo que o fungo desenvolva suas estruturas orgânicas no interior da matriz de particulados do substrato, a fermentação será dita como submersa (BINOD *et al.*, 2015). Caso a fermentação ocorra com um índice reduzido de água livre no substrato, umidade inferior a 65%, fazendo com que o fungo se desenvolva sobre o material, sem adentrar completamente os poros nos sólidos, a fermentação será caracterizada como fermentação em estado sólido (BINOD *et al.*, 2015).

Portanto, o importante é trabalhar com uma umidade que mantenha o equilíbrio entre a disponibilidade de água, expansão do substrato e efeitos de difusão do oxigênio.

6.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VAREDA (MEV)

A fim de permitir uma visualização e maior compreensão da ação das enzimas do complexo enzimático, foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) o substrato antes e após a fermentação em estado sólido (Figura 16).

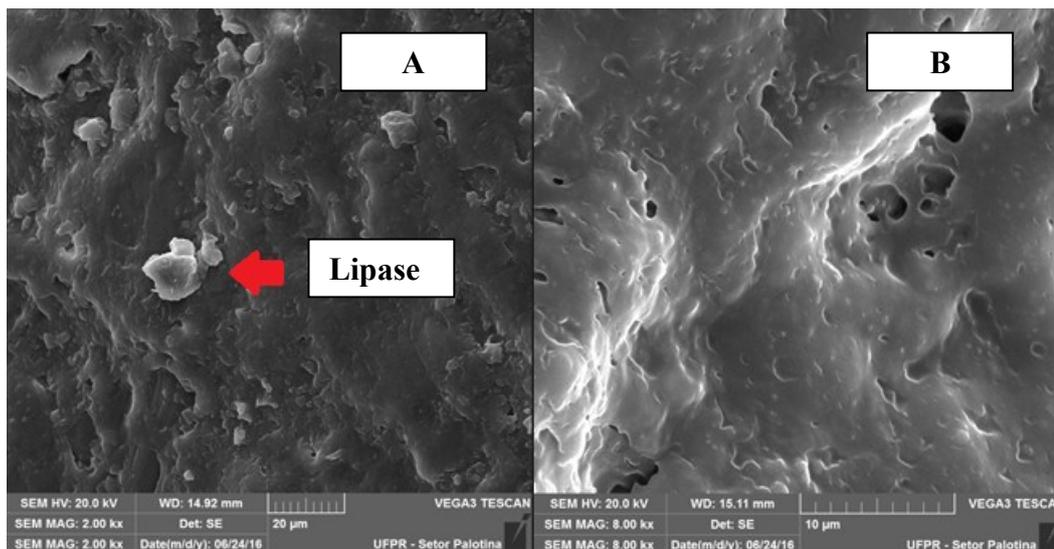


Figura 16. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) do substrato após a fermentação (A) e antes da fermentação (B).

Analisando-se a Figura 16, podemos verificar que o substrato antes da fermentação se mantém mais íntegro e homogêneo, e após a fermentação observa-se a lipase ligada na superfície do substrato. O resultado da análise em microscopia eletrônica mostrou uma importante mudança na morfologia ultraestrutural da torta de crambe após a fermentação, resultado semelhante esse obtido também por Ferraz (2006) e Castilho (2016) que estudaram a morfologia de diferentes tortas após a fermentação em estado sólido.

6.5. BIOCATÁLISE: ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Os estudos de síntese foram constituídos de duas partes, inicialmente foi utilizado o sólido fermentado (adição direta) e, a seguir realizaram-se os estudos de ciclos (reutilizações) do biocatalizador.

6.5.1. Adição Direta do Material Fermentado

Nesta etapa do trabalho, escolheu-se a torta de crambe (TC) como substrato para produção de lipases, que resultou numa maior atividade enzimática, para iniciar os estudos sobre a síntese do éster. Este substrato foi escolhido porque era importante demonstrar a possibilidade de utilização de um subproduto industrial em biocatálise.

6.5.1.2. Ensaios Prévios utilizando a Enzima Produzida com a Torta de Crambe

A torta de crambe (TC) contendo 60 % de umidade e granulometria 28 mesh (0,6mm) foi fermentada a 27⁰C durante 96 h e em seguida seca em estufa. Determinou-se a atividade lipolítica do sólido fermentado obtido que foi de 24,30 U gss⁻¹ (243,0 U).

O oleato de etila, estudado neste trabalho, pode ser utilizado como aditivo biológico, plastificante do policloreto de vinila (PVC), agente resistente à água e como fluido hidráulico.

Em todas as reações de síntese do oleato de etila foram realizados sempre dois controles negativos, um com a TC não fermentada e outro com a TC fermentada e autoclavada após a fermentação. O objetivo desta análise era comprovar a atividade catalítica da reação de síntese do oleato de etila pela lipase fúngica. Como o método utilizado (Lowry-Tinsley, ítem 5.10.2) dosa ácidos graxos livres do meio reacional, o seu consumo poderia ser causado por adsorção do substrato na superfície do sólido.

Ensaios prévios utilizando-se 60,0 unidades enzimáticas (U) do sólido fermentado (24,30 U gss⁻¹), em n-heptano, a 37⁰C, com uma razão molar 1:3 (ácido/álcool), mostraram que a enzima apresentou forte atividade catalítica na síntese do oleato de etila, após 30 min de reação (Tabela 8) e Figura 16, com a conversão em éster (100 %) obtida a 37⁰C, tendo em vista que no controle negativo não houve diminuição do ácido graxo no meio reacional.

Tabela 8- Resultados experimentais dos estudos prévios da síntese do éster oleato de etila utilizando a torta de crambe fermentada com *Penicillium sumatense*.

Experimento	Temperatura (⁰C)	RM Ácido: álcool	Conversão em éster 30 min. (%)
1	37	1:3	100
2	37	1:3	100
3	37	1:3	100

Legenda: RM - Razão Molar. Experimentos realizados em triplicata

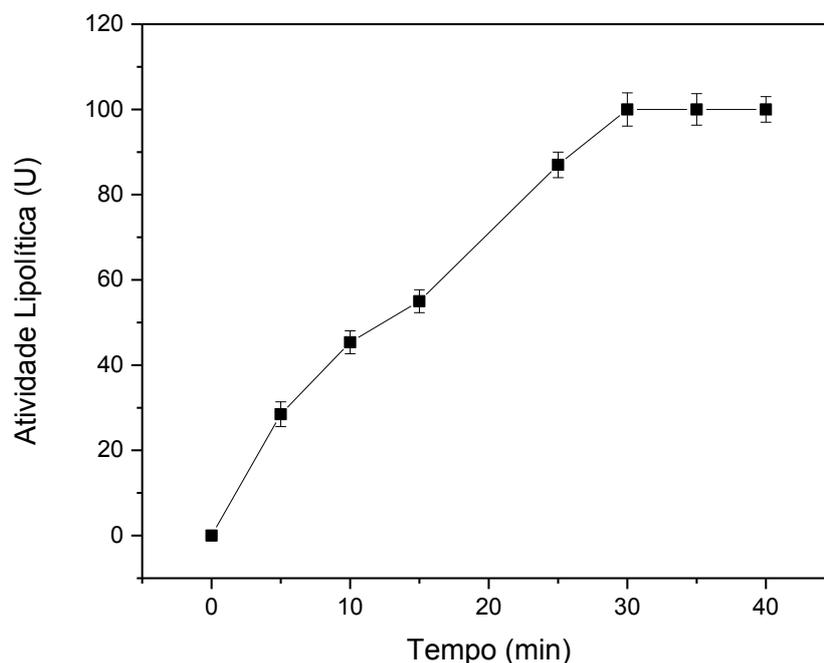


Figura 17. Variação na conversão do oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, contendo a lipase de *Penicillium sumatrense* produzida por FES. Os ensaios foram realizados a 37 °C em 50,0 mL de n-heptano, com razão molar 1:3 (ácido:álcool) e quantidade de sólido suficiente para obter uma atividade lipolítica de 60,0 U.

Analisando-se a Figura 17, verifica-se que a reação atinge o equilíbrio químico após 30 min de reação.

Após realizados os ensaios prévios de síntese do oleato de etila, iniciaram-se os estudos para determinar o efeito da razão molar e da temperatura na reação de conversão em oleato de etila.

6.5.1.3. Estudo da influência da temperatura na Síntese do Oleato de Etila

O objetivo destes experimentos foi avaliar o efeito da temperatura e razão molar na síntese do oleato de etila. Os ensaios foram realizados variando-se as temperaturas em 30, 37 e 43 °C. Em todos os experimentos foram utilizados 60,0 U do material fermentado, adicionados ao meio reacional (Tabela 9).

Tabela 9- Resultados experimentais dos estudos de otimização da temperatura na síntese do éster oleato de etila utilizando a torta de crambe fermentada com *Penicillium sumatense*.

Experimento	Temperatura (⁰ C)	RM Ácido: álcool	Conversão em éster 30 min. (%)
1	30	1:3	84,99 (± 1,72)
2	37	1:3	100,0 (± 2,70)
3	43	1:3	51,65 (± 1,30)

Legenda: RM - Razão Molar. Experimentos realizados em triplicata

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 9, verifica-se que enzima apresentou atividade catalítica na síntese do oleato de etila, após 30 min de reação, com a máxima conversão em éster (100 %) obtida a 37⁰C. Com relação ao controle negativo, verificou-se que não houve diminuição do ácido graxo no meio reacional.

A Figura 18 demonstra os resultados da cinética de síntese do oleato de etila, utilizando-se a lipase de *Penicillium sumatrense*. As reações foram realizadas em três temperaturas diferentes: 30, 37 e 43 ⁰C.

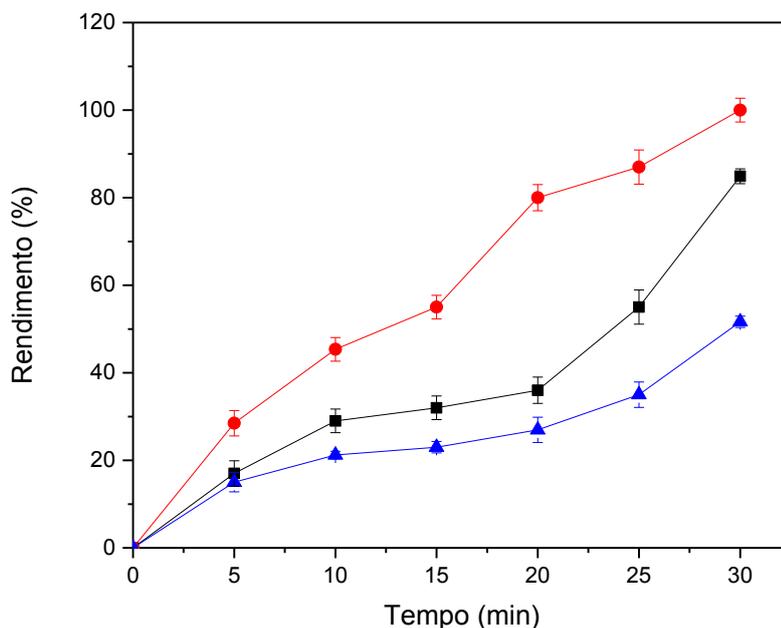


Figura 18. Variação na conversão do oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, contendo a lipase de *Penicillium sumatrense* produzida por FES. Os ensaios foram realizados a 30°C (-■-), 37 °C (-●-) e 43°C(-▲-), em 50,0 mL de n-heptano, com razão molar 1:3 (ácido:álcool) e quantidade de sólido suficiente para obter uma atividade lipolítica de 60,0 U.

O efeito da temperatura na velocidade da reação de síntese do oleato de etila foi estudado na faixa de 30°C a 43°C. As condições reacionais utilizadas foram otimizadas anteriormente (Figura 18). A conversão máxima em éster alcançada (100%) foi para 37°C, com uma conversão em éster de 100%. Entretanto, a elevação da temperatura para 43°C causa um significativo decréscimo da conversão (50%, 30 min). Provavelmente a estabilidade da lipase aqui utilizada tem um importante papel nestes resultados (OLIVEIRA, 2013).

A temperatura ideal para a atividade enzimática está relacionada com dois fenômenos: o aumento do número de choques entre as moléculas, que causa um aumento da velocidade, e a desnaturação da enzima pela temperatura, que leva a uma menor velocidade de reação, sendo assim a produtividade e a eficiência da conversão também pode ser melhorada (AL-ZUHAIR *et al.*, 2007; NOUREDDINI *et al.*, 2005; FUKUDA *et al.*, 2001; MACRAE, 1983). Alguns estudos indicam que a estabilidade térmica de lipases imobilizadas é maior do que da enzima livre porque o suporte evita a mudança da conformação da enzima em altas temperaturas (KIM *et al.*, 2006).

Yigitoglu & Temoçin (2010) verificaram o efeito da temperatura na atividade da lipase de *Candida rugosa* na forma livre e imobilizada (fibras de polietileno) e verificaram que após 180 min na temperatura de 50°C houve maior estabilidade por parte da enzima imobilizada que manteve com 54% da atividade de hidrólise, enquanto que a enzima na forma livre manteve apenas 30% da atividade residual. Segundo os autores, o aumento da estabilidade térmica foi uma das vantagens das enzimas imobilizadas.

Ozyilmaz e Gezer (2010) relataram que o equilíbrio da reação depende das propriedades termodinâmicas dos substratos. Estas propriedades dependem do comprimento de cadeia dos substratos, solvente utilizado, e principalmente da temperatura, que tem uma enorme influência sobre o estado físico dos substratos tais como ionização, solubilidade e viscosidade do meio, entre outros (MADALOZZO, 2012).

Portanto, a temperatura pode influenciar no rendimento, dependendo dos substratos utilizados, e em geral, as temperaturas ótimas, para conversão em éster em reações de esterificação estão na faixa entre 30°C e 55° C. LIU *et al.* (2010) estudaram a síntese do éster laurato de laurila e obtiveram uma temperatura ótima de 45°C utilizando a enzima da *Pseudomonas aeruginosa* e Varma & Madras (2010) reportaram que a faixa de temperatura ótima obtida foi de 50-55°C para a síntese do propionato de isopropila.

Dessa forma, como uma das vantagens da catálise enzimática em relação aos catalisadores químicos é a possibilidade de se trabalhar em temperaturas mais baixas, e a fim de se evitar a desnaturação da lipase pelo aumento da temperatura, optou-se em estudar o efeito da razão molar álcool:ácido na conversão em éster, em temperaturas inferiores a 45°C.

6.5.1.4. Estudo da influência da Razão Molar na Síntese do Oleato de Etila

Após obter os melhores resultados de conversão em éster, fixou-se a temperatura ótima em 37 °C e variou-se a razão molar em 1:3, 1:6 e 1:9 (ácido/álcool). Em todos os experimentos foram utilizados 60,0 U do material fermentado, adicionados ao meio reacional (Tabela 10).

Tabela 10- Resultados experimentais dos estudos de otimização da Razão Molar na síntese do éster oleato de etila utilizando a torta de crambe fermentada com *Penicillium sumatense*.

Experimento	Temperatura (°C)	RM ^a Ácido: álcool	Conversão em éster 30 min. (%)
1	37	1:3	100
2	37	1:6	100
3	37	1:9	100

Legenda: RM - Razão Molar. Experimentos realizados em triplicata

A Figura 19 demonstra os resultados da cinética de síntese do oleato de etila, utilizando-se a lipase de *Penicillium sumatrense*. As reações foram realizadas em três razões molares diferentes: 1:3; 1:6; 1:9.

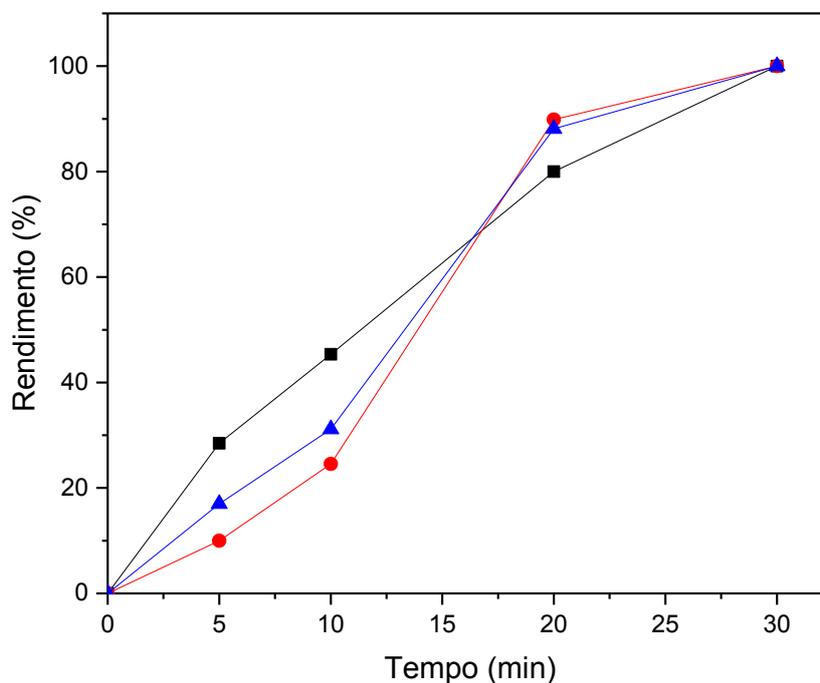


Figura 19. Variação na conversão do oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, contendo a lipase de *Penicillium sumatrense* produzida por FES. Os ensaios foram realizados a 37 °C; RM (ácido:álcool) 1:3 (-■-), RM 1:6 (-●-) e RM 1:9 (-▲-) , em 50,0 mL de n-heptano, e quantidade de sólido suficiente para obter uma atividade lipolítica de 60,0 U.

O efeito da razão molar dos substratos na reação de síntese também foi estudado, tendo em vista que maiores concentrações de um dos substratos são utilizadas para provocar o deslocamento do equilíbrio termodinâmico da reação na direção da síntese (SINGH & SINGH, 2010). Quando há quantidades estequiométricas dos reagentes, a reação tende a entrar em equilíbrio com baixas conversões do produto. Normalmente, o excesso de álcool é usado para deslocar o equilíbrio em função da formação do produto (AKOH *et al.*, 2007; MA & HANNA, 1999).

As razões molares de ácido oleico:etanol estudadas foram 1:3; 1:6 e 1:9. Conforme apresentado na Figura 19, a razão molar (RM) não afetou a cinética da síntese, pois utilizando-se as três razões molares diferentes, obtivemos o mesmo valor de conversão em éster (100% de conversão, 30 min).

Estes ensaios demonstraram que a máxima conversão em éster (100 % \pm) foi obtida com as três razões molares (ácido/álcool) estudadas.

Singh & Singh (2010) observaram que o excesso de etanol 9 vezes superior que a do ácido oleico, RM 1:9 (ácido:etanol), houve uma menor conversão em éster no mesmo intervalo de tempo (54%). Isto pode ser explicado pela ação prejudicial do etanol à enzima de *Pseudomonas sp.*, (YU *et al.*, 2007; STRAATHOF & ADLERCEUTZ, 2000). Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores em reações de esterificação utilizando a lipase de *R. oryzae* (TALUKDER *et al.*, 2010; KARRA-CHAABOUNI *et al.*, 2008; SALAH *et al.*, 2007; GHAMGUI *et al.*, 2007).

Fernandes (2007) e Fernandes *et al.* (2007) realizaram estudos com a torta de milho e farelo da semente do girassol como substrato para produção de lipases, com *Burkholderia cepacia*. Nesses ensaios foram utilizadas 60 unidades enzimáticas (U) do material fermentado (110 U gss⁻¹), em n-heptano, a 37 °C, com uma razão molar 1:5 (ácido/álcool). Os autores verificaram que apesar do rendimento da síntese do oleato de etila utilizando farelo da semente do girassol ser menor (76,4 % \pm 2,9) do que com a utilização da torta de milho (94 % \pm 2), o tempo necessário para atingir o equilíbrio foi menor com o farelo da semente do girassol (8 h), quando comparado com a torta de milho (18 h).

Os resultados citados na literatura sobre síntese de ésteres em meio orgânico utilizando lipases são distintos, a maioria com tempos de reação superiores aos obtidos neste estudo. Porém algumas pesquisas retrataram tempos de reação bastante reduzidos. Fernandes *et al.* (2004) estudaram a síntese do laurato de etila (30 °C) em um sistema de micelas reversas (isooctano), utilizando uma lipase de *Thermomyces lanuginosa* e obtiveram um rendimento de

92 % após 1 h de reação. Baron *et al.* (2005) realizaram um estudo comparativo de síntese do oleato de n-butila (utilizando uma lipase de *Penicillium coryophilum*) em dois sistemas (37⁰C): sistemas macro-heterogêneos (enzima liofilizada e imobilizada) e micro-heterogêneos (sistema de micelas reversas). Na síntese utilizando a preparação enzimática liofilizada, obtiveram um rendimento de 100 % após 48 h de reação. Já com a enzima imobilizada o rendimento foi menor, sendo de apenas 9 % após 9 h de reação.

Os resultados apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10 demonstraram que a enzima tem excelente atividade catalítica e na síntese do oleato de etila, após 30 min de reação, nas três temperaturas estudadas (30, 37 e 43 ⁰C) e nas três RM ácido\álcool (1:3; 1:6; 1:9), com a conversão em éster máxima (100 %) obtida a 37⁰C, tendo em vista que no controle negativo não houve diminuição do ácido graxo no meio reacional.

6.5.1.5. Reutilização do Material Fermentado

Estudou-se a possibilidade de reutilização do sólido fermentado para a síntese do oleato de etila. Para tanto, o sólido seco em estufa (30 ⁰C) foi sucessivamente utilizado na síntese do éster, lavado com n-heptano, filtrado e reutilizado na mesma reação. Esse procedimento foi repetido por 10 vezes em um período de 30 dias utilizando a mesma amostra do biocatalisador. A cada vez que essa amostra foi reutilizada, ela foi pesada e o volume solvente e dos reagentes da reação foram corrigidos para um valor proporcional à quantidade do biocatalisador, visto que ocorrem pequenas perdas do material no processo de recuperação. Nos intervalos das reações o sólido foi mantido a 4^oC.

O sólido fermentado foi utilizado por 10 vezes para essa reação (Figura 20), mantendo o rendimento de 91% até o quinto reciclo, e somente na 6^a utilização atingiu seu tempo de meia vida, isto é, 50% da sua atividade original. No décimo reciclo a conversão em éster foi de apenas 12 %.

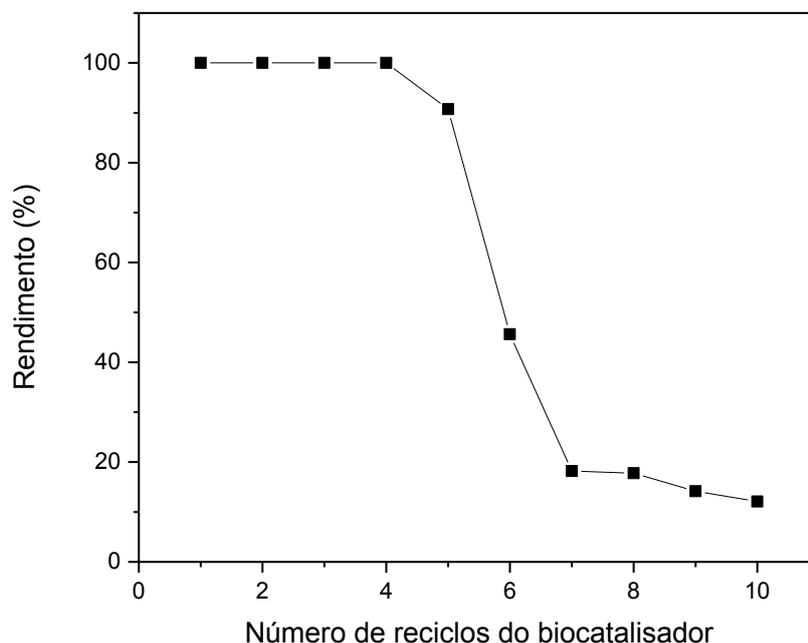


Figura 20. Variação na conversão do oleato de etila em função do número de utilizações do biocatalisador da mesma amostra do sólido fermentado contendo a lipase de *Penicillium sumatrense*. Condições: 50,0 mL de n-heptano, 60,0 Unidades Totais, U e RM (ácido:álcool) 1:3, 37°C.

Oliveira (2013) estudou a reutilização do sólido fermentado contendo lipases de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*. O autor verificou que os sólidos fermentados mantiveram atividade residual integral nos 4 ciclos iniciais, e a partir do quinto ciclo as enzimas começaram a apresentar um decaimento da atividade inicial. A lipase de *P. sumatrense* apresentou declínio mais acentuado de atividade, apresentando meia-vida no oitavo ciclo, e não apresentando atividade residual a partir da décima primeira reutilização. A lipase de *A. fumigatus* apresentou meia vida a partir da décima terceira reutilização, e ainda no décimo quinto ciclo apresentou 28% de atividade residual.

A comparação com outros trabalhos que utilizaram lipases produzidas por microrganismos mostra que os resultados obtidos no presente trabalho são melhores do que a maioria reportada na literatura, em termos de rendimento, tempo necessário para obtenção do rendimento máximo. Com relação ao número de reutilizações, foram encontrados resultados superiores a este trabalho.

Poucos estudos descrevem a aplicação direta do sólido fermentado, em um deles Fernandes (2007) e Fernandes *et al.* (2007) aplicaram o sólido fermentado de *Burkholderia cepacia* na síntese do oleato de etila, fazendo sua reutilização em 14 ciclos e observou o

tempo de meia vida apenas na décima quarta reutilização. O sólido fermentado atua como suporte para a enzima, fornecendo proteção à proteína e possibilitando sua reutilização.

Salum *et al.* (2008) estudaram a lipase de *Burkholderia cepacia* produzida por FS e imobilizada no suporte hidrofóbico Accurel. Neste caso, foram obtidos 100% de conversão em éster e a enzima imobilizada pode ser utilizada por 11 vezes sem perda de atividade; o tempo de meia vida foi atingido após 24 vezes de reutilização.

Tran *et al.* (2012) imobilizaram lipases em nanocompósitos magnéticos, submetendo a enzima a 6 ciclos e seu tempo de meia-vida foi observada no quarto ciclo. Xie & Wang (2012) imobilizaram lipases em suportes magnéticos de quitosana para aplicação na transesterificação do óleo de soja e a meia-vida das enzimas imobilizadas por ligação covalente foi de apenas 5 ciclos.

Ghamgui *et al.* (2006) estudaram a reutilização da lipase de *Staphylococcus simulans* imobilizada em CaCO₃. A porcentagem de conversão do éster foi estável até 4 reutilizações e a enzima apresentou 50% de sua atividade inicial após ser utilizada por 7 vezes.

A imobilização é um método interessante economicamente por possibilitar a reutilização do biocatalisador, porém o que geralmente observa-se após a imobilização é certa perda de atividade e mudanças nas propriedades cinéticas do catalisador, além de aumentar uma etapa no processo de obtenção destes (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2012). A utilização do sólido fermentado além de representar uma diminuição no número de etapas da obtenção do biocatalisador, apresenta significativa redução de custos e boa manutenção da atividade inicial.

7. CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos do presente trabalho permitiram concluir que:

(1) Na produção da lipase de *Penicillium sumatrense* por FES

- Na FES foram avaliados os efeitos da umidade e granulometria através de um delineamento fatorial 2^2 .
- As melhores condições de fermentação foram 60 % de umidade, granulometria do substrato de 28 mesh (0,6 mm) e 27°C, para o substrato torta de crambe (243,0 U).

(2) Nos estudos de Biocatálise

(i) Por adição direta do sólido fermentado:

- Mostrou-se viável na síntese do oleto de etila por adição do sólido fermentado ao meio reacional, com o substrato de fermentação torta de crambe.
- As melhores condições para a produção do éster foram 37°C, RM 1:3, 60 Unidades de atividade lipolítica adicionada, com conversão em éster de 100% em 30 min de reação.
- O sólido fermentado foi utilizado por 10 vezes, sendo que ocorreu perda da atividade de esterificação após o 4ª reciclo e somente na 6ª utilização atingiu seu tempo de meia vida.
- O tempo de reação para obter-se a máxima conversão em éster foi de 30 min.
- Verificou-se também que o tempo necessário para a reação atingir o equilíbrio foi de 40 min.

Este trabalho demonstrou a viabilidade da produção de lipases por *Penicillium sumatrense* em FES, utilizando substrato barato, como o resíduo agroindustrial torta de crambe e sua utilização em biocatálise em solventes orgânicos.

Os resultados apresentados neste trabalho são originais em dois aspectos fundamentais: (1) na produção de lipases por FES usando um fungo endofítico isolado das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*) e (2) na utilização do sólido fermentado contendo a enzima diretamente no meio reacional. Foram otimizados os meios e as condições de cultura para a produção da enzima e também as condições de síntese de um éster relativamente simples como o oleato de etila. Este éster poderá ser aplicado, no futuro, em outras reações para geração de produtos de interesse estratégico, como o biodiesel, e de produtos de alto

valor agregado, como compostos enantiomericamente puros, obtidos, por exemplo, pela resolução de misturas racêmicas. A maior viabilidade econômica dos processos da adição direta do sólido fermentado em biocatálise em relação a outras preparações enzimáticas, que envolvem extração, e por vezes purificação e imobilização em suportes inertes, é uma das maiores vantagens do processo de biocatálise aqui apresentado. Os resultados abrem, portanto, novas perspectivas de utilização de materiais de baixo custo em biocatálise.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é um trabalho que abre muitas novas perspectivas. Trabalhos futuros poderão abordar temas como, por exemplo:

- Estudo comparativo da capacidade de síntese da lipase de *Penicillium sumatrense*, produzida por FES, utilizando-se a adição direta do sólido fermentado em batelada alimentada, a enzima livre e a enzima imobilizada em suportes hidrofóbicos, em reações de transesterificação, para a produção de compostos de alto valor agregado, como o biodiesel.
- Otimizar a reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol, óleo de milho ou óleo de crambe através dos seguintes parâmetros: quantidade de biocatalisador, tempo de reação para obter a conversão do óleo em éster, temperatura, Razão Molar (óleo/etanol) e reutilização do biocatalisador.
- Após otimizadas as condições anteriores, estudar a capacidade de síntese da lipase, em reações de transesterificação livre de solvente orgânico, para a produção do biodiesel.
- Empregar métodos de análise instrumental, tais como Infravermelho, CLAE e RMN-¹H, para a caracterização dos ésteres produzidos (ésteres do biodiesel).
- Estudar a capacidade de catálise das lipases em resoluções de misturas racêmicas.

9. BIBLIOGRAFIA

ADNANI, A., M. BASRI, N. CHAIBAKHSH, M.B. ABDUL RAHMAN and A.B. SALLEH. **Statistical approach for optimization of biocatalytic synthesis of nonionic surfactants.** Proceedings of the 16th Malaysian Chemical Congress, October 12-14. 2010

AGUIEURAS, E.C.; BARROS, D. S.; SOUSA, H.; FREIRE, D. M. **Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases.** Fuel. V.159, n.1, p. 52-67. June.2015

AGUIEURAS, E.C.; BARROS, D. S.; SOUSA, H.; FREIRE, D. M. **Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions.** Renewable Energy, v. 27, n. 6, p. 112-118, maio. 2017.

ALMEIDA, T.G.; FREITAS, G.; GOMES, S. **Estudo sobre a formação da enzima humana por homologia.** Blucher Biophysics Proceedings. V.1, n.1. Mach. 2017.

AKOH, C.C.; CHANG, S.W.; LEE, G.C.; SHAW, J.F. **Enzymatic approach to biodiesel production.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, p. 8995–9005, 2007.

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.

BARON, A.M.; SARQUIS, M.I.; BAIGARI, M. **A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in eviriments.** Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 34, n.1-6, p.25-32, 2003.

BARON, A.M.; SARQUIS, M.I.M.; BAIGORI, M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. **A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments.** Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, v. 34, n. 1-6, p. 25-32, 2005.

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.

BI, Y.; YU, M.; ZHOU, H.; WEY, P. **Biosynthesis of oleyl oleate in solvent-free system by *Candida rugosa* Lipase (CRL) immobilized in macroporous resin with cross-linking of aldehyde-dextran.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic . v.133, n.1, p. 1-5. April. 2016.

BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. **Fermentação em estado sólido.** In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.* Sao Paulo: Edgar Blucher. p. 247-276.2001.

BINOD, P.; PANDEY, A., SINDHU, R. **Solid-State Fermentation for the production of Poly(hydroxyalkanoates).** *Chemical and Biochemical Engineering.* v 9, p. 173–181.2015.

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.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. **A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design.** *Chemical Engineering Journal,* v. 134, p. 93-99, 2007.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximating response function.** Technical Report, n. 9, 1973.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry,* v.72, p.248-254, 1976.

BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A.M.; OLIVEIRA, E.S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. **Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation.** *Bioresource Technology,* v. 101, p. 268–275, 2010.

CARVALHO, A.K.; BENTO, H.; NICO, A.S.; BARBOSA, J. C. **Síntese de ésteres de etila a partir da biotransformação do óleo de coco por diferentes lipases imobilizadas.** *Congresso Brasileiro de engenharia química.*v.1, n.1, p.1-7. Outubro. 2014.

CARVALHO, P.O.; CALAFATI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R.; MACEDO, G.A. **Potencial de biocatalise enantiosseletiva de lipases microbianas.** *Química Nova,* v.28, n.4, p.614-621, 2005.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIR, C.L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** *Química Nova,* v.27, n.1, p. 146-156, 2004.

CASTELLANI, A.A. **Maintenance in cultivation of the common pathogenic fungi of man. In sterile distilled water. Further researches.** *Journal of Tropical Medicine.* London, v. 70, 1967.

CASTILHO, L.; CASTRO, A.;FREIRE, A. **Characterization of babassu, canola, castor seed and sunflowerresidual cakes for use as raw materials for fermentation processes .** *Industrial Crops and Products.* V.83. n.1. p.140-148. January. 2016.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.; RUFINO, P.; RAMOS, A.; **Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by Thermomyces lanuginosus Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification.** Enzyme Research. V.2011. p.8. October. 2011.

CHOWDARY, S.; GHOURAI, S.; BANIK, S. **Fungal biotechnology in food and feed processing.** Food Research International . v.42, .5, p.577-587. June. 2002.

COLLA, L.C.; REINEHR, C.; BORTOLUZI, L. **Produção de lipases com atividade de hidrólise por *Aspergillus* utilizando sbproduts agroindustriais, óleo de soja e glicerol.** Ciências Exatas e Naturais. v.18, n.1, p.10-16. 2016.

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.

CORADI, G.V. **Produção de lipase por *fusarium oxysporum* em fermentação em estado sólido e sua aplicação em reações de síntese de ésteres de biodiesel.** São Paulo. Universidade Estadual Paulista, 2012, 86p, tese (mestrado)

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAILI- ALAOU, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; COUTO, S.R.; SANROMAN, M.A. **Application of solid-state fermentation to food industry- A review.** Journal of Food Engineering, v. 22, n.3, p.211-219, 2005.

COUTO, S.R.; SANROMAN, M.A. **Application of solid-state fermentation to food industry- A review.** Journal of Food Engineering, v. 22, n.3, p.211-219, 2005.

COUTO, S.R.; SANROMAN, M.A. **Application of solid-state fermentation to food industry- A review.** Journal of Food Engineering, v. 22, n.3, p.211-219, 2005.

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

DAVIDS, T.; SCHIMIDT, M.; BOTTCHER, D.; BORNCHUEUR, U. **Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis.** Current Opinion in Chemical Biology. v.17, n.2, p. 215-220. April. 2013.

DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, F. **Effect of Temperature, Moisture, and Carbon Supplementation on Lipase Production by Solid-State Fermentation of Soy Cake by *Penicillium simplicissimum*.** Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held. V.113. n.4, p.173-180. Janeiro. 2004

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)

DIZGE, N.; AYDINER, C.; BAYRAMOGLU, M. **Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer.** Bioresource Technology. v.100, n.6, p.1983-1991. April. 2009.

DOS SANTOS, F.; REZENDE, C.A.; MARTÍNEZ, 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. v.107, p. January. 2015.

DUARTE, F.C.; CARDOSO, M.; SANTIAGO, W.; MACHADO, A. M. **Brazilian organic sugarcane spirits: Physicochemical and chromatographic profile**. Revista Ciência Agronômica. v.48, n.2, p.12-20. April. 2017.

EGLOF, M.P.; SARDA, L.; VERGER, L. **Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase**. Protein science. v.4, n.1, p.44-57. January. 1995.

FARINAS, C.S. **Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. v.52, p. 179-188. December.2015.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 120 f. Tese (Tese de doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P., MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. **Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 44, pp. 8-13, 2007.

FERNANDES, M.L.M.; KRIEGER, N.; BARON, A.O; ZAMORA, P.P.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A. **Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERRAZ, A. M. **Síntese via enzimática de ésteres com lipases imobilizadas em filmes de dextrana**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2006. P. 55. Tese (mestrado).

FREIRE, D.M.A; CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) Enzimas em Biotecnologia – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 506 p., 2008.

FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. **Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido**. Revista Brasileira de Farmácia, v.81, p. 48-56, 2000.

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.

FUREBY, C; TABOR, G; WELLER, H.G; GOSMAN, A.D. **A comparative study of subgrid scale models in homogeneous isotropic turbulence**. Physics of Fluids. v.9, n.5. 1997

GALAN, C.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; RODRIGUES, R. Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v.9, p.34-43. September. 2013.

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

GANGADHARA, P.; KUMAR, P. R.; PRAKASH, V. **The stabilizing effects of polyols and sugars on Porcine Pancreatic Lipase**. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 86, n.8, p. 773–781, 2009.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. **Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study**. *Biochemical Engineering Journal*, v.37, p. 34-41, 2006.

GOMBERT, A.K.; PINTO, A.L., CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. **Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate**. *Process Biochemistry*, v. 35, p.85-90, 1999.

GUIRRA, F. **Crambe: Uma fonte promissora**. *Revista Biodieselbr*, v.2, p.40-47, 2009

HAALAND, H.; NJAA, L.R. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 44, p. 335-342. 1986.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; SUZUKI, Y.; YOSHIDA, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. **Preparation and comparative characterization of immobilized *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase for enzymatic biodiesel production**. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.81, p.637-645, 2009.

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

HEUX, S.; SALLES, M.; DUMON, O. **White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining**. *Biotechnology Advances*. v.33, n.1, p.653-670. July. 2015.

HIOL, A.; JONZO, M.D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. **Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 421-430, 2000.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. **Biotechnological advantages of laboratory-scale solidstate fermentation with fungi**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, p. 175-186, 004.

HOLWERDA, K.; VERKADE, P.E.; WILLINGEN, A.H.A. *Recueil des Travaux Chimiques des PaysBas*, v. 55, p.43, 1936.

JACKSON, M.A.; MBARAKA, I.K.; SHANKS, B.H. **Esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide catalyzed by functionalized mesoporous silica and an immobilized lipase.** Applied Catalysis A: General, v. 310, p. 48–53, 2006.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B.W.; EETZ, M. T. **Bacterial biocatalyst: Molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications as lipases.** Annual Reviews in Microbiology, v. 53, p. 315-351, 1999.

JOHNSON, V.; SIGH, M.; SAINI, V.S. **Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30.** Biotechnology Letters, v.14, n.6, p. 487-490, 1992
CYGLER E SCHRAG, 1997; YAO E KOLLER, 2002

KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. **Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake.** Process Biochemistry, v. 33, n.5, p.505-511, 1998.

KARRA-CHAÂBOUNI, M.; BOUAZIZ, I.; BOUFI, S.; REGO, A.M.B.R.; GARGOURI, Y. **Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.66, p.168-177, 2008.

KIM, H.; YOUN, S. H.; SHIN, C. **Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations.** Journal of Biotechnology. V.123, n.2, p. 174-183. May. 2006.

KIM, M.I.; HAM, H.O.; OH, S.D.; PARK, H.G.; CHANG, H.N.; CHOI, S.H. **Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 39, p. 62–68, 2006.

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.

KOHNO, M.; ENATSU, M.; YOSHIIZUMI, M.; KUGIMIYA, W. **High-level expression of *Rhizopus niveus* lipase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and structural properties of the expressed enzyme.** Protein Expression and Purification, v.15, n.3, p.327–35, 2000.

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 Microb. Technol.* 84, 56–67. 2016.

LEE, K. T.; AKOH, C.C. **Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic e caprylic acids.** Journal of the American Oil Chemists Society. v. 75, n.4, p. 495-499, 1996.

LI, J; LI, L; TONG, J; WANG, Y; CHEN, S. **Research development on lipase-catalyzed biodiesel.** Energy Procedia, v. 16, p. 1014– 1021, 2012.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J. D. **Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum***. Food Technology and Biotechnology, v.41, p.105-110, 2003.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C., FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. **Kinetic characterization and stability in aqueous media and in organic solvents of a crude lipase preparation obtained from *Penicillium aurantiogriseum***. Biochemical Engineering Journal, v. 18, p. 65-71, 2004 b.

LIU, D.; LI, W.; DU, W. ***Rhizopus oryzae* whole-cell-catalyzed biodiesel production from oleic acid in *tert*-butanol medium**. Energy e Fuels, v. 22, p.155–158, 2008.

LIU, R.; JIANG, X.; MOU, H.; GUAN, H.; HWANG, H.M.; LI, X. **A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation**. Biochemical Engineering Journal, v. 46, p. 265–270, 2009.

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.

MA, F.; HANNA, M. A. **Biodiesel production: a review**. Bioresource Technology, v. 70:1–15, 1999.

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*. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2012. 184 p.** Tese (mestrado).

MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia. Axcel Books do Brasil Ed. P.344. 2004

MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. **Possible methods for biodiesel production**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.11, p. 1300–1311, 2007.

MARTINS, A.; GRAEBIN, N.; LORENZONI, A. **Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology**. Process Biochemistry. V.46, n.12, p.2311-2316. January. 2011.

MELO, E. J. **Síntese enzimática dos ésteres de aroma butirato e valerato de citronelila**. São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2005. 106 p. Tese (mestrado).

MESSIAS, J. M. et al. **Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas**. Semina : Ciências exatas e tecnológicas, v.32, n.2, p.213- 234, 2011

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.

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.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. **Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability.** *Bioresource Technology*, v.100, p. 5146–5154, 2009.

OLIVEIRA, A.C. **Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid –a kinetic study.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 4-6; v. 22, p. 999-1005, 2001.

OLIVEIRA, B.H. **Imobilização e caracterização parcial de lipase produzida por *Fusarium oxysporum* utilizando fermentação submersa com delineamento fatorial e metodologia de superfície de resposta (MSR).** 2012. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) Departamento de Microbiologia e Bioquímica, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

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, Curitiba, 2013.

OZYLMAZ, G.; GEZER, E. **Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel.** *Process Biochemistry*, v.45, p. 1176–1180, 2010.

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.** *Applied Microbiology & Biotechnology*, v.84-86, p.1137-1145, 2000.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse.** *Bioresource Technology*, v.74 , p.69-80, 2000.

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

PANG, G.; ZHOU, G.; LIU, R. **Esterification of oleic acid with methanol by immobilized lipase on wrinkled silica nanoparticles with highly ordered, radially oriented mesochannels .** *Materials Science and Engineering C*. V.59, n.1, p.35-42.September. 2015

PAQUES, F. W. and Macedo, G. A., **Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais: A Review.** *Química Nova*, 29, No. 1, 93.2006

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

PIRES-CABRAL P, DA FONSECA MMR, FERREIRA-DIAS S. **Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate.** Biochem Eng J. v. 48, p.246–252. 2010

POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K. **The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme.** Journal of Molecular Biology. v.309, n.1, p.2015-226. May. 2001

QUADROS, C.P.; DUARTE, M.C.; PASTORE, G.M. **Biological activities of a mixture of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* and alkaline lipase from *Fusarium oxysporum*.** Brazilian Journal of Microbiology, v.42, p. 354-361, 2011.

RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. **Lipase production by solid state fermentation of olive oil cake and sugar cane bagasse.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 5, p. 75-78, 1998.

RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. **An overview of enzymatic production of biodiesel.** Bioresource Technology, v.99, p. 3975–3981, 2008.

RAPP, P. **Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*.** Enzyme and Microbial Technology . v.17, n.9, p. 832-838. September.1995

RASSY, H.; PERRARD, A.; PIERRE, A. **Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: Bi-Bi Ping-Pong kinetics.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v.30, n.3, p.137-150. August.2004.

RIBEIRO, C.; SCHEUFELE, F. B.;MODENES, A. N.; VIEIRA, V. **Characterization of *Oreochromis niloticus* fish scales and assessment of their potential on the adsorption of reactive blue 5G dye.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. V. 482. N.1. p.693-701. 2015.

RIVERA, I.; VILLANUEVA, G.; SANDOVAL, G. **Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática.** Grasas y Aceites, v. 60, n. 5, p. 470-476, 2009.

ROCHA, D.Q.; BARROS, D.K.; COSTA, E.J.C.; SOUZA, K.S.; PASSOS, R.R.; VEIGA JUNIOR, V.F.; CHAAR, J.S. **Determinação da matéria-prima utilizada na produção de biodiesel adicionado ao diesel mineral, através de monitoramento seletivo de íons.** Química Nova, v.31, n.5, p. 1062-1066, 2009.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. **Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent.** Bioresource Technology, v. 98, p. 648-653, 2007.

SALAH, R. B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. **Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae***. Journal of Bioscience en Bioengineering, v. 103, n. 4, p. 368-72, 2007.

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

SALIS, A.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. **Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilized lipases**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.21, n.4-6, p.167-174, 2005.

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.

SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. **An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain**. Biocatalysis and Biotransformation, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2008.

SÁNCHEZ-OTERO, M.G., QUINTANA-CASTRO, R., MORA-GONZÁLEZ, P., MÁRQUEZ-MOLINA, O., VALERIO-ALFARO, G., OLIART-ROS, R.M. **Enzymatic reactions and synthesis of n-butyl caproate: esterification, transesterification and aminolysis using a recombinant lipase from *Geobacillus thermol-eovorans* CCR11**. *Environmental Technology*. V.31, n.10, p. 1101-1106. 2010

SANTOS, D.T.; SARROUH B.F.; SANTOS J.C.; PEREZ V. H.; SILVA S.S. **Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia**. Janus, ano 3, n.4, p. 164-183, 2006.

SCILLIPOTI, J.; NIOI, C.; MARTY, A.; CAMY, S.; CONDORET, J. S. **Prediction of Conversion at Equilibrium for Lipase Esterification in Two-Phase Systems**. Biochem. Eng. J.v.117, p.162– 171. 2017

SCHRAG, J.; CYGLER, M. **Lipases and $\alpha\beta$ hydrolase fold**. Methods in Enzymology. V.284, p.85-107. 1997.

SERRES, J.; BALMANT, W.; SOARES, D. **A combined sorption and kinetic model for multiphasic ethyl esterification of fatty acids from soybean soapstock acid oil catalyzed by a fermented solid with lipase activity in a solvent-free system**. Biochemical Engineering Journal. V.120, p. 84-92.January. 2017

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, C. **Production, purification, characterization, and applications of lipases**. Biotechnology Advances. v.19, n.8, p.627-692. December. 2001.

SILVA, J. Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo b imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina a. Ceará: Universidade Federal do Ceará. 2007. P. 97. Tese (mestrado).

SILVA, P. R.; MONTANHER, A. F.; ADAO, D. C.; ZAGONEL, G. F.; ALVES, L. Z.; DAMBISKI, L.; ADAD, L. B.; VECHIATTO, W. W. D.; SUCHEK, E. M.; COSTA, B. J. **Produção e caracterização físico-química de biodiesel de óleo de crambe**. SIMPOSIO BRASIL-ALEMANHA, 4. Curitiba/PR. Anais SBA, 2009.

SINGH, S. P.; SINGH, D. **Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, p. 200–216, 2010.

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

SOARES, D.; PINTO, A.; GONSALVES, A. **Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor** . Biochemical Engineering Journal. V. 81, p.15-23.October. 2013;

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. January. 2017.

SOUZA, M. C. **Imobilização de lipase de candida antártica do tipo B em nanoparticulas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. Universidade Federal do ceará. P.88. 2013.

SOUZA, S. F. **Ação inibitória de extratos de plantas sobre lipase pancreática com ênfase em Baccharis trimera (less.) DC**. Universidade de Lavras. 2009. P. 105. Tese (mestrado).

STEINKE, G.; KIRCHHOFF, R.; MUKHERJEE, K. D. **Lipase-Catalyzed alcoholysis of crambe oil and camelina oil for the preparation of long-chain esters**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 77, p. 361-366, 2000.

STERGIOU, P.; FOLKIES, A.; FILLIPOU, M. **Advances in lipase-catalyzed esterification reactions**. Biotechnology Advances V.31, n.8, p. 46-59. December. 2013.

STRAATHOF, A.J.J.; ADLERCREUTZ, P. **Applied biocatalysis**. 2^a ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 295-316, 2000.

STRAATHOF, A. J. J.; ADLERCREUTZ, P. **Applied biocatalysis**. 2^a ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 295-316, 2000.

STRINGARI, D. **Sistemática e Diversidade Genética de Isolados de Guignardia spp. e Phyllosticta sp. nos Estados do Paraná e São Paulo**, 2009. Universidade Federal do Paraná.

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

TALUKDER, M.M.R.; WU, J.C.; FEN, N.M.; MELISSA, Y.L.S. **Two-step lipase catalysis for production of biodiesel**. Biochemical Engineering Journal, v. 49, p. 207–212, 2010.

TOMASI, G. A.; OLIVEIRA, R. C.; REIS, A. C.; VIECELLI, C. **teor de óleo presente na torta de crambe (*crambe abyssinica hochst*) com diferentes métodos de extração.** Encontro científico cultural interinstitucional. Outubro. 2014.

TAN, Y.; LIN, J. **Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens* like microalga.** Bioresource Technology, v. 102, p. 10131-10135, 2012.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. **A review on microbial lipases production.** Food Bioprocess Technology, v. 3, p. 182–196, 2010.

VARMA, M.N.; MADRAS, G. **Effect of chain length of alcohol on the lipase-catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbon dioxide.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.160, p.2342–2354, 2010.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical molecular biological approaches.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 9, p. 113-148, 2000.

VOSS, C.; GRUBER, C.; FABER, K. **Orchestration of Concurrent Oxidation and Reduction Cycles for Stereoinversion and Deracemisation of *sec*-Alcohols.** *J. Am. Chem. Soc.* V.130, n.13, p.69-72. 2006

WANG, L.; DU, W.; LIU, D.; LI, L.; DAÍ, N. **Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 43, p. 29–32, 2008.

YANG, Z.; PAN, W. **Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis.** Enzyme and Microbial Technology. v.37, n.1, p.19-28. June.2005.

YIGITOGU, M.; TEMOÇIN, Z. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 66, p.130–135, 2010.

YIN, C.; LIU, T.; TAN, T. **Synthesis of Vitamin A Esters by Immobilized *Candida* sp. Lipase in Organic Media.** V. 14, n.1, p81-86. February. 2006.

YU, D.; WANG, Z.; ZHAO, L.; CHENG, Y.; CAO, S. **Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas* sp. Lipase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 48, p. 64–69, 2007.

XIE, W.; WANG, J. **Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil.** Biomass and Bioenergy, v. 36, p. 373-380, 2012.

ZAGO, E.C. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido.** Universidade Federal do Parana, Curitiba. 112 f. 2010. Tese (mestrado)

ZAGO, E.C.; Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido. Paraná: Universidade Federal do Paraná. 2010. 127 p. Tese (mestrado).

ZENEBON, O.; PASCUET, N.S., TIGLEA, P. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ZHOU, X.; LI, D. **Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. V.44. p.182-197. January. 2016.

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. May. 2016;