

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

**CELSON RODRIGUES**

**SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES A PARTIR DE  
RESÍDUOS OLEOSOS DERIVADOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL**

VITÓRIA  
2011

**CELSON RODRIGUES**

**SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES A PARTIR DE  
RESÍDUOS OLEOSOS DERIVADOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Ambiental na área de concentração Saneamento Ambiental.  
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini.

VITÓRIA  
2011





Dedico este trabalho ao “Ser” humano que persevera na busca da realização do que avalia possível, transformando as dificuldades e as vicissitudes, que no seu percurso porventura fizerem-se presentes, na energia necessária para a renovação e o crescimento de sua fé, impulso vital à motivação e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pai, Stalin Rodrigues (*in memorian*) e Flora Kulpter Rodrigues. A Ele, pelo sofrimento de uma incontida trajetória pelo irreal, superada ao final. A Ela, pela continência aos sofrimentos e pela bravura em defesa dos filhos. A ambos por serem, para a minha educação e “aprendizado para a vida”, o melhor pai e a melhor mãe.

Ao meu irmão, Herowske Rodrigues, pela bondade e carácter exibidos ao longo de sua trajetória de vida, que inexoravelmente, para o meu bem, são vitalícios exemplos.

Aos meus filhos Igor Affonso Rodrigues e Heitor Affonso Rodrigues, singulares tesouros que de energia me alimentam para o cumprimento da trajetória pessoal e profissional, imbuindo-me ao exercício do melhor da minha capacidade.

À minha mulher, Márcia Affonso Rodrigues, pela dedicação e amor a mim dispensados e aos nossos filhos. Minha gratidão é infinita.

Ao Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini, pela sua orientação, confiança e apoio ao desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Krieger, da Universidade Federal do Paraná e, ao Prof. Dr. Ary Correa Junior, da Universidade Federal de Minas Gerais, minha gratidão por gentilmente terem aceito o convite para participação da banca de defesa de tese, na qualidade de examinadores externos e, pela pertinência e qualidade de suas contribuições ao texto.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina de Pinho Keller e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Laura Marina Pinotti, da Universidade Federal do Espírito Santo, minha gratidão por gentilmente terem aceito o convite para participação da banca de defesa de tese, na qualidade de examinadores internos e, pela pertinência e qualidade de suas contribuições ao texto.

Aos meus colegas discentes da “turma 2007”, pioneiros como eu, do Curso de Doutorado em Engenharia Ambiental, do Programa de Pós-graduação em Engenharia

Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, Marisa, Leandro e Marcos, pelo companheirismo, ênfase e dedicação aos interesses comuns da “turma”.

À Elaine, Paulo Wagner, Amaury, Emília, Tiago Perovano e Suellen, pela efetiva participação e auxílio em várias etapas dos trabalhos laboratoriais e, portanto, contribuição efetiva na elaboração deste trabalho de tese. Vocês foram preciosos!

Aos Departamentos de Produção Vegetal e de Engenharia Ambiental e, às instâncias superiores da Universidade Federal do Espírito Santo, que me tornaram possível a realização deste Curso de Doutorado, agradeço pela consideração e apoio.

Ao CNPQ, à CAPES, à ANP, à FAPES, ao FACITEC e à UFES, por contribuírem, ao seu tempo e de acordo com suas competências e possibilidades, para a realização deste trabalho, agradeço.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram e ou fizeram parte deste especial e particular trajeto da minha vida, sou imensamente grato. Muito obrigado!

Os conhecimentos nos dão meios para viver. A sabedoria nos dá razões para viver.

*Rubem Alves*

## RESUMO

A seleção de fungos produtores de lipases a partir de resíduos oleosos do saneamento ambiental é o tema principal deste trabalho. De 113 isolados fúngicos obtido, 75 foram pré-selecionados como produtores de lipases. Destes, 16 foram selecionados pelos maiores índices enzimáticos e, quatro pelo crescimento e resposta ao teste de rodamina-B, tendo quantificadas sua atividade lipolítica específica em cultivo líquido. A atividade lipolítica variou de  $0,13 \pm 0,03$  (F18: *Rhizomucor* sp.) a  $18,06 \pm 0,36$  U.mg<sup>-1</sup> (F2: *Penicillium* sp.). Em seguida foram avaliados a atividade lipolítica específica, a atividade biossurfactante, o conteúdo de óleos e graxas e a produção de biomassa pelos isolados F2 e F18, em fermentação em estado líquido (FEL) e sólido (FES). Picos das atividade foram observados nos dois tipos de cultivo, com 48 h de incubação. Na FEL a atividade lipolítica foi de  $28,09 \pm 0,25$  (F2) e  $0,25 \pm 0,02$  U.mg<sup>-1</sup> (F18) e a atividade biossurfactante foi de  $4,23 \pm 0,27$  (F2) e de  $5,00 \pm 0,21$  UE.mL<sup>-1</sup> (F18). Na FES, a atividade lipolítica foi de  $34,11 \pm 0,62$  (F2) e de  $5,81 \pm 0,25$  mg. mL<sup>-1</sup> (F18), a atividade biossurfactante foi de  $8,58 \pm 0,22$  (F2) e de  $11,97 \pm 0,95$  UE.g<sup>-1</sup> (F18) e a remoção de óleos e graxas foi de  $79,30 \pm 0,43\%$  (F2) e de  $71,50 \pm 0,32\%$  (F18). Na biodegradação aeróbia de resíduos oleosos do saneamento ambiental, foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $p=0,05$ ) entre os resíduos, inoculantes e padrões utilizados. Correlações positivas ocorreram entre a produção de CO<sub>2</sub> e a biomassa fúngica e, negativas entre estes e os teores de óleos e graxas dos substratos com óleo de soja e óleo residual de fritura, aos 10, 20 e 30 dias. Remoções de óleos e graxas de 65,50, 74,16, 58,33 e 58,33% ocorreram dos substratos com óleo de soja e óleo residual de fritura, inoculados com F2 e, com escumas das caixas de gordura da Estação de Tratamento de Esgotos e do Restaurante Universitário da UFES, inoculados com F18, respectivamente. Nos substratos com o óleo de soja e a espuma de caixa de gordura (esterilizada) do restaurante universitário, a maior remoção de óleos e graxas (83,33%), ocorreu com a inoculação e crescimento de F2 e F18 no mesmo biorreator. Esses resultados promissores sugerem que sejam avaliados como biocatalisadores de célula integral.

Palavras-chave: fungos; lipases; biossurfactantes; biodegradação aeróbia; resíduos oleosos do saneamento ambiental; biocatalisadores.

## ABSTRACT

The selection of fungi producing lipase from oily residues of environmental sanitation is the main objective of this work. Of 113 fungal isolates obtained, 75 were pre-selected as producers of lipase. Of these, 16 were selected by the largest indices enzymatic and four by growth and response to rhodamine-B test, having quantified its specific lipolytic activity and biomass production in liquid culture. The specific lipolytic activity varied from  $0,13 \pm 0,03$  (F18: *Rhizomucor* sp.) to  $18,06 \pm 0,36$  U.mg<sup>-1</sup> (F2: *Penicillium* sp.). Then were quantified the specific lipolytic activity, biosurfactant activity, oils and greases contents and biomass production, by F2 and F18, for 120 h, in liquid (LSF) and solid state fermentations (SSF). Peaks of activities were observed in two types of culture, with 48 h of incubation. In LSF the lipolytic activities were  $28,09 \pm 0,25$  (F2) and  $0,25 \pm 0,02$  U.mg<sup>-1</sup> (F18) and biosurfactant activity was  $4,23 \pm 0,27$  (F2) and  $5,00 \pm 0,21$  UE.mL<sup>-1</sup> (F18). In SSF, lipolytic activity was  $34,11 \pm 0,62$  (F2) and  $5,81 \pm 0,25$  mg. mL<sup>-1</sup> (F18), biosurfactant activity was  $8,58 \pm 0,22$  (F2) and  $11,97 \pm 0,95$  UE.g<sup>-1</sup> (F18), and the removal of oils and greases was  $79,30 \pm 0,43\%$  (F2) and  $71,50 \pm 0,32\%$  (F18). In the aerobic biodegradation of the oily residues of environmental sanitation, statistical differences ( $p = 0,05$ ) were observed between residues, inoculants and patterns used. Positive correlation occurred between the production of CO<sub>2</sub> and fungal biomass and negative, between these and the levels of oils and greases of substrates with soybean oil and frying residual oil, at 10, 20 and 30 days. Removal of oils and greases of 65,50, 74,16, 58,33 and 58,33% occurred of the substrates with soybean oil and residual frying oil, inoculated with F2, and with scums of grease-traps of the Sewage Treatment Station and UFES Restaurant Universitaire, inoculated with F18, respectively. In substrates with soybean oil and scum of grease-traps of the Restaurant Universitaire, the largest removal of oils and greases (83,33%), occurred with the inoculation and growth of F2 and F18 in the same bioreactor. These promising results suggest that both are valued as whole cell biocatalysts.

Keywords: fungi; lipases; biosurfactants; aerobic biodegradation; oily residues of environmental sanitation; biocatalysts.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida rugosa</i> e ampliação do sítio ativo .....	32
Figura 2 - Modulação alostérica de lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> , segundo mecanismo de regulação da homeostase energética no metabolismo de gorduras pelo fungo (A) com produção de dois tipos de lipases (B).....	35
Figura 3 - Principais reações catalisadas por lipases.....	35
Figura 4 - Estrutura das formas fechada e aberta da lipase de <i>Rhizomucor mihei</i> (RML) .....	43
Figura 5 - Reação de esterificação de uma molécula de glicerol com três ácidos graxos (R1, R2 e R3) resultando na formação de uma molécula de triglicerídeo e três moléculas de água .....	64
Figura 6 - Etapas envolvidas na transformação de lipídeos em lodo ativado (TAG: triacil gliceróis; AGCL: ácidos graxos de cadeia longa).....	72
Figura 7 - Etapas de degradação anaeróbia das gorduras que são hidrolisadas, os produtos gerados sofrem fermentação, $\beta$ -oxidação e são utilizadas para gerar acetato, e após há a formação de metano pela metanogênese .....	73
Figura 8 - Etanolise química ácida e básica de um triglicerídeo, resultando na formação de ésteres alquílicos ou biodiesel (B100) e glicerol .....	89
Figura 9 - Comparação de processos de produção de biocatalisadores utilizando lipases extra (a) e intracelulares (b).....	93
Figura 10 - Lipases produzidas por células integrais de <i>Rhizopus oryzae</i> , imobilizadas em poliuretano: 34kDa (ligada à parede celular) e 31kDa (ligada à membrana celular).....	97
Figura 11 - Esquema do processo de seleção de fungos produtores de lipases extra e intracelulares, nos meios de cultura MB e MMOS <sub>R</sub> , respectivamente.....	103
Figura 12 - A) Resíduos oleosos do saneamento: 1) ECG-UFES, 2) ECG-ETE e, 3) Óleo residual de fritura (OF) e 4) Óleo de soja (OS). B) Isolados fúngicos utilizados como inóculo, na avaliação da biodegradabilidade aeróbia de resíduos oleosos do saneamento: a) F41 – <i>Beauveria</i> sp., b) F96 – <i>Geotrichum</i> sp., c) F2 – <i>Penicillium</i> sp. e, d) F18 – <i>Rhizomucor</i> sp.....	111
Figura 13 - a) Fungos enriquecidos nos resíduos oleosos do saneamento; b e c) crescimento e reações apresentadas pelo isolado F107 (levedura) nos meios de cultura MB e MMOS <sub>R</sub> , respectivamente; d) fungos repicados para tubos de cultura; e) armazenamento dos tubos de cultura com fungos, a 5°C.....	117

Figura 14 - a) Ausência de atividade lipolítica extracelular apresentada pelo isolado F74 em meio MB; b e c) presença de atividade lipolítica extracelular (halo opaco) apresentada pelos isolados F66 e F28 em meio MB e; d) Presença de atividade lipolítica apresentada pelo isolado F18 no meio MMOS <sub>R</sub> ; todos com 96 h de incubação.....	122
Figura 15 – Atividade lipolítica, atividade biossurfactante e biomassa seca produzidos pelos isolados fúngicos F2 e F18 em FEL, à 30°C e 150 rpm, por 120 h.....	134
Figura 16 – Atividade lipolítica (AL), atividade biossurfactante (AS) e biomassa seca (BM) produzidos pelos isolados fúngicos F2 e F18 em FES, à 30°C, por 120 h.....	136
Figura 17 – Atividade lipolítica, teor de óleos e graxas e biomassa seca, apresentados pelos isolados fúngicos F2 e F18, em FES, a 30°C, por 120 h....	137
Figura 18 - I) FEL, com 120 horas de incubação a 30°C e 150 rpm; II) FES, com 120 horas de incubação a 30°C e; III) a - emulsificação óleo em água – controle, b - F2 ( <i>Penicillium</i> sp.), c - emulsificação com F2, d - emulsificação com F18, e - F18 ( <i>Rhizomucor</i> sp.), f - produção de espuma pelo extrato do cultivo de F18 a partir do processo de FES.....	140
Figura 19 - CO <sub>2</sub> e óleos e graxas (O&G), no SRAN, em escuro a 30±2°C: A) com óleo de soja (OS), B) óleo de fritura (OF), C) ECG-ETE) e, D) ECG-RU. Inoculantes: F2 – <i>Penicillium</i> sp., F18 – <i>Rhizomucor</i> sp., F41 - <i>Beauveria</i> sp. e F96 – <i>Geotrichum</i> sp.....	143
Figura 20 - Reatores dos SRAN ( série horizontal acima) e SRAE ( série horizontal abaixo) aos 30 dias de incubação em escuro e 30 ± 2°C. No SRAN: a = OS, b = OS F2, c = OF F2, d = ECG-ETE F18, e = ECG-RU F18. No SRAE: a) OS (0 dia), b) OS, c) OS F02, d) OS F18, e) OS F2 F18.....	145
Figura 21 - Unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de substrato seco, acumuladas (30 dias), em um sistema de respirometria aeróbia com substratos oleosos não esterilizados (SRAN), no escuro, a 30 ± 2°C.....	146
Figura 22 - CO <sub>2</sub> e óleos e graxas (O&G), no SRAE, em escuro a 30±2°C: A) com óleo de soja (OS) e B) espuma de caixa de gordura do Restaurante Universitário (ECG-RU). Inoculantes: F2 ( <i>Penicillium</i> sp.) e F18 ( <i>Rhizomucor</i> sp.).....	150

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classe de enzimas e suas aplicações em processos .....	28
Tabela 2 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.....	55
Tabela 3 - Fontes de lipídeos e suas concentrações em águas residuárias.....	66
Tabela 4 - Valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) para diferentes tipos de águas residuárias .....	71
Tabela 5 - Dados obtidos em relação à sustentabilidade da utilização de resíduos oleosos para a produção de biodiesel no Brasil.....	83
Tabela 6 - Vantagens e desvantagens de diferentes catalisadores utilizados na produção de biodiesel.....	90
Tabela 7 - Classificação e características dos isolados fúngicos quanto à procedência, ao crescimento de colônias e a atividade lipolítica apresentada nos meios de cultura reacionais: meio básico (MB) e meio mínimo + óleo de soja + rodamina-B (MMOS <sub>R</sub> ).....	119
Tabela 8 - Isolados fúngicos com índice enzimático (IE) detectado no meio de cultura MB, com 96 horas de incubação, a 28°C.....	123
Tabela 9 - Produção de biomassa e atividade lipolítica apresentada por 20 isolados fúngicos em FEL (meio de cultura MMOS), com 120 h de incubação a 30°C e 150 rpm.....	132
Tabela 10 - Valores de pico ( n=3) observados com 48 h de crescimento, da atividade lipolítica específica, atividade biossurfactante, produção de biomassa seca, remoção de óleos e graxas e, pH, referentes aos isolados F2 ( <i>Penicillium</i> sp.) e F18 ( <i>Rhizomucor</i> sp.) em condições de FES e FES.....	136
Tabela 11 - Valores médios e regressões lineares para as correlações ( n=3 para repetições e n=5 para tempos de incubação: 24, 48, 72, 96 e 120 h) entre atividade lipolítica específica (AL) , atividade biossurfactante (AS), biomassa seca (BM), teor de óleos e graxas (O&G) e, os valores médios de pH dos substrato de cultivo de F2 e F18 nos processos de fermentação em estado líquido (FEL) e sólido (FES).....	139
Tabela 12 - Caracterização físico-química dos resíduos oleosos do saneamento e do óleo de soja comercial (Liza) utilizados nos SRA.....	142

Tabela 13 - Comparação de médias (teste de Tuckey) da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (CO <sub>2</sub> : mg.0,1kg <sup>-1</sup> ), população fúngica (F: UFC. g <sup>-1</sup> ), e teor de óleos e graxas (O&G: g.kg <sup>-1</sup> ), em três tempos de avaliação da biodegradação aeróbia de óleo de soja (OS), óleo residual de fritura (OF), espuma de caixa de gordura do RU-UFES (ECG-RU) e, espuma de caixa de gordura da ETE-UFES (ECG-ETE), no SRAN.....	147
Tabela 14 - Correlações e correspondentes regressões lineares entre a produção acumulada de CO <sub>2</sub> (CO <sub>2</sub> : mg.0,1kg <sup>-1</sup> ), a população fúngica (F: UFC. g <sup>-1</sup> ), e o conteúdo de óleos e graxas (O&G: g.kg <sup>-1</sup> ), em três tempos de avaliação da biodegradação aeróbia de OS (1), OF (2), ECG-RU (3) e, ECG-ETE (4), no SRAN.....	148
Tabela 15 - Comparação de médias (teste de Tuckey) da produção acumulada de CO <sub>2</sub> (CO <sub>2</sub> : mg.0,1kg <sup>-1</sup> ), biomassa fúngica (BM: mg. g <sup>-1</sup> ), e conteúdo de óleos e graxas (O&G: g.kg <sup>-1</sup> ), em três tempos de avaliação da biodegradação aeróbia de óleo de soja (OS) e da espuma de caixa de gordura do RU-UFES (ECG-RU), no SRAE.....	152
Tabela 16 - Correlações e regressões lineares correspondentes, entre a produção acumulada de CO <sub>2</sub> (CO <sub>2</sub> : mg.0,1kg <sup>-1</sup> ), a biomassa fúngica (BM: mg.g <sup>-1</sup> ) e o conteúdo de óleos e graxas (O&G: g.kg <sup>-1</sup> ), em três tempos de avaliação da biodegradação aeróbia de OS (1) e ECG-RU (2), no SRAE.....	153

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>AL</b>	Atividade lipolítica específica
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AS</b>	Atividade biossurfactante
<b>BDA</b>	Batata – dextrose - ágar
<b>BM</b>	Biomassa
<b>CMC</b>	Concentração micelar crítica
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>DBO<sub>5</sub></b>	Demanda bioquímica de oxigênio
<b>DQO</b>	Demanda química de oxigênio
<b>ECG-ETE</b>	Escuma de caixa de gordura da ETE-UFES
<b>ECG-RU</b>	Escuma de caixa de gordura do RU-UFES
<b>ETE</b>	Estação de tratamento de esgoto
<b>EU</b>	Unidades emulsificantes
<b>FEL</b>	Fermentação em estado líquido
<b>FES</b>	Fermentação em estado sólido
<b>F2</b>	Isolado F2 do fungo <i>Penicillium</i> sp.
<b>F18</b>	Isolado F18 do fungo <i>Rhizomucor</i> sp.
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta performance
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>L</b>	litro
<b>LABSAN</b>	Laboratório de Saneamento da UFES
<b>LPR</b>	Sistema reacional em fase líquida
<b>M</b>	Concentração molar
<b>MB</b>	Meio de cultura básico para isolamento de fungos lipolíticos
<b>MMOS<sub>R</sub></b>	Meio mínimo – óleo de soja-rodamina-B
<b>n</b>	Número de amostras
<b>N/C</b>	Não consta
<b>O&amp;G</b>	Óleos e Graxas
<b>OS</b>	Óleo de soja (marca Liza)
<b>OF</b>	Óleo residual de fritura

<b>RU</b>	Restaurante Universitário da UFES
<b>SPSS</b>	Statistical Package for Social Science
<b>SPR</b>	Sistema reacional em fase sólida
<b>SRA</b>	Sistema de respirometria aeróbia
<b>SRAE</b>	Sistema de respirometria aeróbia com resíduos esterilizados
<b>SRAN</b>	Sistema de respirometria aeróbia com resíduos não esterilizados
<b>ST</b>	Sólidos totais
<b>SV</b>	Sólidos voláteis
<b>UASB</b>	Upflow anaerobic sludge blanket reactor (Reator anaeróbico de fluxo ascendente)
<b>v/v</b>	Volume por volume

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	27
3.1 LIPASES.....	27
3.1.1 Conceito e importância de lipases para biocatálise.....	27
<b>3.1.2 Características das lipases</b> .....	29
3.1.2.1 Físico-químicas.....	29
3.1.2.2 Estrutura e mecanismo de atuação.....	30
3.1.2.3 Propriedades.....	32
3.1.2.3.1 Especificidade ou regiosseletividade.....	33
3.1.2.3.2 Reações catalisadas.....	35
3.1.3 Microrganismos produtores de lipases.....	37
3.1.3.1 Bactérias.....	39
3.1.3.2 Leveduras.....	40
3.1.3.3 Fungos filamentosos.....	41
3.1.4 Processos fermentativos na produção de lipases fúngicas.....	44
3.1.5 Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases.....	46
3.1.6 Avaliação da atividade lipolítica através de respirometria aeróbia.....	52
3.2 BIOSURFACTANTES.....	54
3.2.1 Conceito e importância.....	54
3.2.2 Estrutura funcional e propriedades.....	56
3.2.3 Microrganismos produtores (bactérias e leveduras) .....	57
3.2.4 Produção de biossurfactantes por fungos filamentosos.....	59
3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFLUENTES OLEOSOS COM LIPASES.....	63
3.3.1 Óleos e gorduras: característica e importância.....	63
3.3.2 Efluentes oleosos: impacto ambiental e legislação.....	65
3.3.3 Efluentes oleosos: consequências aos sistemas de tratamento.....	68
3.3.4 Efluentes oleosos: hidrólise enzimática com lipases.....	74

3.4 INTERFACE TECNOLÓGICA: SANEAMENTO E GERAÇÃO DE ENERGIA.....	79
3.4.1 Óleos e graxas residuais (OGR): matéria prima para biodiesel.....	79
3.4.1.1 Óleo residual de fritura.....	83
3.4.1.2 Lodo de esgoto.....	86
3.4.1.3 Escuma de caixa de gordura.....	87
3.4.2 Transesterificação de OGR com catálise química e enzimática.....	89
3.4.3 Transesterificação de OGR com biocatalisadores lipolíticos.....	91
3.4.3.1 Biocatalisadores extracelulares (lipase imobilizada).....	91
3.4.3.2 Biocatalisadores intracelulares (célula integral lipolítica).....	93
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
4.1 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASSES A PARTIR DE DIFERENTES AMOSTRAS AMBIENTAIS, EM MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS.....	99
4.1.1 Isolamento a partir de tecidos necrosados de plantas e de insetos.....	99
4.1.2 Isolamento a partir do solo e de resíduos oleosos do saneamento .....	101
4.1.3 Seleção pela avaliação do crescimento e índice enzimático (IE).....	102
4.1.4 Identificação dos isolados fúngicos produtores de lipases.....	103
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA ESPECÍFICA, ATIVIDADE SURFACTANTE, REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS E PRODUÇÃO DE BIOMASSA, POR FUNGOS, EM CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NOS ESTADOS LÍQUIDO E SÓLIDO.....	104
4.2.1 Atividade lipolítica específica .....	104
4.2.2 Atividade lipolítica específica e biossurfactante de <i>Penicillium sp.</i> e <i>Rhizomucor sp.</i> .....	105
4.2.3 Análise de óleos e graxas.....	107
4.2.4 Avaliação da produção de biomassa.....	108
4.3 BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE RESÍDUOS OLEOSOS DERIVADOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL COMO INDICADORA DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	109
4.3.1 Biodegradação aeróbia no SRAN.....	109
4.3.1.1 Produção de CO <sub>2</sub> .....	110

4.3.1.2 Teor de óleos e graxas.....	113
4.3.1.3 Produção de biomassa fúngica .....	113
4.2.2 Biodegradabilidade aeróbia no SRAE.....	114
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>116</b>
5.1 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASSES A PARTIR DE DIFERENTES AMOSTRAS AMBIENTAIS, EM MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS.....	116
5.1.1 Isolamento de fungos produtores de lipases a partir de diferentes amostras ambientais.....	116
5.1.2 Seleção de fungos produtores de lipases através do crescimento, índice enzimático (IE) e reação lipolítica apresentada em meios de cultura sólidos.....	121
5.1.3 Descrição das características morfológicas, identificação e classificação taxonômica dos isolados de fungos filamentosos produtores de lipases.....	124
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA ESPECÍFICA, ATIVIDADE BÍOSSURFACTANTE, REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS E PRODUÇÃO DE BIOMASSA, POR FUNGOS, EM CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NOS ESTADOS LÍQUIDO E SÓLIDO.....	131
5.2.1 Atividade lipolítica e produção de biomassa por isolados fúngicos com 120 horas em condições de fermentação em estado líquido (FEL) .....	131
5.2.2 Monitoramento da atividade lipolítica, atividade biossurfactante, remoção de óleos e graxas e, produção de biomassa pelos isolados F2 e F18, em condições de FEL e FES.....	133
5.3 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE RESÍDUOS OLEOSOS DERIVADOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL, COMO INDICADORA DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	142
5.3.1 Biodegração aeróbia de resíduos oleosos derivados do saneamento	

ambiental, não previamente esterilizados, em um sistema respirométrico estático (SRAN) .....	142
5.3.1 Biodegração aeróbia de óleo de soja comercial e de espuma de uma caixa de gordura do Restaurante Universitário da UFES, previamente esterilizados (SRAE) .....	150
6 CONCLUSÕES.....	156
7 TRABALHOS FUTUROS.....	157
8 REFERÊNCIAS .....	158
ANEXO A .....	194
ANEXO B .....	195

## 1INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, especialmente em áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Dentre aqueles de maior interesse, as reações de hidrólise, as de síntese e as de esterificação e transesterificação de lipídios, por meio de lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.1), cujo potencial de aplicação é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua régio e enantiosseletividade (JAEGER et al., 1994; JAEGER e REETZ, 1998; ROVEDA, 2007; ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA, 2010).

Lipídeos (gorduras, óleos e graxas) são o principal tipo de matéria orgânica em águas residuárias municipais e de algumas indústrias que, na maioria das vezes, as produzem com elevadas concentrações desses compostos ( $> 100 \text{ mg. L}^{-1}$ ), como as de refinarias de óleos comestíveis, frigoríficos, curtumes e indústrias de laticínios (MENDES et al., 2005). As conseqüências aos sistemas de tratamento de esgotos são: entupimento da canalização, mal funcionamento das estações de tratamento e limitação da transferência de oxigênio para a biomassa devido à geração de um filme lipídico na interface ar/água, com danos aos processos biológicos anaeróbios e aeróbios do sistema (WAKELIN e FORSTER, 1997; LEFEBVRE et al., 1998; VIDAL et al., 2000; CAMMAROTA, TEIXEIRA e FREIRE, 2001; CAMMAROTA e FREIRE, 2006). A excessiva presença de sólidos gordurosos gera também mau cheiro, transbordamento de fossas e caixas de gordura, necessidade de remoções da espuma produzida para aterros gerando poluição do solo e maior custo operacional das estações de tratamento (WILLEY, 2001). Conforme Mendiola *et al.* (1998), resíduos oleosos são considerados como sérios poluentes em ambientes aquáticos e terrestres por serem tóxicos aos organismos podendo impor sérios danos ecológicos.

A utilização de enzimas específicas como as lipases, com função hidrolítica, pode ser de grande interesse para correções nos sistemas biológicos de tratamento de efluentes, causados pelo alto teor de lipídios. Este tipo de tratamento vem sendo pesquisado e apresenta algumas vantagens, tais como a não geração de subprodutos

tóxicos, condições moderadas de operação, redução de custos em termos de energia, além de enzimas imobilizadas poderem ser reutilizadas, tornando o processo atrativo sob os pontos de vista econômico e ambiental (RIGO, 2004).

Em contrapartida ao anteriormente mencionado, triglicerídeos residuais podem constituir-se matéria prima para processos industriais, como a geração de biocombustíveis, em função do custo baixo ou custo inexistente, pela sua retirada ou minimização no ambiente, na qualidade de potenciais poluidores. Esta utilização tem sido estudada e defendida, ênfase crescente para a geração de biodiesel, a partir de óleos e graxas residuais do saneamento ambiental (SAIFUDDIN e CHUA, 2006). Óleos e graxas residuais (OGR), como o óleo residual de fritura, ácidos graxos, espuma de caixas de gordura e esgoto sanitário, enquanto matérias primas para a geração de biodiesel, podem contribuir significativamente para a redução dos custos de produção, além de caracterizar-se o processo como um tratamento sanitário. Tais matérias primas estão disponíveis junto aos centros urbanos, embora em pequena quantidade quando comparada à demanda energética.

Sob o ponto de vista da demanda de energia e, de acordo com dados do Programa de Eficiência Energética em Saneamento Ambiental (PROCEL SANEAR, 2004), do Ministério de Minas e Energia, o setor de saneamento utiliza 2,3% do total de energia elétrica consumida no País. Isso equivale a 7,0 TWh/ano. Nos sistemas de saneamento, a energia elétrica é utilizada principalmente nos conjuntos motobomba dos sistemas de abastecimento de água, transporte do esgoto e no tratamento de água e esgotos. As despesas com energia elétrica têm sido crescentes no setor e podem ser consideradas, em muitos casos, como a segunda maior despesa dentre os custos operacionais (MME, 2005).

Atualmente, os investimentos para a exploração da interface tecnológica entre saneamento ambiental e geração de energia limpa vêm sendo estimulados pelas “mudanças climáticas”, através dos recursos financeiros provenientes dos créditos de carbono. Nesse contexto, Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) também iniciam investimentos no aproveitamento energético de seus efluentes. As ETEs norte-americanas começam a aproveitar o gás para combustão e a gordura para biodiesel. As ETEs australianas convertem o lodo em carvão e óleo combustível. O Brasil tem potencial para a geração de 220 milhões de litros de biodiesel ao ano – cálculo que toma como base o tratamento de apenas 42% do esgoto gerado no País. A iniciativa,

chamada de “saneamento energético”, conta com a perspectiva de gerar 11% da produção estabelecida pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (OLIVEIRA et al., 2008).

O biodiesel (monoésteres de ácidos graxos) é produzido a partir da transesterificação e ou esterificação de matérias primas oleosas com fontes renováveis, não produz óxido de enxofre e minimiza em 1/3 a emissão de particulados em comparação com o óleo diesel, além de ser biodegradável. Em função destas e de outras vantagens ambientais e, ao fato de não exigir adaptações dos motores a diesel, é considerado um substituto natural para o diesel, já sendo a este parcialmente acrescentado para a comercialização (ANP, 2010). oleaginosas, têm sofrido, na atualidade, algumas restrições, devido a possíveis concorrências com o sistema de produção de alimentos e, inevitavelmente, os preços finais para o consumidor (FUKUDA, KONDO e NODA, 2001; FACCIO, 2004).

A manipulação de microrganismos lipolíticos apresenta-se como uma ferramenta para o tratamento de efluentes oleosos, diretamente, como no caso da utilização de células integras (biomassa lipolítica) imobilizadas, na forma de biofilme ou indiretamente como fontes de lípases aplicadas de forma livre, no pré-tratamento destes efluentes, neste caso, geralmente com custos mais elevados (EL-MASRY, EL-BESTAWI e EL-ADL, 2004; SAIFUDDIN e CHUA, 2006). Microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos que degradam substratos insolúveis em água como gorduras, óleos e graxas, dentre outros, usualmente também produzem surfactantes, que atuam como detergentes e auxiliam na disponibilidade destes compostos à célula microbiana através das emulsões formadas. Desta forma, a atividade lipolítica exercida é função também da atividade surfactante, e vice-versa, dependendo ambas da estirpe microbiana e das reacionais envolvidas (HABA et al., 2000). De forma idêntica apresentam-se tais microrganismos, quanto à biocatálise enzimática em processos de geração de biodiesel, principalmente quando se preconiza, a utilização de matérias primas residuais como o lodo de esgoto, a espuma de caixa de gordura e o óleo residual de fritura, para a geração de biodiesel. Tais resíduos são caracterizados por elevados teores de ácidos graxos livres e de água, inviabilizando, por tais motivos, a catálise química alcalina, e por outros, a catálise ácida (BAJAJ et al., 2010; SINGH e SINGH, 2010).

Em função do considerado anteriormente e, da diversidade microbiana da qual dispõe o País, são importantes pesquisas de novas fontes de lipases, em prol da viabilidade econômica de sua utilização em hidrólise e transesterificação biocatalítica de óleos e graxas residuais (OGR), no tratamento de efluentes oleosos e na produção de biodiesel, visto que os custos têm sido o principal fator limitante (BAJAJ et al., 2010; SINGH e SINGH, 2010). Os fungos (filamentosos e leveduriformes) são fontes preferenciais de lipases para uso comercial, pois estas são geralmente extracelulares, facilitando a sua extração do meio fermentado e, também por serem eles considerados microrganismos seguros (com exceções) para a manipulação, além da expectativa crescente do seu emprego, na forma de células lipolíticas integrais imobilizadas, nos processos reacionais (PIMENTEL, 1996; COLEN, 2006). Neste contexto, é importante a investigação da biodegradabilidade do resíduo oleoso, estimada de forma indireta através da razão DQO:DBO, cujos valores são obtidos físico-quimicamente (ideais em torno de 2,0), através de métodos diretos, como a respirometria aeróbia, que tem como variável de resposta o consumo de oxigênio ou a produção de CO<sub>2</sub>. Em ambos casos, a biodegradabilidade aeróbia reflete o potencial de utilização dos resíduos oleosos por microrganismos especializados na sua degradação, permitindo avaliar, de forma indireta, o seu potencial lipolítico, quando paralelamente quantifica-se a remoção de óleos e graxas dos resíduos e a biomassa microbiana produzida (SEMIONATO, 2006; LIMA JUNIOR, 2009; RODRIGUES et al., 2009 c e d; CASSINI et al., 2009 c).

A produção de biomoléculas através de processos de fermentação no estado sólido, constitui-se em uma alternativa de baixo custo, pela possibilidade de utilização de resíduos oleosos ambientais (OGR) e agroindustriais, como substratos para a produção de lipases e ou de surfactantes por estes microrganismos. O baixo custo e a abundância de materiais residuais contribuem para a redução do custo de produção (DAMASO et al., 2008; CASTIGLIONI, BERTOLIN e COSTA, 2009). Adicionalmente, este tipo de fermentação, que se caracteriza pelo crescimento microbiano em sólidos úmidos, têm-se mostrado ser uma maneira eficiente para a produção de enzimas, especialmente por fungos filamentosos, visto que propicia aos microrganismos condições ambientais similares ao seu *habitat* natural. Portanto, sistemas de respirometria aeróbia, quando reacionais em fase sólida (SPR), adequam-se bastante à avaliação de fungos filamentosos com potencial lipolítico, facultando condições

similares à de biodegradação de resíduos oleosos no solo, quando simulado o substrato-suporte com a mistura de areia e vermiculita (LIMA JUNIOR, 2009; RODRIGUES et al., 2009 d; CASSINI et al., 2009 c e 2010 b).

Finalmente e de forma geral, na atualidade, as principais abordagens exploradas em catálise biológica envolvem transformações em uma única etapa utilizando enzimas isoladas (livres) e imobilizadas, células íntegras e processos multienzimáticos. Frente a um aumento significativo da pressão com relação a fatores ambientais, econômicos e uso de fontes renováveis de energia, a obtenção de matérias-primas químicas utilizando métodos envolvendo biocatálise e biotransformação apresenta-se como importante alternativa e ferramenta tecnológica atrativa (OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, selecionar e caracterizar fungos produtores de lípases a partir de resíduos oleosos do saneamento ambiental, para futura utilização em processos enzimáticos de tratamento de efluentes oleosos e geração de biodiesel.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, selecionar e caracterizar fungos produtores de lipases a partir de diferentes amostras ambientais, em meios de cultura sólidos.
- Avaliar a atividade lipolítica específica, a atividade surfactante, a remoção de óleos e graxas e a produção de biomassa, por fungos, em condições de fermentações nos estados líquido e sólido.
- Avaliar a biodegradação aeróbia de resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental, como indicadora de atividade lipolítica de fungos filamentosos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LIPASES

##### 3.1.1 Conceito e importância de lipases para biocatálise

A biocatálise enzimática é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado, visto que a natureza quiral das enzimas resulta na formação de produtos de maneira altamente estereoseletiva e regioseletiva, em condições neutras e aquosas, apresentando ainda possibilidade de desenvolvimento de elevado número de ciclos catalíticos. Além disso os biocatalisadores permitem a biotransformação de compostos polifuncionalizados e sensíveis em condições amenas, ao contrário das variantes químicas correspondentes que exigem condições reacionais severas (GOLDBECK, 2008, OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009).

As transformações químicas que ocorrem nos sistemas vivos são promovidas por centenas de milhares de enzimas que atuam catalisando a conversão de um conjunto de substratos em produtos específicos. A Tabela 1 sintetiza a classificação de enzimas e os tipos de reações mais comuns promovidas pelas subclasses de enzimas mais utilizadas na atualidade para diferentes processos, bem como os percentuais relativos de aplicação, de acordo com Oliveira e Mantovani (2009).

Utilizando um sistema altamente eficiente para a conversão de energia, os sistemas biológicos são ricos em catalisadores que atuam como agentes químicos ambientalmente amigáveis, com um máximo de economia de carbonos e gerando poucos resíduos (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006 e 2009; OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009).

As lipases (E.C.3.1.1.3) são glicerol éster hidrolases capazes de hidrolisar triacilgliceróis (principais componentes de óleos e gorduras) liberando ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis, atuando na interface óleo-água, onde ocorre um aumento da atividade da enzima. Essas enzimas também catalisam reações de esterificação e transesterificação quando presentes em meios aquo-restritos (SHIMADA et al., 2002; JAEGER et al., 1994; JAEGER e REETZ, 1998; JAEGER e

EGGERT, 2002). As principais reações catalisadas por lipases são apresentadas na Figura 3.

Tabela 1 - Classe de enzimas e suas aplicações em processos

Classe de enzimas	Subclasses mais utilizadas	Reações mais comuns	Aplicação
Hidrolases	Esterases, lipases, amidases (proteases e acilases, fosfatases e epóxido hidrolases)	Hidrólise e formação de ésteres, amidas, fosfato e hidrólise de epóxidos	60%
Oxidoredutases	Desidrogenases, mono e dioxigenases, peroxidases	Oxidadação e redução de alcoóis, epoxidação, hidroxilação de alcenos e alcanos	25%
Transferases	Quinases	Fosforilação (dependente de ATP)	5%
Ligases	Aldolases, transaldolases, glicosidases, transaminases	Reação aldólica, formação de ligação glicosídica, formação de ésteres sulfato e ligação C-N	1%
Liases	Carboxiliases, amônia-liases, hidroliases	Adição e eliminação em ligações como C=C, C=O, C=N	5%
Isomerases	Racemases, epimerases	Isomerizações como racemização, epimerização, rearranjos	1%

Fonte: Oliveira e Mantovani (2009)

A hidrólise enzimática de óleos e gorduras constitui-se numa alternativa que procura superar os inconvenientes associados aos processos físico-químicos. Utilizando lipases e promovendo a reação em condições brandas de temperatura e pressão é possível obter produtos com baixo custo energético (GANDHI, 1997; CASTRO et al., 2004). Adicionalmente, a utilização de lipases no processamento de óleos e gorduras ultrapassa os interesses da simples hidrólise, contemplando diversas transformações como esterificação e interesterificação (PASTORE, 1992; NASCIMENTO, COSTA NETO e MAZZUCO, 2001; CASTRO et al., 2004).

Devido às diferentes reações que são capazes de catalisar e às suas características de regio e enantiosseletividade, as lipases, conforme Sharma, Chisti e Banerjee

(2001), além de sua utilização em áreas tradicionais, como a indústria de detergentes e alimentícia, vêm apresentando crescente utilização nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, de química fina, óleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais e domésticos (CASTRO et al., 2004).

Atualmente, a utilização de lipases em biocatálise ambiental vem ao encontro da forte tendência dos governos de intensificar as restrições à poluição ambiental. As técnicas de tratamento enzimático tem despertado mais atenção devido a regulações ambientais mais rigorosas e por serem consideradas tecnologia limpa e amigável (GANDHI, 1997; JUNG, CAMMAROTA e FREIRE, 2002).

No caso brasileiro o controle ambiental é ainda mais relevante à preservação dos ecossistemas que, em função da sua extensão e biodiversidade, constituem um ativo de valor incalculável, além de garantir a representatividade nacional no cenário mundial. Porém, quando se pensa na expansão da utilização de lipases em processos industriais e de saneamento ambiental, o custo elevado destas enzimas é ainda um impecilho, conforme Mendes et al. (2005).

### **3.1.2 Características das lipases**

#### **3.1.2.1 Físico-químicas**

As propriedades físico-químicas das lipases apresentam grande diversidade não só decorrentes das características do microrganismo produtor, com também pelas diferenças cinéticas entre duas ou mais isoenzimas produzidas pela mesma espécie. Para tanto, é de fundamental importância o estudo da temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e de pH, e outros parâmetros que são decisivos na hora do dimensionamento de um processo enzimático (MALDONADO, 2006).

Existe uma diversidade muito grande de lipases que podem ser obtidas a partir de microrganismos e estas podem apresentar características muito distintas entre si. Há lipases que tem sua atividade ótima em pH ácido, outras atuam próximo à neutralidade e, ainda aquelas ditas alcalinas. Geralmente, a maioria das lipases fúngicas apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade ao pH que oscila entre 6,0 e 8,0 (FREIRE et al., 1997).

Em relação à temperatura ótima também há um amplo espectro de lipases atuando em várias faixas de temperatura. Os valores ótimos de atividade e estabilidade, em geral, situam-se na faixa de 30 a 40°C, com exceção das lipases provenientes de fungos termófilos, que são estáveis em temperaturas superiores a 55°C (FREIRE et al., 1997; MALDONADO, 2006).

Segundo Castro e outros (2004), dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo que as lipases microbianas, de forma geral, tendem a superar aquelas originárias de outras fontes, quanto à estabilidade térmica.

### **3.1.2.2 Estrutura e mecanismo de atuação**

As lipases pertencem à classe das serino hidrolases, e, ao contrário da maioria das enzimas extracelulares de origem microbiana, não necessitam da presença de cofatores para que possam atuar. Sua ação sobre triglicérides é fortemente aumentada na interface lipídeo-água. Este fenômeno, conhecido como ativação interfacial, tem sido explicado pelo fato de que a estrutura da molécula da enzima possui uma tampa hidrofóbica, permanentemente apoiada sobre o sítio catalítico na ausência de substrato. Quando se liga ao substrato ou inibidor, esta tampa é deslocada e, provavelmente, interage com a matriz lipídica (JAEGER et al., 1994; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Estas enzimas mostram uma característica padrão conhecida como o dobramento de  $\alpha/\beta$  hidrolase, com o sítio ativo composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato), conforme observado na Figura 1. A estrutura tridimensional das lipases fornece uma explicação elegante para a ativação interfacial, atribuída à cobertura do sítio ativo pelo referido dobramento, também denominado de tampa (ou borda). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo,

expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (CASTRO et al., 2004; DALLA VECHIA, 2004).

O resíduo nucleofílico serina, é localizado no C-terminal da fita  $\beta$ 5 de um pentapeptídeo GX SXG altamente conservado, formando uma característica principal “ $\beta$  em torno de  $\alpha$ ”, designada como a cavidade nucleofílica. O sítio é composto de uma folha  $\beta$  central consistindo de 8 diferentes fitas  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 8) conectadas com seis  $\alpha$ -hélices (A-F) (JAEGER e EGGERT, 2002; JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; CASTRO et al., 2004).

A hidrólise do substrato inicia-se com o ataque nucleofílico pelo oxigênio da serina no átomo de carbono carbonílico na ligação éster, levando à formação de um intermediário tetraédrico estabilizado pelas ligações do hidrogênio a átomos de nitrogênio de resíduos da cadeia principal pertencente à cavidade de oxiânion. Um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado com a liberação dos ácidos graxos e regeneração da enzima (JAEGER e EGGERT, 2002; CASTRO et al., 2004).

As reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídeo podendo, em alguns casos, impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, que só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea (SHARMA et al., 2001).

Substratos lipolíticos usualmente formam um equilíbrio entre os estados monoméricos, micelar e emulsificados, resultando na necessidade de um modelo de sistema adequado ao estudo da cinética da lipase. A técnica de camada única tem sido usada extensivamente e, mais recentemente, a tecnologia gota-óleo foi proposta para estabelecimento da cinética da lipase, que é monitorada pela análise automática do perfil de uma gota de óleo suspensa em água. A redução na tensão superficial entre o óleo e a água causada pela hidrólise da lipase é medida em função do tempo (JAEGER e EGGERT, 2002).

O fenômeno mais conhecido originado de estudos cinéticos recentes de reações lipolíticas é a “ativação interfacial”, que relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, que formam emulsão. Lipases, diferentemente das esterases, são definidas como carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados (CASTRO et al., 2004).

Recentemente, revelou-se que a presença de uma estrutura em forma de tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e uma lipase pancreática não específica, não demonstraram ativação interfacial, embora apresentem uma “tampa” anfifílica cobrindo seus sítios ativos. Esta observação sugere que a presença de uma tampa dominante e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como a lipase. Portanto, a definição atual é bastante simples: uma lipase é uma carboxilesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa (JAEGER e EGGERT, 2002; CASTRO et al., 2004).

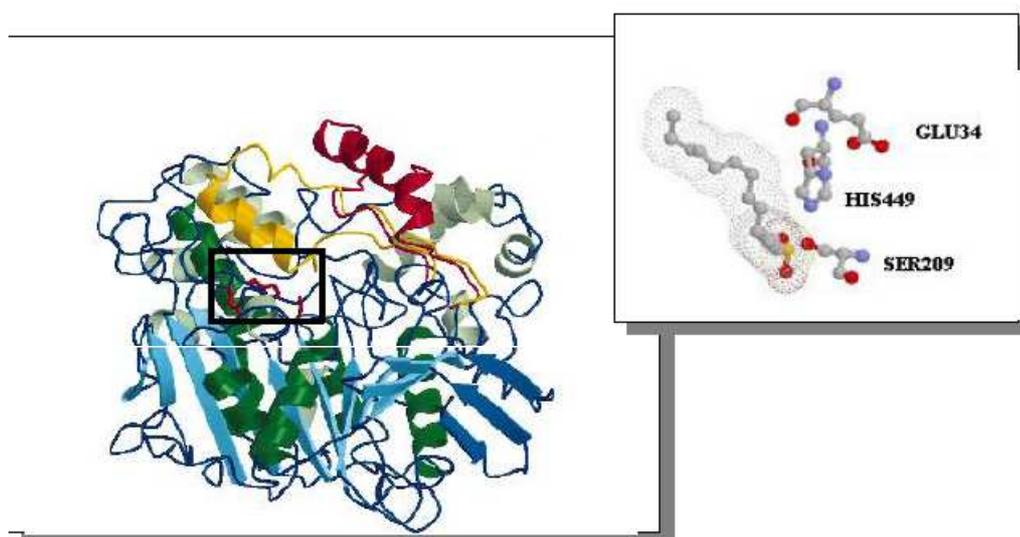


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida rugosa* e ampliação do sítio ativo  
Fonte: Dalla Vecchia (2004).

### 3.1.2.3 Propriedades

Segundo Carvalho e outros (2005), a importância do uso de enzimas (lipases) em biocatálise tem se mostrado cada vez mais evidente devido à grande versatilidade das reações catalisadas. As propriedades catalíticas das lipases como seletividade e estereoespecificidade, podem ser extremamente fáceis de ser controladas por condições de reação. Esta dependência das propriedades catalíticas das lipases com seu meio reacional pode ser uma consequência do seu mecanismo de ação complexo, que envolve mudanças conformacionais significantes na sua estrutura. Isto

sugere que as lipases são muito susceptíveis às mudanças na interação entre a sua superfície e o meio, que podem modificar o equilíbrio entre a estrutura aberta e fechada, e talvez, a forma do centro ativo. A especificidade das lipases é fator crucial na determinação de suas potenciais aplicações em processos industriais. A descoberta de lipases com especificidades diferentes das já reportadas na literatura, através de programas de isolamento e seleção, poderia ampliar o seu campo de aplicação nas áreas de química fina e de óleos e gorduras. Esta propriedade de atuarem seletivamente sobre seus substratos depende da fonte da enzima e apresenta, a exemplo das demais propriedades gerais, uma grande diversidade (FREIRE et al., 1997; CASTRO et al., 2004).

#### **3.1.2.3.1 Especificidade ou regiosseletividade**

Grande parte das lipases apresenta a propriedade de hidrolisar preferencialmente um determinado grupo de substratos (especificidade de substrato), em geral relacionado ao tamanho da cadeia carbônica ou grau de insaturação do grupo acil em questão (GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004).

Conforme Castro e outros (2004), lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais, podendo ser específicas com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. Ainda, segundo estes autores, as lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade:

a) Lipases não específicas catalisam a hidrólise completa dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, apresentando monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários, atuando de modo aleatório. As moléculas de acilglicerol são quebradas na posição randômica produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior.

b) Lípases 1,3 específicas catalisam a hidrólise dos ácidos graxos ligados ao C1 e C3 do glicerol, produzindo ácidos graxos 2-monoacilgliceróis ou 1,2- ou 2,3-diacilgliceróis, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil produzindo 1,3-diacilgliceróis e 1- ou 3- monoacilgliceróis. Por essa razão os produtos formados

apresentam composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não regioseletivas ou mesmo pelo catalisador químico. Neste grupo, tem-se como exemplo, as lipases produzidas por *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei* e por várias espécies de *Rhizopus*.

c) Lipases ácido graxo específicas são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em cis no carbono 9, como a lipase produzida pelo *Geotrichum candidum* que, devido à esta especificidade, tem sido estudada para alcóolise de óleos selecionados que contém ácidos graxos poliinsaturados.

As lipases podem ainda possuir um tipo de especificidade denominada estereoespecificidade, que é a habilidade em discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica (JAEGER e EGGERT, 2002; CARVALHO et al., 2005). Estereoespecificidade é a propriedade das lipases de reagirem em diferentes velocidades com dois enantiômeros gerando, depois de determinado tempo de reação, um excesso enantiomérico que possibilita a resolução de racematos e a obtenção de compostos opticamente puros. Alguns autores atribuem esta propriedade das lipases ao fato de serem enzimas constituídas apenas por L-aminoácidos o que as tornaria catalisadores quirais (CARVALHO et al., 2005; KÖHLER e WÜNSCH, 2007).

Köhler e Wünsch (acesso em 30 nov. 2010) desenvolveram uma teoria que descreve o mecanismo de regulação da homeostase energética e do metabolismo de gorduras, durante o desenvolvimento de uma síntese enantiosseletiva usando lipase de *Mucor miehei*, que denominaram de modulação alostérica da lipase, que promove variação de sua seletividade, com importante função biológica na natureza. Neste modelo, o sítio ativo da lipase está na superfície da célula, enquanto o sítio alostérico é localizado intracelularmente (Figura 2 A). Triglicerídeos e diglicerídeos são hidrolisados extracelularmente e os produtos monoglicerídeos e glicerol são absorvidos pela célula. Neste sistema, a extensão da hidrólise extracelular é controlada pela concentração dos produtos presentes dentro da célula, por isso, são hidrolisados os tri e diglicerídeos que são mais importantes para a célula. Concluíram pela existência de dois tipos principais de lipases: a) Lipases tipo 1, como exemplo a de *Burkholderia cepacia*, que hidrolisa triglicerídeos em grande extensão sem qualquer tipo de controle e, b) Lipases tipo 2, que inclui a de *M. miehei*,

que regula a conversão de glicerídeos dependendo da concentração dos substratos (Figura 2 B).

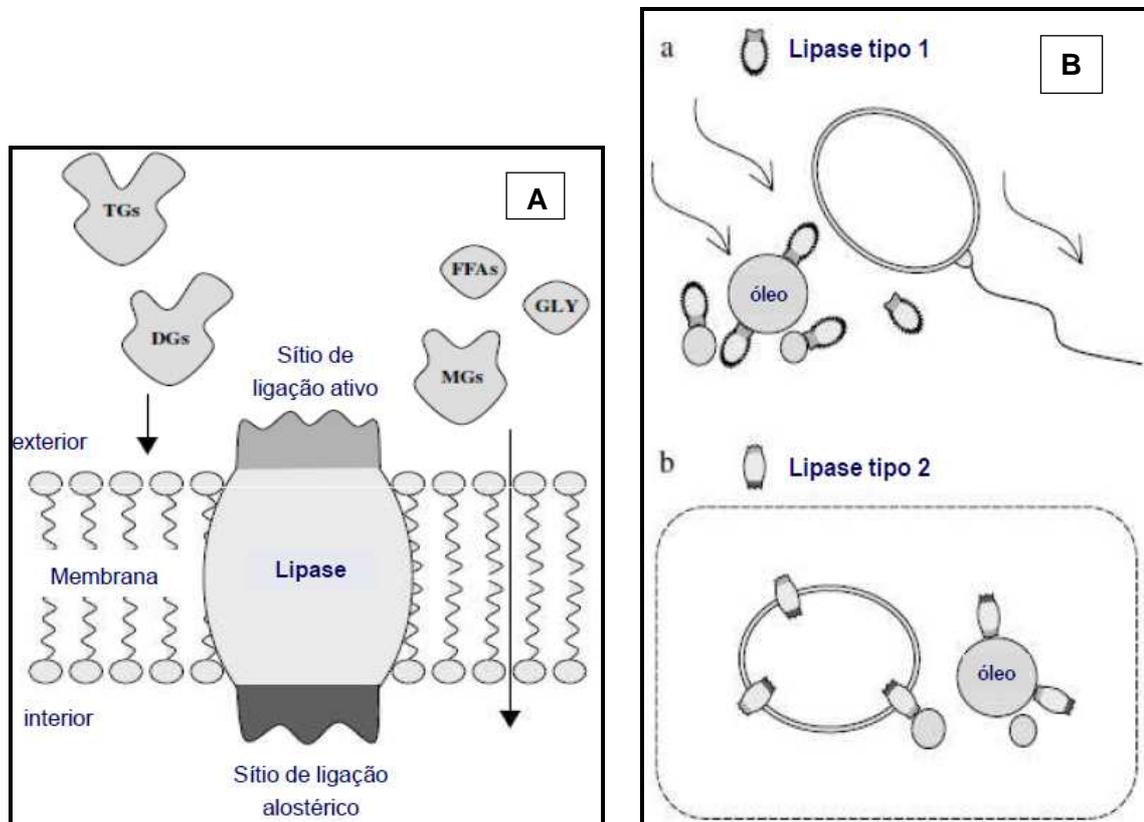


Figura 2 - Modulação alostérica de lipase de *Rhizomucor miehei*, segundo mecanismo de regulação homeostase energética no metabolismo de gorduras pelo fungo (A) com produção de dois tipos de lipases (B)

Fonte: Köhler e Wünsch (acesso em 30 nov. 2010).

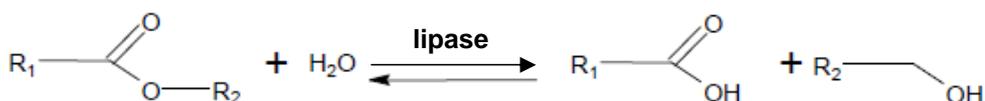
### 3.1.2.3.2 Reações

Embora a função natural das lipases seja quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), liberando ácidos graxos, monoacilgliceróis ou diacilgliceróis, estas enzimas são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos (Figura 3). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para efetuar reações de interesterificação (acidólise, alcóolise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados e das condições reacionais (CASTRO et al., 2004).

Pela escolha correta da enzima e do substrato, tais reações podem ser fortemente influenciadas por estereoisomeria e, pela modificação das condições de reação, pode-

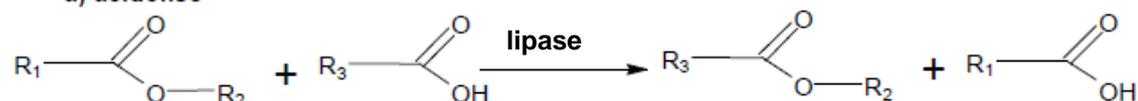
se alterar o equilíbrio termodinâmico em favor da síntese. O mecanismo da reação é similar para todas as reações mediadas por hidrolases. É formado um complexo acil-enzima, seguida da subsequente liberação dos produtos finais. O tipo da reação é definido empregando-se os parâmetros que asseguram que tais reações ocorram, como seleção de solvente, hidratação da enzima, tempo de reação, concentração do substrato, tamanho do substrato e sua estrutura química ( PERSSON et al., 2002).

### Hidrólise e esterificação



### Transesterificações

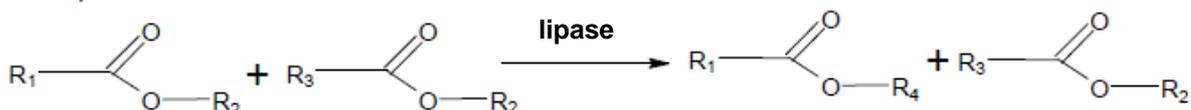
#### a) acidólise



#### b) alcóólise



#### c) troca de éster



#### d) aminólise



Figura 3 – Principais reações catalisadas por lipases

Fonte: Rosa (2008).

A atividade hidrolítica da lipase pode ser diretamente relacionada com sua atividade de síntese, mas é independente de sua atividade de interesterificação. Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (CASTRO et al., 2004).

A velocidade da reação não é determinada pela concentração de lipídeos na emulsão (triacilglicerol), mas sim pela área superficial da emulsão das partículas por unidade

de volume. A atividade lipásica, bem como a sua produção e, indiretamente, a taxa de crescimento do microrganismo produtor são influenciadas pelo tamanho da partícula da emulsão e sua estabilidade (JAEGER e EGGERT, 2002).

O tamanho das gotículas de óleo e a área da interface sofrem mudanças contínuas, e assim, a atividade lipásica varia não só em função da concentração do substrato, mas também, em função do tamanho da área da interface óleo-água. É importante que haja na emulsão do substrato uma interface ampla e estável de gotículas lipídicas, para o ensaio controlado da atividade lipásica. Somente em emulsões de óleo em água (O/A) perfeitamente dispersas, homogêneas e bem estabilizadas, as determinações da atividade lipásica fornecem resultados reprodutivos (CASTRO et al., 2004).

Qualquer tipo de modificação na interface reflete na atividade lipásica. Essas interferências podem ser causadas por proteínas, sais biliares, ácidos graxos, surfactantes, mono e diacilgliceróis, resultantes do triacilglicerol durante a ação da lipase (JAEGER e REETZ, 1998).

### **3.1.3 Microrganismos produtores de lipases**

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais (lipases pancreáticas, hepáticas e gástricas), vegetais e microbianas. Segundo Sharma, Chisti e Banerjee (2001), as lipases são produzidas por muitos microrganismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos. Muitas lipases úteis comercialmente são de origem microbiológica.

Vários microrganismos são capazes de sintetizar enzimas. Usualmente, mais de um tipo de enzima hidrolítica é sintetizado, garantindo deste modo, o consumo de vários tipos de substratos e a subsistência do microrganismo. Entretanto, a triagem de microrganismos produtores de enzimas é de grande importância para o descobrimento de novas enzimas, mais estáveis e seletivas, podendo ser usadas para biocatálise e sínteses orgânicas (CARDENAS et al., 2001a e 2001b; SANDOVAL e MARTY, 2007).

Considerando as fontes de obtenção e a forma de produção, as lipases microbianas apresentam uma série de vantagens, se comparadas com aquelas extraídas de animais e vegetais, relacionadas a algumas das suas características peculiares, como

especificidade e estabilidade, além do menor custo de produção, facilidade de produção e diversidade de microrganismos capazes de sintetizá-las (CASTRO et al., 2004; LIMA et al, 2004, COLEN, 2006). Estas enzimas são produzidas intra e extracelularmente em diversos microrganismos, por exemplo, nos fungos *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei* e nas bactérias *Bukholdeira cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium viscosum*. (JAEGER et al., 1994; JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; JAEGER e EGGERT, 2002; COLEN, 2006).

De acordo com Hasan, Shah e Hameed, (2006 e 2009), as lipases microbianas constituem um importante grupo de enzimas valiosas, devido à versatilidade de suas propriedades e a fácil produção em massa. São amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato, o que as torna muito atrativas para a aplicação industrial.

Considerando a grande disponibilidade e a alta estabilidade das lipases extracelulares provenientes de microrganismos, elas têm um significativo potencial para uso em biotecnologia. Sua produção é influenciada pelo pH, temperatura, agitação e composição do meio. O tipo de fontes de carbono e de nitrogênio pode afetar a biossíntese enzimática, e a presença de compostos lipídicos e surfactantes tem mostrado o aumento da produção em alguns casos, em função do aumento da permeabilidade das células, facilitando a passagem das moléculas através da membrana fúngica (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; OTERO, FERNÁNDEZ-PÉREZ e PÉREZ-GIL, 2005; LUZ, 2007).

A adição de alguns compostos como os surfactantes aumenta a permeabilidade das células, facilitando a passagem das moléculas através da membrana (LUZ, 2007). Mahadik e outros (2002) aumentaram em duas vezes a quantidade de lipase extraída após fermentação semi-sólida de *Aspergillus niger*, através da adição 0,5% de Triton X-100. Silva e outros (2005) realizaram a extração da lipase de *M. anisopliae* após o cultivo submerso deste microrganismo com a adição de surfactantes, sendo que os melhores resultados foram alcançados pela utilização de 0,25% de SDS e Tween 80. Outra estratégia é a adição destes compostos no meio de cultura antes da inoculação dos microrganismos. Tan e outros (2004) adicionaram Tween 60 no meio de cultura de produção de lipase por *P. camemberti* e houve aumento na quantidade de enzima presente no meio. Corso e Revah apud Luz (2007) utilizaram Tween 80 no meio de

cultura de produção de lipase por *Y. lipolytica* e conseguiram máxima atividade enzimática em concentrações de 0,5 a 2%. Helistö e Korpela apud Luz (2007) testaram a influência dos surfactantes não iônicos Triton X-100, Tween 20 e Tween 80, e dos surfactantes aniônicos álcool polivinílico (LALLS) e alquilbenzeno sulfonado linear (LAS) nos meios de cultura em cultivos de diferentes microrganismos e, verificaram que as maiores atividades lipolíticas de eucariotos foram em concentrações mais baixas de surfactantes se comparado com aquelas de procariotos.

Apesar de todos os avanços já alcançados, objetivando maximizar a síntese de lipase através do uso das cepas microbianas já conhecidas, a seleção de cepas selvagens hiperprodutoras ainda é uma técnica de grande importância, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade como o Brasil. Atualmente, há um grande interesse em encontrar espécies de microrganismos ainda não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria em geral, bem como otimizar processos de produção desses insumos a partir de microrganismos já conhecidos (PIMENTEL, 1996; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; COLEN, 2006; SEMIONATO, 2006; LIMA JUNIOR, 2009).

### 3.1.3.1 Bactérias

Lipases de natureza microbiana foram detectadas, inicialmente, em bactérias, então incluídas no gênero *Bacillus*: *B. prodigiosus*, *B. pyocyaneus* e *B. fluorescens*. Posteriormente estas bactérias foram classificadas como pertencentes às espécies *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente (JAEGER et al., 1994).

Atualmente sabe-se que diversas espécies bacterianas são produtoras de lipases, sendo as mais importantes, do ponto de vista industrial, as espécies pertencentes aos gêneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Alcaligenes* e *Pseudomonas*, sobressaindo-se esta última (WATANABE et al., 1977; KOUKER e JAEGER, 1987; JAEGER et al., 1994; JAEGER e REETZ, 1998; ARPIGNY e JAEGER, 1999; GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004). O rápido crescimento celular, em relação a outros microrganismos, é uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

As lipases bacterianas, em geral, são produzidas como consequência do crescimento em meios de cultura que contêm lipídio como fonte de carbono (óleos vegetais, ácidos graxos, glicerol ou tensoativos como o Tween) e uma fonte orgânica de nitrogênio. Apesar destas enzimas poderem atuar em ampla faixa de pH e temperatura, elas agem, preferencialmente, em condições alcalinas (GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004).

Conforme Jaeger e outros (1994), as lipases bacterianas desempenham importante papel no meio ambiente, prestando-se à hidrólise de gorduras presentes no esgoto doméstico, como no caso daquelas produzidas por algumas espécies de *Pseudomonas*.

### 3.1.3.2 Leveduras

O primeiro registro de uma levedura produtora de lipase (*Mycotorula lipolytica*) aconteceu na metade do século passado (PETERS e NELSON, 1948). Sabe-se que a habilidade das leveduras para sintetizar lipases está limitada a algumas espécies dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulopsis* e *Yarrowia*. Industrialmente, lipases de algumas espécies de bactérias e fungos filamentosos são produzidas em grandes quantidades, destinadas a uma diversidade de aplicações. No caso daquelas originadas de leveduras, no entanto, somente as de *Candida rugosa* (inicialmente denominada *C. cylindrica*) e *C. antarctica* têm tido papel de destaque quanto às suas aplicações (HADEBALL, 1991; DE MARIA et al., 2006; AMARAL, 2007; GONÇALVES, 2007).

A produção da lipase por leveduras, como *C. rugosa*, pode ser induzida pela adição de ácidos graxos ao meio de cultura, como o ácido oléico. A lipase desta levedura é composta por várias isoformas que apresentam ligeiras diferenças nas suas propriedades catalíticas (SHARMA, CHISTI e BANERJEE., 2001, DE MARIA et al., 2006; PUTHLI, RATHOD e PANDIT, 2006).

Jatta, Gunasekaran e Mohan (2009) estudaram a influência de vários fatores como o crescimento, pH, temperatura e meio de cultura sobre a produção de lipases extra e intracelulares por *Candida albicans* e, verificaram que ambas lipases foram produzidas. A condição ótima de produção deu-se em pH 7,0 e temperatura de 37°C, e o máximo de atividade lipolítica ocorreu com 24 h de de crescimento da levedura.

As lipases de *Candida* spp. apresentam excelente capacidade de esterificação, sem demonstrar especificidade posicional para os triglicerídeos, apresentando aplicação potencial para a síntese de ésteres de cadeia curta que podem ser usados como combustíveis na forma de biodiesel, neste caso como ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (NELSON, FOGLIA e MARMER, 1996; FUKUDA, KONDO e NODA, 2001; LEE, FOGLIA e CHANG, 2002).

Gonçalves (2007) avaliou a capacidade de produção de lipases de 11 cepas de leveduras, previamente isoladas da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*) e de amostras de terra enriquecidas com partes do fruto do abacateiro. A cepa melhor produtora, identificada como *Yarrowia lipolytica*, produziu 3,0 U/mL de lipase nas melhores condições, nas quais a produção de lipase foi aumentada em cerca de 5 vezes mais quando comparado ao resultado obtido com o meio basal utilizado.

Goldeback (2008), a partir de leveduras silvestres isoladas de diversas regiões do país, selecionou cepas produtoras de lipase, que foram em seguida estudadas e caracterizadas. Realizou-se uma triagem inicial a partir de 372 leveduras isoladas e selecionou-se 3 cepas com maior capacidade de produção de lipase e com maior capacidade biocatalítica na síntese de ésteres em meio orgânico a partir de diferentes triglicerídeos.

### 3.1.3.3 Fungos filamentosos

As fontes fúngicas têm sido também preferencialmente utilizadas para a produção de lipases, não necessariamente devido às suas melhores características em relação a lipases produzidas por outros microrganismos, mas sim porque em maioria não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS (Generally Regarded as Safe), conforme Jaeger et al. (1994).

Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *R. oryzae*, *Penicillium camembertii*, *P. roqueforti* e da levedura *C. rugosa* estão sendo comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivo em preparações digestivas e para síntese quiral (COLEN, 2006).

Sob o ponto de vista industrial, os fungos são os preferidos como fontes de lipases, pois as enzimas produzidas por eles geralmente são extracelulares, facilitando a sua extração do meio fermentado e, também por serem considerados microrganismos seguros, para aplicação na indústria de alimentos, de bebidas e indústria farmacêutica (PINHEIRO, 2006).

Os fungos filamentosos, dentre os microrganismos, são amplamente reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases, com várias patentes de aplicação da enzima tendo sido desenvolvidas, gerando ampla produção industrial (CARDENAS et al., 2001a). Lipases extracelulares são secretadas em quantidades significativas por algumas espécies de fungos filamentosos, quando estes são cultivados em condições apropriadas, e são facilmente separadas da massa micelial por filtração ou centrifugação. Apenas pequena quantidade de lipases tem sido encontrada dentro ou aderida ao micélio (COLEN, 2006).

Dentre os fungos filamentosos produtores de lipases pode-se citar as espécies: *Fusarium solani*, *P. restrictum*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *Gliocladium viride*, *F. lateritium*, *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis* (PIMENTEL, 1996; COLEN, 2006), *Mucor griseocyanus* (COCA e DUSTET, 2006), *Mucor* sp. (ABBAS et al., 2002) *P. aurantiogriseum* (LIMA et al., 2004), *P. verrucosum* (PINHEIRO, 2006), *Geotrichum candidum*, *G. ludwigii* (ZAREVÚCKA et al., 2005; MALDONADO, 2006), *P. chrysogenum* (CHO et al., 2007), *F. globulosum* (GULATI et al., 2005); *Rhizopus arrhizus*, *R. oligosporus* (IFTIKHAR e HUSSAIN, 2002), *R. homothallicus* (RODRIGUEZ et al., 2006); *Aspergillus niger* (MAHADIK et al., 2002), *A. japonicus* (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010).

Sobre a produção de lipases por fungos fitopatogênicos e entomopatogênicos, embora existam relatos, ainda são poucos. Podem ser citados em relação aos primeiros *Ustilago maydis* (KATSIVELA et al., 1995), *Aspergillus flavus* (PAU e OMAR, 2004), *F. oxysporum* (PRAZERES, 2006; PRAZERES, CRUZ e PASTORE, 2006; RIFAAT et al., 2010), *F. oxysporum* fsp. *vasinfectum* (RAPP, 1995), *Alternaria brassicicola* (BERTO et al., 1999) *F. solani* (MAIA et al., 1999) e *Colletotrichum gloeosporioides* (COLEN, 2006; BALAJI e EBENEZER, 2008). Quanto aos segundos, *Beauveria bassiana* (HEGEDUS e KHACHATOURIANS, 1988) e *Metarhizium anisopliae* (SILVA et al., 2005).

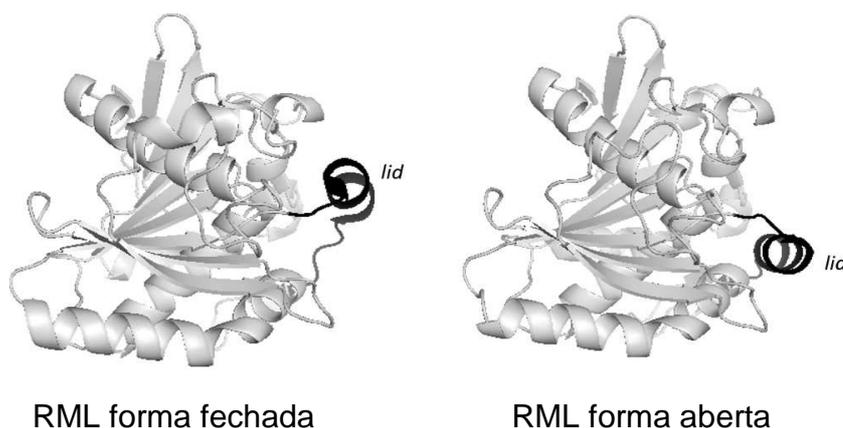


Figura 4 - Estrutura das formas fechada e aberta da lipase de *Rhizomucor mihei* (RML)

Fonte: Rodriguez e Fernandez-Lafuente (2010).

É importante citar a produção de lipases também pelo fungo controlador biológico de patógenos de plantas, *Trichoderma viride* (KASHMIRI, ADNAN e BUTT, 2006), o basidiomiceto comestível *Calvatia gigantea*, conhecido como “puffball” ou “bufa de lobo” (CHRISTAKOPOULOS et al., 1992) e o fungo termofílico *Humicola lanuginosa* (OMAR, NISHIO e NAGAI, 1987), também foram relatados como produtores de lipases extracelulares.

A produção de lipases pelos fungos filamentosos é influenciada por uma variedade de fatores ambientais (condições de cultivo), como pH do meio de cultivo, temperatura, tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, disponibilidade de oxigênio, presença e concentração de íons  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , dentre outros. Também a concentração e o tipo de inóculo utilizado são fatores influenciadores (GUTARRA et al., 2005). Além disso, as respostas aos fatores ambientais são, também, diferentes entre as espécies e ou isolados fúngicos sendo que, para um determinado isolado o mesmo fator pode estimular a produção, mas para outro pode não afetar ou até mesmo inibi-la. Isso pode ser constatado, a título de exemplos, com os dados obtidos por vários pesquisadores quando estudaram a produção de lipases por alguns fungos filamentosos, importantes decompositores, como *Geotrichum* sp., *G. candidum*, *Geotrichum*-like R59, *Aspergillus* spp., *Mucor*, *Fusarium* spp., *P. citrinum*, *P. restrictum*, *P. aurantiogriseum*, *Rhizopus*, *R. oryzae* KG-10 e, a atividade lipolítica micelial do fungo *A. niger* MYA 135 (MACRIS, KOURENTZI e HATZINIKOLAOU, 1996; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; ELLAIAH et al., 2004; GULATI et al., 2005; COLEN, 2006; MALDONADO, 2006; D' ANNIBALE et al., 2006; AZEREDO et

al., 2007; LUZ, 2007; SHUKLA et al., 2007; YAN e YAN, 2008; GOMES e FREIRE, 2010).

Kunimoto, Kaneniwa e Kaminishi (1997) estudando a produção de lipase intracelular pelo fungo *Aspergillus oryzae* IFO 4202, verificaram sua inibição em função do conteúdo de ácidos orgânicos do meio de cultivo. O conteúdo de triacilglicerídeos no micélio fúngico decresceu durante o período de cultivo do fungo, sugerindo que lipase intracelular toma parte na utilização de lipídeos (hidrólise no micélio) como fonte de carbono para a célula.

### **3.1.4 Processos fermentativos na produção de lipases fúngicas**

A produção de enzimas fúngicas, em escala industrial no mundo ocidental tem sido realizada pelo cultivo do fungo em meio de cultura líquido (fermentação submersa), cujas fontes de nutrientes são solúveis, como processo majoritário, provavelmente por ser tecnologicamente fácil de executar e controlar, bem como apresentar rendimentos de produção considerados satisfatórios (SANT'ANNA JR, 2001; MAIA et al., 2001; WOLSKI, 2008). Segundo Wolski (2008) e Iftikhar e outros (2010), o processo de fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros como pH, temperatura, aeração, umidade e concentração de oxigênio dissolvido no processo, principalmente se monitorados por sensores adequados.

A produção de lipases fúngicas por fermentação submersa pode ser realizada em diferentes sistemas, como em escala laboratorial em frascos agitados (como exemplo, erlenmeyers) e agitadores de bancada, como em escala industrial, em fermentadores industriais (MAIA et al., 2001; ELLAIAH et al., 2004; MAHADIK et al., 2004). Os tipos de fermentadores podem ser operados de forma contínua, semi-contínua ou descontínua. De acordo com Pinheiro (2006) no regime contínuo há uma constância na entrada de substrato conforme as necessidades do microrganismo e na saída do meio fermentado. Segundo Shu e outros (2006) e Li, Du e Liu (2007), os processos descontínuos podem ser conduzidos na forma de batelada, isto é, quando quantidades únicas de substrato são fornecidas ao microrganismo no início do experimento. Este processo é muito utilizado na produção de enzimas, devido ao seu

baixo custo, porém necessita de uma maior vigilância operacional para assegurar a reprodutibilidade e constância das propriedades do produto.

Uma das desvantagens da fermentação submersa em relação à fermentação no estado sólido (meio de cultura sólido) é o fator econômico, devido aos meios utilizados no preparo da fermentação submersa (meio de cultura líquido) apresentarem alto custo. De acordo com Acuna–Argueles e outros (1995) e Iwashita (2002) a diferença das condições entre os cultivos com os dois processos pode levar a modificações na expressão de vários genes que resulta na alteração de fenótipos importantes como crescimento, desenvolvimento, produção de enzimas e produção de metabólitos secundários, como micotoxinas, por exemplo. Além disso, as lipases produzidas pelos processos submersos requerem etapas posteriores de separação, purificação e imobilização em um suporte, por processos complexos para uso prático, gerando lipases instáveis e de custo elevado (BAN et al., 2002).

Com o atual estado da arte, tem-se verificado que o processo de fermentação em substrato sólido, tem-se mostrado superior ao de fermentação em substrato líquido para a produção de lipases por fungos filamentosos, tendo-se ampliado o número de pesquisas com esta finalidade em todo o mundo e, particularmente no Brasil, em função da grande disponibilidade e o baixo custo de resíduos oleosos e agroindustriais (MAHADIK et al., 2002; VARGAS, 2004; PAU e OMAR, 2004; GUNASEKARAN e DAS, 2005; CAVALCANTI et al., 2005; DALSENTER, 2005; FALONY et al., 2006; DUTRA, 2007; AZEREDO et al., 2007; MACAGNAN, 2007; FERNANDES, 2007; MENONCIN, 2007; DAMASO et al., 2008; BALAJI e EBENEZER, 2008; DUTRA et al., 2008; COELHO, 2009, RIGO, 2009; PANDEY et al., acesso em 03 out. 2010).

Em pesquisa de bancada a fermentação em estado sólido apresenta vantagens biotecnológicas significativas: maior produtividade; o produto final é formado em concentração mais alta e de maior estabilidade nos caldos fermentados; o processo é menos susceptível à repressão catabólica; o processo permite o emprego de cultivos com microrganismos adaptados a substratos insolúveis em água; há menor exigência pela esterilidade do meio de cultura devido à baixa atividade de água presente no substrato (HÖLKER, HÖFER e LENZ, 2004; RIGO, 2009). No entanto, o escalonamento até o nível industrial com este processo ainda apresenta dificuldades devido ao aparecimento de gradientes de temperatura, de pH, de O<sub>2</sub> livre, de

substrato e de umidade no meio fermentativo, problemas que, para serem solucionados, requerem grandes esforços na área da engenharia. Conforme Pandey e outros (acesso em 03 out. 2010) faltam ainda os mecanismos de controle sofisticados existentes na fermentação submersa, pois na literatura ainda são poucos os modelos de biorreatores disponíveis em sistemas reacionais em fase sólida que consigam o controle de parâmetros como pH, temperatura, aeração, umidade e transferência de oxigênio.

### **3.1.5 Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases**

A descoberta de linhagens microbianas potencialmente interessantes está fundamentada na capacidade de adaptação dos microrganismos aos diversos ambientes – quanto maior for a variedade de ambientes aos quais estiverem adaptados, em decorrência da complexidade química do mundo que os envolve, maior será a chance de existir linhagens produtoras de alguma substância de interesse (COLEN, 2006).

O crescente mercado exige a seleção de novos microrganismos que apresentem melhores taxas de produção de lipases, e adequadas propriedades, visando a redução dos custos. Microrganismos cujas lipases produzidas não satisfaçam somente a questão da especificidade enzima-substrato, mas também que mostrem estabilidade em relação ao pH e à temperatura, dentre outros fatores (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Os microrganismos, possuindo os atributos fundamentais para que possam ser usado em processos biotecnológicos podem ser isolados, purificados, selecionados e testados em culturas puras, a partir de uma fonte natural. Os produtores de lipases têm sido isolados de resíduos industriais e domésticos oleosos ou gordurosos, de solos contaminados com óleos e graxas, de plantas e animais vivos ou mortos, e de sementes oleaginosas, passando, muitas vezes, por processos de seleção com diferentes finalidades (KOUKER e JAEGER, 1987; HABA et al., 2000a; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; CARDENAS et al., 2001 a e b; FEITOSA et al., 2003; KO, WANG e ANN, 2005; SEMIONATO, 2006; COLEN, 2006; MALDONADO, 2006; SANDOVAL e MARTY, 2007; SHUKLA e GUPTA, 2007; GUEHI et al., 2007; ANDRETTA, DAMSCHI JUNIOR e ONOFRE, 2007; ROVEDA, 2007; LOCK, 2007;

LIMA JUNIOR, 2009; RODRIGUES et al., 2009a e 2009b; ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA, 2010; CASSINI et al., 2009a e 2010a).

As culturas puras podem ser obtidas por meio das técnicas de isolamento direto ou com enriquecimento seletivo. Em seguida, estas culturas são submetidas às condições altamente seletivas para permitir a detecção e seleção daqueles microrganismos ou metabólitos de interesse, primeiramente em meio de cultura sólido em placa de Petri (seleção primária), em que os microrganismos que possuam a capacidade de produzir o metabólito ou substância de interesse são detectados. Na etapa seguinte, as culturas selecionadas são cultivadas em cultivo submerso, sob diversas condições, obtendo-se, assim, diversos tipos de caldos fermentados resultantes do crescimento do mesmo microrganismo. A quantidade produzida dos metabólitos ou das substâncias em cada cultivo é comparada, tendo-se uma avaliação do rendimento de produção em diferentes situações, podendo-se selecionar as cepas mais promissoras, descartando-se as demais (COLEN, 2006; GONÇALVES, 2007; LIMA JUNIOR, 2009; RODRIGUES et al., 2009c; CASSINI et al., 2009b e 2010a; ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA, 2010).

O isolamento primário de fungos a partir de materiais naturais contaminados com uma flora microbiana mista de bactérias e actinomicetos, além dos fungos, requer o emprego de condições de enriquecimento seletivo. Neste caso, isso pode ser feito empregando-se meios de cultura com pH ácido e ou adicionados de substâncias inibidoras de crescimento tais como antibióticos, corantes e outras substâncias de ação específica. No caso dos fungos filamentosos ocorre, ainda, a necessidade de se evitar o crescimento rápido e espalhado de alguns fungos saprófitas (COLEN, 2006).

A seleção primária para detecção de uma atividade particular tem peso significativo no processo de seleção de microrganismos específicos. Os ensaios a serem empregados nesta fase devem levar em conta aspectos tais como simplicidade, custo, rapidez e especificidade. Segundo Steele e Stowers (1991) esta é, geralmente, a etapa que determinará o sucesso ou fracasso de um programa de seleção. A maioria dos métodos é categorizada como diretos quando permite a identificação específica do produto alvo. Como indiretos quando ocorre a indicação da presença de determinada substância pela detecção de alguma atividade específica, tal como a detecção de uma atividade enzimática via reação colorimétrica ou fluorimétrica. Em geral, a seleção primária é realizada pelo cultivo do microrganismo que está sendo

testado em meio de cultura solidificado com agar grau bacteriológico, em placas de Petri. Segundo os mesmos autores, no caso das lipases, a detecção da atividade enzimática apresenta algumas peculiaridades que dificultam a seleção em placa de Petri tais como ausência de especificidade de algumas delas e problemas na distinção entre lipases verdadeiras e as esterases, quando não é usado o substrato adequado.

A medição do tamanho de zonas de lipólise produzidas em géis de ágar para comparar quantitativamente as atividades de diferentes preparações enzimáticas, conforme Shelley, Deeth e Macrae (1987) deve ser executada com cuidados quando se comparam atividades de preparações enzimáticas provenientes de diferentes microrganismos, porque a taxa de difusão de proteínas num gel de ágar é função da concentração da proteína. Assim, o diâmetro de zonas de hidrólise produzidas por enzimas difundidas no ágar pode resultar também da concentração enzimática, além de sua atividade. Apesar disso foi demonstrado por alguns autores como Sztajer e Maliszewska (1988 e 1989) ter havido boa correlação entre o método de difusão em ágar com o método espectrofotométrico em que foi usado paranitrofenillaurato (PNPL) como substrato. O mesmo foi verificado por Lima Jr. (2009) e Rodrigues e outros (2009a, 2009b e 2009c), em relação à utilização do método de difusão em agar e com o método espectrofotométrico, no qual foi utilizado o paranitrofenilpalmitato (PNPP), para a seleção de bactérias e fungos produtores de lipases, respectivamente.

Substratos fluorogênicos, também, têm sido empregados quantitativamente, como descrito por Kouker e Jaeger (1987), em ensaio em placa para lipases. Esses autores incorporaram rodamina B no gel como indicadora da atividade lipolítica, ficando o gel, pronto para o uso, opaco e com coloração rosa. As colônias produtoras de lipase formaram halos fluorescentes alaranjados após revelação com luz ultravioleta (350 nm) e a correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade lipolítica foi positiva. Não ocorreu produção de halos fluorescentes quanto esterases foram testadas.

Para a seleção dos microrganismos produtores de enzimas, empregam-se métodos de detecção qualitativos ou quantitativos (GUPTA et al., 2004). Um dos métodos qualitativos para a produção de lipase consiste em obter halo diferenciado ao redor da colônia, devido às substâncias diferenciadas adicionadas ao meio, que podem ser baseados em Tween 20, Tween 80, tributirina e óleo de oliva (GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004; FREIRE et al., 1997).

Dentre os métodos quantitativos para a verificação da atividade lipolítica, freqüentemente se utiliza a reação de hidrólise de ésteres de ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia, como por exemplo de p-nitrofenilpalmitato, que ocasiona a liberação de p-nitrofenol, de coloração amarela, que absorve na região do visível a 410 nm. A limitação desse método é relativa ao pH e só permite utilização em pH neutro ou alcalino, pois o p-nitrofenol não absorve na região de visível (amarelo) em pHs ácidos (GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004).

O método quantitativo mais utilizado é o método titulométrico, que se baseia na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no caldo fermentado bruto, sobre os triglicerídeos de óleo de oliva emulsionados em goma arábica (FREIRE et al., 1997; CARDENAS et al., 2001).

Alford, Pierce e Suggs (1964) estudaram a atividade de lipases microbianas em gorduras naturais e triglicerídeos sintéticos. Para este estudo foram isolados 82 microrganismos, dos quais apenas 13 produziram lipases com atividade significativa, incluindo linhagens de *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus* e *Geotrichum candidum*.

Watanabe e outros (1977) realizaram extensivos programas de isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipases. Para tanto usaram amostras de solo e de água bem como de coleção de culturas a fim de obterem microrganismos capazes de produzirem lipases alcalinas que atuass (em em faixa de pH de 9 a 10. Os autores empregaram como enriquecimento para o isolamento óleo de oliva (2,0%; p/v), fontes nitrogenadas inorgânicas e uréia adicionados ao meio de cultura e, para testes de produção de lipase meios de cultura com farinha de soja (2,0%; p/v) e amido (2,0%; p/v), com pH inicial de 8,0 e 8,5. De 722 amostras os autores isolaram 1606 cepas microbianas. Apenas quatro cepas, todas elas de bactérias, produziram lipase alcalina em quantidade significativa, não tendo sido detectada nenhuma de fungo filamentosos ou de levedura produtora.

Sztager e Maliszewska (1989) isolaram 160 cepas produtoras de lipase a partir de 60 amostras de solos contaminados com resíduos industriais provenientes do beneficiamento de óleos vegetais e de indústrias de laticínios e de alimentos em deterioração. Para isolamento e seleção primária, usaram um meio no pH 7,5, contendo (em %; p/v): peptona (0,5); extrato de levedura (0,3); tributirina (1,0); ágar (2,0); pH (7,5). Para isolamento de fungos, adicionou-se estreptomicina ao meio de

cultura e o pH foi acidificado. Na seleção secundária em cultivo submerso com frascos agitados empregaram (%; p/v): farinha de soja (2,0); peptona (1,0); amido solúvel (1,0);  $K_2HPO_4$  (0,2);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,1);  $CaCO_3$  (0,5). Das 16 cepas reconhecidas como altoprodutoras apenas 5 eram de fungos filamentosos (4 cepas de *Penicillium spp*) e as cepas que mais produziram a lipase eram de bactérias.

Hou e Johnston (1992) testaram 1229 culturas (508 bactérias, 479 leveduras, 230 actinomicetos e 12 fungos filamentosos) da “Agricultural Research Service Culture Collection” (Peoria, IL, EUA), do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. A seleção foi realizada apenas em placa de Petri com emprego de meios de cultura para bactérias e fungos de composição básica diferente, mas contendo óleo de soja (3,0%; p/v) e solução a 0,1% de rodamina B (0,2%; v/v). Cerca de 25% das cepas mostraram-se produtoras de lipase tendo sido classificadas em três categorias (boa, moderada ou fraca produtora), de acordo com o tamanho do halo lipolítico fluorescente. Os fungos apresentaram o maior percentual de cepas na categoria de boas produtoras.

Rapp e Backhaus (1992) avaliaram 700 linhagens microbianas da coleção de culturas da GBF (“Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbh”) quanto à produção de lipase extracelular. A seleção primária foi realizada em placa de Petri contendo ágar batata e dextrose, adicionado de trioleína e Tween 80 (na proporção de 3,75 mL:1,25 mL) após emulsificação. Poços no ágar (7,0 mm de diâmetro e 5,0 mm de profundidade) foram preenchidos com suspensão de cada cultura microbiana. Após incubação os diâmetros das zonas claras de lipólise em torno dos poços foram medidos. As cepas com halos mais nítidos e maiores foram selecionados totalizando 70 cepas (34 fungos filamentosos, 15 leveduras e 21 bactérias) para serem testadas em cultivo submerso. Neste tipo de cultivo as cepas foram cultivadas em frascos agitados com meio de cultura de composição seguinte (g/L):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5);  $KH_2PO_4$  (1,0);  $NaNO_3$  (3,0); extrato de levedura (1,0); peptona (30,0); glicose (10,0) e óleo de oliva (10,0). A atividade lipolítica foi determinada em ensaio enzimático com trioleína como substrato em meio tamponado no pH 6,2 tendo sido usado, também, o p-nitrofenolpalmitato no pH 5,6. Os caldos fermentados que apresentaram maior atividade frente a trioleína foram obtidos de cultivos de: *Rhizopus spp*, entre os fungos filamentosos; *Rhodotorula rubra* e *Saccharomycopsis capsularis*, entre as leveduras;

e *Pseudomonas cepacia*, entre as bactérias. Os fungos *Rhizopus circinans*, *R. microsporus* e *Candida rugosa* apresentaram a maior produção de lipases.

Pastore (1992) isolou 1285 linhagens de microrganismos de amostras de solo, frutas e resíduos industriais, que foram testados quanto à capacidade de hidrolisar glicerídeos. Oito linhagens de fungos foram relacionadas, preliminarmente, como produtoras de enzimas lipolíticas. Entre estas, uma identificada como *Trichoderma* sp., apresentou alta produção de lipase. A enzima lipolítica de *Trichoderma* sp. hidrolisou as ligações éster de monoleína, dioleína e do substrato paranitrofenillaurato, e pode ser classificada como uma lipase (glicerol-mono éster hidrolase E.C.3.1.1.23).

Ionita e outros (1997) testaram a capacidade lipolítica das cepas de fungos da coleção de culturas do “Chemical Pharmaceutical Research Institute” (Bucareste), empregando ágar nutriente suplementado com cloreto de cálcio e Tween 80. Pela determinação dos halos de opacidade, devido à formação de sabões de cálcio, desenvolvidos em torno das colônias lipolíticas, selecionaram como melhores produtores as cepas de *Candida lipolytica* e *Aspergillus oryzae*.

Cardenas e outros (2001a) desenvolveram trabalhos de isolamento e seleção de microrganismos lipolíticos. Duas mil cepas isoladas de amostras do solo foram submetidas a procedimentos de seleção primária (em placa de Petri) em Agar nutriente suplementado com 10% (v/v) de emulsão de óleo de oliva, preparada em solução de goma arábica ou com tributirina. As colônias que apresentaram zonas claras em volta delas eram repicadas e as culturas resultantes eram novamente selecionadas (seleção secundária) em cultivo submerso. Quatrocentas e cinquenta colônias produziram halo claro em sua volta no meio com tributirina e somente 92 apresentaram halo nas placas com óleo de oliva, indicando predominância de lipases atuantes sobre triglicerídeos de cadeia curta. Das culturas inicialmente selecionadas apenas 14 mostraram-se boas produtoras, sendo 9 fungos filamentosos, uma levedura, uma bactéria e três actinomicetos.

Cardenas e outros (2001b) verificaram que de 960 microrganismos isolados (860 fungos filamentosos e 100 leveduras), 440 produziram halo claro no meio em placa contendo tributirina e destes, apenas 92 apresentaram hidrólise nos meios em placa contendo óleo de oliva. Todas as linhagens formadoras de lipase foram testadas quanto à produção em meio líquido de cultura contendo óleo de oliva como indutor

(cultivo submerso). Dez cepas fúngicas foram selecionadas como boas produtoras: *Achremonium murorum*, *Monascus mucoroides*, *Monascus sp*, *Arthroderma ciferrii*, *Fusarium poae*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Ovadendron sulphureo – ochraceum* e *Rhodotorula araucariae*.

Colen (2006) avaliou a capacidade de produção de lipase por 73 cepas fúngicas, 14 obtidas de coleções de cultura e 59 isoladas de amostras do solo do cerrado de Minas Gerais, com o emprego de técnicas de enriquecimento seletivo. O isolamento e seleção primária foram realizados em meio de cultura contendo ágar, emulsão de óleo de oliva, sais biliares e nutrientes. As colônias lipolíticas foram detectadas pela presença no meio opaco de uma zona clara ao redor delas. Vinte e uma cepas foram avaliadas como produtoras em potencial e a capacidade de produção determinada em condições de cultivo submerso e cultivo em estado sólido (seleção secundária). Apenas 7 delas foram selecionadas como boas produtoras. A cepa melhor produtora, identificada como *Colletotrichum gloesporioides*, produziu 27,7 U. mL<sup>-1</sup> de lipase, empregando-se inóculo vegetativo, com cultivo submerso em frascos agitados a 150 rpm e 30°C, durante 96 h, em meio de cultura basal contendo peptona bacteriológica (20,0 g.L<sup>-1</sup>), óleo de oliva (8,0 mL. L<sup>-1</sup>) e sais inorgânicos, no pH 7,0.

### **3.1.6 Avaliação do crescimento de microrganismos lipolíticos através de respirometria aeróbia**

Alguns microrganismos presentes no solo possuem a capacidade de aclimatar suas atividades enzimáticas e utilizar as fontes de carbono oferecidas pelo meio ambiente para a realização das suas atividades metabólicas, gerando energia e aumento de massa. Este processo é conhecido como biodegradação (ALEXANDER, 1994), que pode ser dividida em três categorias: (a) mineralização, processo no quais os compostos orgânicos são transformados em compostos inorgânicos, como dióxido de carbono, fosfato e nitrato; (b) biotransformação, processo em que os compostos de grande cadeia molecular são reduzidos a compostos de cadeias menores e (c) co-metabolismo, no qual outro composto é metabolizado primeiramente ou simultaneamente a um composto específico. A biodegradação pode ocorrer tanto por via aeróbia quanto anaeróbia, dependendo da atividade microbiana. Entretanto, vale ressaltar que processos aeróbios possuem uma faixa maior de substâncias degradáveis e ocorrem em uma escala de tempo menor (PEDROTI, 2007).

Quando é adicionada uma certa quantidade de matéria orgânica biodegradável a um determinado solo, no qual se registra a presença de nutrientes, ocorre um crescimento da massa biológica. Conseqüentemente, dá-se um aumento no consumo de  $O_2$  e na geração de  $CO_2$ , como resultado da atividade microbiana. O comportamento da respiração aeróbia microbiana é considerado um indicador da sua atividade no solo, podendo ser avaliado pelo monitoramento do oxigênio consumido ou do dióxido de carbono produzido durante o processo. Este método é chamado respirometria e constitui uma importante ferramenta aplicada aos problemas ligados às ciências ambientais. A respirometria baseia-se no princípio de que há uma correlação direta entre a geração de  $CO_2$ , ou consumo de  $O_2$ , e a degradação da matéria orgânica num solo, pela ação dos microrganismos presentes nesse ambiente (ALEXANDER, 1994; ABNT, 1999; PEDROTI, 2007; TELES, 2007, LIMA JR., 2009; RODRIGUES et al., 2009d, CASSINI et al., 2010b).

Bartha e Pramer (1965) desenvolveram um respirômetro baseado na determinação do dióxido de carbono produzido durante a respiração microbiana. O gás ( $CO_2$ ) produzido no processo era absorvido por uma solução alcalina ( $KOH\ 0,2\ mol.L^{-1}$ ) e posteriormente quantificado, utilizando-se titulação ácido-base, tendo como titulante o  $HCl\ 0,1\ mol.L^{-1}$  e, fenolftaleína como indicador. Quando se analisa a quantidade de  $CO_2$  produzida, tem-se a garantia de estar avaliando o crescimento microbiológico, pois ocorre a mineralização completa de uma parte da matéria orgânica, isto é, o produto final é  $CO_2$  e  $H_2O$ , energia e biomassa. Na análise da quantidade de  $O_2$  consumido não é possível essa garantia, pois pode-se ter a formação de subprodutos utilizando o carbono, sendo que tais subprodutos não são usados pelos microrganismos em seu metabolismo, além de poderem apresentar uma certa toxicidade para a cultura em questão (BARTHA e PRAMER, 1965).

Para estudos na área de saneamento, a respirometria tem sido usada, em geral, para descrever a quantidade de oxigênio consumido pela população microbiológica presente em uma amostra onde o solo ou o lodo ativado é misturado a um resíduo, que pode ser um composto químico específico, uma mistura de diversos compostos e, até mesmo, um efluente. Sob condições aeróbias, a produção de  $CO_2$  pelo microrganismos é proporcional à matéria orgânica e à biomassa presentes na amostra (MAHENDRAKER e VIRARAGHAVAN, 1995; COSTA, FERREIRA e VAN HAANDEL, 2007).

O método respirométrico aeróbio mostrou ser útil em pesquisas sobre a limitação de nutrientes, metabolismo de óleos e graxas, sendo uma ferramenta versátil, adaptável a uma variedade de pesquisas, além de utilizar uma quantidade reduzida de amostra e ser um método bastante reprodutível (HAINES, HOLDER e VENOSA, 1996).

O emprego da respirometria aeróbia vem ocorrendo para o monitoramento da degradabilidade de uma variedade de compostos sob condições aeróbias, sendo usado em estudos envolvendo óleos, compostos orgânicos voláteis, compostos orgânicos de alta e baixa solubilidade, compostos fenólicos e compostos tóxicos em geral (MELLO et al., 2007; CAMPO et al., 2007; TELES, 2007), prestando-se também à seleção de microrganismos produtores de lipases, para futura utilização em sistemas de saneamento ambiental e geração de biodiesel (LIMA JUNIOR, 2009; RODRIGUES et al., 2009d; CASSINI et al., 2010b).

## 3.2 BIOSSURFACTANTES

### 3.2.1 Conceito e importância

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos, que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos que apresentam baixa solubilidade em água. Emulsificante ou biossurfactante (do inglês: *surface active agent*) são compostos anfifílicos (com uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica) que reduzem a energia livre do sistema, substituindo as moléculas de alta energia em uma interface (MULLIGAN, YONG e GIBBS, 2001; MULLIGAN, 2005; MILLIOLI, 2009).

Surfactantes sintéticos são usados para uma vasta variedade de propósitos, como emulsificação, detergência, solubilização e umidificação. Atualmente, o mercado mundial dos surfactantes corresponde a aproximadamente US\$ 9,4 bilhões por ano, e estima-se que a demanda por surfactantes aumente a uma taxa de 35% ao ano (MUTHUSAMY, GOPALAKRISHNAN, RAVI e SIVACHIDAMBARAM, 2008).

Conforme Mulligan, Yong e Gibbs (2001), os principais fatores que devem ser levados em conta na hora de escolher um emulsificante incluem o custo, a eficiência, a percepção pública e regulatória, a biodegradabilidade e a degradação dos produtos, a toxicidade a humanos, animais e plantas e a habilidade de ser reciclado. No

entanto, o que se verifica é que quase todos os surfactantes atualmente utilizados são quimicamente derivados do petróleo e, por isso, não atendem satisfatoriamente aos requisitos de inocuidade toxicológica, biodegradabilidade e aptidão à reciclagem.

Verifica-se, conforme a Tabela 2, que o interesse por surfactantes microbiológicos, obtidos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, por isso denominados biossurfactantes, tem aumentado nos últimos anos, devido às suas diversidades, características para o auxílio ambiental, a possibilidade de produção através de fermentação e suas potenciais aplicações em áreas como a proteção ambiental, recuperação de resíduos de óleos, cuidados à saúde e indústrias de processamento de alimentos (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000; DELEU e PAQUOT, 2004). Ambientalmente são moléculas muito atrativas para a utilização em processos de biorremediação e tratamento de efluentes industriais e domésticos (MULLIGAN, YONG e GIBBS, 2001; NITSCHKE e PASTORE, 2002; COLLA e COSTA, 2003; MATSUURA, 2004; MULLIGAN, 2005; SALIHU, ABDULKADIR e ALMUSTAPHA, 2009).

Tabela 2 - Principais aplicações dos biossurfactantes

Funções	Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene e cosméticos
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação do petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação melhorada de petróleo (MEOR)

Fonte: Mulligan (2005).

Além disso, comparados aos surfactantes químicos, os biossurfactantes têm como vantagens a capacidade de modificação estrutural dos microrganismos produtores, através da engenharia genética ou técnicas biológicas e/ou bioquímicas, permitindo o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas, além da produção a partir de substratos renováveis e estabilidade em valores extremos de pH e temperatura (FIECHTER, 1992; PRUTHI e CAMEOTRA, 1997; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; NITSCHKE e PASTORE, 2002; MUKHERJEE, PALASHPRIYA e RAMKRISHNA, 2006).

No entanto, os biossurfactantes ainda não são competitivos em relação aos surfactantes químicos, quanto à utilização em larga escala, pelo alto custo, devido aos baixos rendimentos dos processos de produção e de recuperação e purificação. A possibilidade de utilização de substratos baratos ou sub-utilizados pode diminuir drasticamente o custo da produção e, os resíduos orgânicos e industriais ou domésticos são apontados como possíveis substratos para a sua produção econômica (BANAT, 1995; DESAI e BANAT, 1997; ROSENBERG e RON, 1999; RON e ROSENBERG, 2001; KOSARIC, 2001; MULLIGAN, YONG e GIBBS, 2001; KITAMOTO, ISODA e NAKAHARA, 2002; CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; COLLA e COSTA, 2003; YOUSSEF et al., 2004; CAMEOTRA e MAKKAR, 2004; MULLIGAN, 2005; MUKHERJEE, PALASHPRIYA e RAMKRISHNA, 2006; AL-ARAJI et al., 2007; MEIRA, 2007; MUTHUSAMY et al., 2008; RAHMAN e GAKPE, 2008; SALIHU, ABDULKADIR e ALMUSTAPHA, 2009).

### **3.2.2 Estrutura funcional e propriedades**

Os biossurfactantes são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras. Eles se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água, e agem como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade de reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas-hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e conseqüente biodegradabilidade (BOGNOLO, 1999; RON e ROSENBERG, 2001; COLLA e COSTA, 2003).

Pelo menos três hipóteses existem, em relação à função natural dos biossurfactantes: aumentar a área superficial de substratos hidrofóbicos; aumentar a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos e regular a fixação e a liberação do microrganismo de superfícies (ROSENBERG e RON, 1999; RON e ROSENBERG, 2001; MAIER, 2003).

De acordo com WU e JU (1998), os biossurfactantes podem ser divididos em categorias de baixa ou alta massa molar. A primeira categoria, representada por glicolipídeos, soforolipídeos, lipídeos de trealose, ácidos graxos e fosfolipídeos, são produzidos extracelularmente e possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial do meio. A segunda categoria, representada por lipopolissacarídeos, estabilizam emulsões no meio aquoso e não são normalmente excretados pelas células microbianas, ou seja, são intracelulares.

A concentração de biossurfactante em um meio de cultura é expressa em termos de diluição crítica micelar, fator pelo qual a concentração efetiva excede a concentração crítica micelar ou seja, a concentração acima da qual o surfactante começa a se agregar em micelas e não mais se observa uma maior redução da tensão superficial (CASSIDY e HUDAK, 2001).

### **3.2.3 Microrganismos produtores (bactérias e leveduras)**

Devido ao curto tempo de geração, comparado ao necessário para o crescimento animal e de plantas, a produção dos biossurfactantes por microrganismos é considerada a mais promissora para fins industriais e ambientais (KARANTH, DEO e VEENANADIG, 1999; SOBRINHO, 2007).

Nas últimas décadas tem-se aumentado o interesse em identificar e isolar novos microrganismos produtores de moléculas tenso-ativas que apresentem boas características surfactantes, como baixa concentração micelar crítica (CMC), baixa toxicidade, alta atividade de emulsificação, dentre outras (DESAI e BANAT, 1997; ROSENBERG e RON, 1999; FONTES, AMARAL e COELHO, 2008). A avaliação de métodos que venham a constituir protocolos rápidos e simples, para a seleção e quantificação da produção de biossurfactantes, facilitando a detecção de microrganismos produtores também é necessária e tem sido objeto de pesquisas (YOUSSEF et al., 2004).

A produção de biossurfactantes por bactérias, leveduras e fungos filamentosos está associada geralmente à utilização de substratos insolúveis em água. O crescimento do microrganismo em uma interface de água e óleo favorece o aparecimento de um biofilme, cuja formação envolve as seguintes etapas: a) os microrganismos aderem à superfície de grandes gotas de óleo devido à hidrofobicidade das células; b) as células aderidas formam uma camada delgada na interface óleo/água, extraíndo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa; c) como as células revestem as gotas de óleo produzindo biossurfactantes, elas reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a água, resultando na emulsificação do óleo e aumentando a área interfacial disponível para o crescimento microbiano; d) quando o composto oleoso contido nas gotas desaparece, os microrganismos colonizam outras gotas (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; NITSCHKE e PASTORE, 2002; MESQUITA, 2004; MEIRA, 2007).

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura é de origem bacteriana e sua produção, caracterização, utilização e ou potencial, assim como menção às espécies bacterianas produtoras, são relatados nos inúmeros artigos de revisão bibliográfica sobre o tema. As bactérias produtoras mais relatadas são dos gêneros: *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp. (GOUVEIA et al., 2003), porém outras espécies também têm sido isoladas do solo, da água e de sedimentos de mangue, contaminados com resíduos oleosos (FERRAREZO, 1998; BATISTA, 2002; PIRÔLLO, 2006; MANEERAT e PHETRONG, 2007; SAMADI et al., 2007; BUENO, 2008; FONTES, AMARAL e COELHO, 2008; PINTO, MARTINS e COSTA, 2009; JACOBUCI, ORIANI e DURRANT, 2009), de poços de petróleo e de reservatórios de combustíveis (TABATABAEE et al., 2005).

Jacobuci, Oriani e Durrant (2009) verificaram que duas bactérias isoladas de solo contaminado com derivados de petróleo, *Pantoea agglomerans* e *Planococcus citreus*, produzem biossurfactantes utilizando respectivamente 1,5% de querosene e óleo de oliva como únicas fontes de carbono. As bactérias e os biossurfactantes produzidos foram adicionados a um efluente oleoso obtido de uma indústria nacional de sabão e margarina. As atividades de emulsificação foram determinadas pelo aumento da absorvância das emulsões óleo em água a 610 nm, enquanto que as emulsões do tipo água em óleo foram expressas em centímetros, pela altura do halo de espumas formado. As reduções da demanda química de oxigênio (DQO) de 76% e

70%, conferidas por *P. citreus* e *P. agglomerans*, respectivamente, após 72 h de incubação, mostraram que as linhagens e os biosurfactantes produzidos podem ser utilizados diretamente em processos de biorremediação de efluentes oleosos, conforme concluíram os autores.

As leveduras também têm sido estudadas para a produção de emulsificantes. Entre as leveduras, espécies de *Candida* e *Yarrowia* têm sido amplamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biosurfactantes. Uma grande vantagem do uso de leveduras reside no status GRAS (*generally regarded as safe*) que muitas delas apresentam, como *Y. lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. Organismos com *status* GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008). Dada sua relevância industrial, várias revisões podem ser encontradas sobre a influência de diferentes parâmetros na produção de biosurfactantes especificamente por este grupo microbiano, características e aplicações, demonstrando o seu potencial, ainda não totalmente explorado, como também restrições relacionadas aos custos de produção (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008; AMARAL et al., 2010).

Em relação a bactérias é importante mencionar que os biosurfactantes são, em certos casos, são produzidos durante a fase inicial do crescimento e, então, desativados ou incorporados em outros metabólitos. Já no caso de leveduras, a maioria dos biosurfactantes é geralmente produzida quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008). Em geral, para ambos grupos de produtores as condições de crescimento (pH, temperatura, carbono, nitrogênio, oxigênio, ou elementos traços essenciais) são fundamentais em relação à produção dos biosurfactantes (FIEBIG et al., 1997; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; KUYUKINA et al., 2001; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; VANCE-HARROP, GUSMÃO e CAMPOS-TAKAKI, 2003; LUNA, 2006; SOBRINHO, 2007; LUNA et al., 2008; LUNA, SARUBBO e CAMPOS-TAKAKI, 2009).

#### **3.2.4 Produção de biosurfactantes por fungos filamentosos**

A maioria dos trabalhos publicados sobre a síntese de biossurfactantes tem sido realizada com bactérias, sendo poucas as referências quanto ao emprego de fungos filamentosos (LUNA-VELASCO et al., 2007).

A produção de glicolípídeos extracelulares, com propriedades biossurfactantes vem sendo detectada em algumas espécies de fungos filamentosos, conforme mencionado por Hewald, Josephs e Bolker (2005).

A produção de ácido ustilágico, uma classe de glicolípídios, foi descrita pela primeira vez por Haskins (1950), que observou a formação de um composto insolúvel com atividade antibiótica, produzido pelo fungo *Ustilago maydis*, em cultura submersa. Do mesmo fungo foi isolado outro glicolípídeo extracelular, o manosil eritritol, com densidade maior que a da água (HASKINS et al., 1955; KURZ et al., 2003). Este composto, posteriormente, também foi detectado em *Candida antarctica*, *Schizonella melanogramma* e *Geotrichum candidum* (KITAMOTO et al., 1990; KURZ et al., 2003). Kurz e outros (2003) denominaram estes glicolípídios de “ustilipídios” e determinaram a composição de muitos dos seus homólogos por espectrometria de massa.

Muriel e outros (1996) verificaram que o fungo *Cladosporium resinae*, frequentemente isolado de tanque de combustíveis produziu biossurfactantes extracelulares quando crescendo em meios cujas fontes de carbono foram óleo diesel, combustível de avião, parafina e hexadecano. O bioemulsificante produzido foi extraído da espuma durante a fermentação e purificado com uso de uma mistura de clorofórmio : metanol (2 : 1), sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água de  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  para  $25 \text{ mN.m}^{-1}$  após 25 dias de fermentação. A atividade emulsificante apresentou maior valor quando comparada a emulsionantes comerciais como Triton X100 e SDS. Através de cromatografia líquida de alta eficiência, fase reversa, foi efetuada a purificação e seis homólogos detectados representaram acima de 75% da fração ativa.

Em determinados processos biotecnológicos industriais há a obtenção de moléculas com propriedades emulsificantes sem que o objetivo do processo seja este. O fungo filamentoso *Curvularia lunata*, utilizado na fabricação de hidrocortizonas, foi estudado por Paraszkieicz, Kanwal e Dlugonski (2002), visto haver produzido um composto extracelular (25% de uma proteína complexa e 48% de um polissacarídeo ) capaz de estabilizar emulsões óleo em água, quando crescendo em um meio contendo compostos hidrofóbicos como “cortexolone”, antraceno e fenantreno. A maior

concentração do bioemulsificante (2,6 g/L) foi obtida na fase estacionária de crescimento, após 47 h de cultivo, sendo que o início da fase estacionária ocorreu em 18 h de cultivo. Após o cultivo, o biossurfactante foi extraído do meio de cultivo e utilizado para os testes de emulsificação, apresentando máximas atividades com querosene, óleos vegetais e minerais.

Camargo-de-Morais e outros (2003) observaram que *Penicillium citrinum* produziu um glicolípido com propriedades emulsificantes durante o cultivo sobre um meio mineral com 1% (v/v) de óleo de oliva, como única fonte de carbono. A produção foi crescente e atingiu a máxima atividade emulsificante com 60 h de cultivo, destacando-se para o xileno e óleo diesel, quando comparada a outros compostos testados. O emulsificante mostrou estabilidade a uma vasta gama de valores de pH e temperatura. Na sua composição mostrou conter D-galactose, D-glucose e D-xilose, com um conteúdo total de carboidratos de 43%. A presença de sais estimulou a atividade emulsificante, sugerindo potencial para aplicação em remediação de resíduos industriais ou marinhos.

Carli (2006), com o objetivo estudar a obtenção de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes, a partir de diferentes substratos e enzimas, promoveu reações com diferentes carboidratos, como sacarose, lactose, glicose, frutose e glucosamina e com os ácidos, láurico (dodecanóico), cáprico (decanóico) e caprílico (octanóico). Como biocatalisadores, foram utilizadas as lipases provindas dos microorganismos: *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* e *Mucor javanicus*, imobilizados em crisotila natural, sendo obtidos resultados positivos com a acilação da sacarose, lactose e frutose com o ácido láurico, usando a lipase de *Candida antarctica*.

Luna-Velasco e outros (2007) verificaram que *Penicillium* sp., previamente isolado de um local contaminado com hidrocarbonetos, produziu um agente emulsificante extracelular, quando se desenvolveu na presença de glucose e fenantreno como fontes de carbono, e, estudaram várias condições para a sua produção. Observaram uma baixa correlação negativa ( $p < 0,0177$ ), evidenciando a inexistência de associação entre a biomassa produzida pelo fungo e a produção do emulsificante. A produção máxima do mesmo foi de  $2 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$  (quarto dia de incubação) e a atividade emulsificante no meio de cultura livre de células foi de  $60 \pm 4\%$  (quinto dia de incubação). As propriedades emulsificantes foram mantidas sob sob larga faixa de pH

(3 – 9), alta salinidade (NaCl 20%) e durante a exposição a elevada temperatura (93°C). O emulsificante foi constituído por lípidos (67%), carboidratos (11%) e proteínas (7%), sendo que os principais ácidos detectados na fração lipídica foram o mirístico, o esteárico e o oléico.

Prata, Lemos e Barros (2008), visando otimizar a produção de tensoativos por *Penicillium coryophilum*, utilizaram um meio mineral com a seguinte composição (g.L<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5,46); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4,76); NH<sub>4</sub>Cl (2,50); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,8) e, NaCl (0,1) e óleo de soja (0,4%). Os frascos de cultivo foram agitados durante 7 dias, a 150 rpm, sob temperatura de 30°C, sendo, a partir de então, acrescidos de óleo de soja, e mantidos sob as mesmas condições por mais 7 dias. O fungo produziu um tensoativo com tensão superficial entre 31,6 e 37,0 mN.m<sup>-1</sup> e índice de emulsificação na faixa de 0 a 7,00%, indicando, segundo os autores, tratar-se provavelmente de um composto de baixo peso molecular.

Martins, Kalil e Costa (2008) estudaram a influência de diferentes variáveis de processo na produção de lipase pelos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium* sp., em processo de fermentação em estado sólido, durante 120 h, a 30°C. Os dois substratos utilizados foram: complexo (casca e farelo de arroz desengordurado, misturados) e, simples (casca de arroz). Ambos foram adicionados de uma solução de micronutrientes assim composta (g.L<sup>-1</sup>): MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5); NaNO<sub>3</sub> (3); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1); extrato de levedura (1) e peptona (0,3) e, acrescidos de duas fontes de carbono adicionais, o óleo diesel e o óleo de soja. As taxas de aeração foram de 60 e 120 mL.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram uma concomitante produção de lipase e biossurfactante em diferentes condições de cultivo, sem que a primeira interferisse com a segunda. Para o fungo *A. fumigatus*, a máxima atividade lipolítica observada foi 105,70 U.g<sup>-1</sup> e as atividades emulsificantes encontradas foram de 12,33 EU.g<sup>-1</sup> (óleo/água) e 6,38 EU.g<sup>-1</sup> (água/óleo), no substrato complexo e óleo diesel como fonte adicional de carbono. Em relação a *Phialemonium* sp., a atividade lipolítica máxima foi de 131,92 U.g<sup>-1</sup> e, as atividades emulsificantes observadas foram 9,55 EU.g<sup>-1</sup> (óleo/água) e 5,16 EU.g<sup>-1</sup> (água/óleo), nas mesmas condições experimentais.

Kiran e outros (2009) verificaram alta produção de biossurfactante pelo fungo *Aspergillus ustus* (MSF3), um endossimbiótico marinho isolado de esponja marinha, coletada na costa peninsular da Índia, no meio caldo Sabouraud Dextrose, tendo a máxima produção ocorrido em pH 7,0, temperatura de 20°C, concentração salina de

3%, glucose como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. O biossurfactante foi parcialmente caracterizado como uma glicolipoproteína e, parcialmente purificado, mostrou largo espectro de atividade antimicrobiana.

Castiglione, Bertolin e Costa (2009) avaliaram a produção de biossurfactante pelo fungo *A. fumigatus*, em biorreatores de coluna encamisada, mantidos em banho-maria termostaticado, durante 144 h. O meio de cultivo foi composto por 250 g de casca e farelo de arroz (15:85), 90 mL de solução nutriente composta por (g.L<sup>-1</sup>): MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5), NaNO<sub>3</sub> (3,0), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0), extrato de levedura (1,0) e peptona (0,3). Óleo de soja e óleo diesel foram adicionados na proporção de 1% (w. w<sup>-1</sup>), como fonte adicional de carbono. Além de cultivos sem alimentação de ar, foram avaliadas as aerações 40, 60, 100, 120 e 200 mL ar.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. As condições físico-químicas utilizadas nos experimentos foram 30°C, concentração inicial de esporos de 4.10<sup>6</sup> esporos g<sup>-1</sup>, pH 4,5 e umidade 50%. Os resultados foram melhores em 120 horas após o início do processo. As atividades emulsificantes encontradas, após o ajuste polinomial dos resultados, foram de 11,17 UE. g<sup>-1</sup>, para o meio sem fonte adicional de carbono e 148 mL de ar.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>; de 9,99 UE.g<sup>-1</sup>, utilizando óleo diesel e 140 mL de ar.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e; de 8,47 UE. g<sup>-1</sup> com óleo de soja e 119 mL de ar.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, utilizando HPLC para lipopetídeos, com dosagem por fenol-sulfúrico para ramnolipídeos.

### 3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFLUENTES OLEOSOS COM LIPASES

#### 3.3.1 Óleos e gorduras: características e importância

A produção mundial anual de óleos e gorduras em 2000 foi da ordem de 107 milhões de toneladas, tendo-se previsto uma produção de 135 milhões de toneladas para 2010 (CASTRO et al., 2004), que foi ultrapassada, conforme a ABIOVE (acesso em 05 fev. 2011). Sua maior parte destina-se ao setor alimentício, no entanto, é crescente o interesse na obtenção de produtos químicos de maior valor agregado a partir dessas matérias químicas.

Óleos e gorduras são compostos hidrofóbicos, pertencentes à classe química dos lipídeos, de origem animal, vegetal ou microbiana. Apresentam-se no estado líquido (óleos) ou em estado semi-líquido, pastoso ou sólido (gorduras), à temperatura ambiente. São insolúveis em água (hidrofóbicas) e menos densas que esta, porém,

solúveis em diferentes solventes orgânicos, tais como éter sulfúrico, éter de petróleo, benzina, clorofórmio, acetona e sulfeto de carbono (REGITANO-D'ARCE, 2006; SAAD et al., 2006; CHRISTOFF, 2006). A primeira distinção entre um óleo e uma gordura está baseada na sua aparência física. O Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos define a temperatura de 20°C, como o limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão situa-se abaixo desta temperatura (MORETTO e FETT, 1989).

Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos ou triacilgliceróis, resultantes da combinação entre três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes (GRAMPONE, 1993). De acordo Regitano-D'Arce (2006), na união entre uma molécula de glicerol, que é um álcool trivalente, com três moléculas de ácidos graxos, iguais ou não entre si, ocorrerá uma reação de esterificação, isto é, o grupo carboxila terminal de cada ácido graxo se ligará a um dos carbonos do glicerol, ocorrendo a formação de uma molécula de triglicerídeo e três moléculas de água (Figura 5):

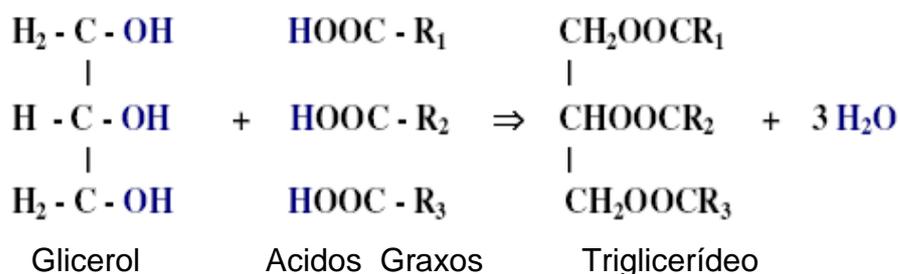


Figura 5 - Reação de esterificação de uma molécula de glicerol com três ácidos graxos (R1, R2 e R3) resultando na formação de uma molécula de triglicerídeo e três moléculas de água

Fonte: Regitano-D'Arce (2006).

Os ácidos graxos presentes óleos e gorduras representam 96% do peso total das moléculas e são, geralmente, constituídos por ácidos carboxílicos que contêm de 4 a 30 átomos de carbono na sua cadeia molecular, que podem ser saturadas ou insaturadas; além disso podem ser representados por símbolos numéricos, tais como: ácido láurico C12:0; onde o numero justaposto ao símbolo C indica o número de átomos de carbono e o segundo número, a quantidade de duplas ligações (MORETTO e FETT, 1989; GURR e HARWOOD, 1996). O número de insaturações

pode variar entre 1 e 6, sendo que três insaturações são comuns. Há dois grupos distintos de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa: a série ômega 3 (ou  $n-3$ ), na qual a primeira dupla ligação está localizada entre o terceiro e o quarto átomo de carbono na cadeia do ácido graxo e a série ômega 6 (ou  $n-6$ ), na qual a primeira dupla ligação é observada entre o sexto e o sétimo átomo de carbono na cadeia do ácido graxo, conforme Bueno (2005) e, Gurr e Harwood (1996).

Existe um predomínio de isômeros *cis*, especialmente nos óleos e gorduras naturais. A existência de isômeros *trans*, geralmente, é resultado de processos de hidrogenação. Com relação ao percentual de cada ácido graxo, existe uma composição típica para cada tipo de óleo (MORETTO e FETT, 1989).

Os óleos vegetais e as gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana. Fornecem calorias e agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K. Também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoléico, linolênico e araquidônico e contribuem para a palatabilidade dos alimentos (KARLESKIND, 1996; GURR e HARWOOD, 1996).

Ultimamente muitas pesquisas tem sido destinadas ao estudo da biotransformação de óleos e gorduras residuais (OGR), no que diz respeito a processos hidrolíticos (biodegradação) e catalíticos (síntese), visando aplicação biotecnológica em processos saneamento ambiental, como o tratamento de águas residuais oleosas (esgotos) de natureza industrial e doméstica, bem como à produção de biocombustíveis, como o biodiesel, respectivamente (NASCIMENTO, COSTA NETO e MAZZUCO, 2001; CASTRO et al., 2004; SUAREZ et al., 2009).

### **3.3.2 Efluentes oleosos: impacto ambiental e legislação**

A fração de lipídeos é caracterizada por óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos livres e, juntamente com proteínas e carboidratos compõem os principais compostos orgânicos de águas residuárias de diversas indústrias de alimentos. Lipídeos são compostos que causam grandes danos ao meio ambiente, como a formação de filmes de óleo nas superfícies aquáticas, impedindo a difusão de oxigênio do ar para esse meio e o mais importante, promovem a mortandade da vida aquática (SAIFUDDIN e CHUA, 2006).

Os lipídeos encontram-se, preferencialmente, na forma de triacilgliceróis e uma pequena parte como ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). A presença de triacilgliceróis e AGCL é bastante similar, constituindo, aproximadamente, em 80% de ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico. Dentre esses, o ácido graxo mais abundante é o ácido oleico (C18:1) (MENDES et al., 2005).

As principais fontes de geração de lipídeos são indústrias de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, curtumes, matadouros e os efluentes domésticos e de restaurantes, principalmente de “fast food”. Alguns valores de concentração de lipídeos, nesses efluentes, são mostrados na Tabela 3 .

Tabela 3 - Fontes de lipídeos e suas concentrações em águas residuárias

<b>Tipos de efluentes</b>	<b>Concentração de lipídeos (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Doméstico	40 - 100
Matadouros e avícolas	Acima de 500
Laticínios	4.680
Restaurantes	98
Azeite de oliva	16.000
Sorvetes	845

Fonte: Mendes et al. (2005).

Nota: Dados adaptados pelo autor.

Em se tratando de efluentes originados de atividades industriais, os teores de óleos e graxas presentes nas águas residuais são variáveis, por exemplo: 200 a 2000 mg.L<sup>-1</sup> para as indústrias de laticínios e, 500 a 16000 mg.L<sup>-1</sup> para as indústrias de extração de óleos vegetais. Em sua maior parte, estes efluentes não são tratados ou não recebem o tratamento adequado, o que os torna, em função do impacto ocasionado, um preocupante problema ambiental (MENDES et al., 2005).

Em relação aos esgotos sanitários (domésticos), de acordo com Metcalf e Eddy (2003), os teores de óleos e gorduras normalmente observados encontram-se na faixa de 55 a 170 mg.L<sup>-1</sup>, com valor médio de 110 mg.L<sup>-1</sup>. Observam ainda, estes autores, que a quantidade limite de óleos e graxas em águas residuárias, lançadas em cursos d'água, deve representar de 15 a 20 mg.L<sup>-1</sup> no valor da demanda química de oxigênio (DQO). Neste tipo de águas residuárias, os teores de óleos e graxas compreendem o somatório do quantitativo de óleos, graxas, ceras e ácidos graxos,

provenientes de resíduos alimentares como a manteiga, margarina, gorduras de origem vegetal e animal, óleos vegetais, além da matéria oleosa devido à presença de lubrificantes utilizados nos estabelecimentos industriais, principalmente refeitórios industriais, lanchonetes e restaurantes (JORDÃO e PESSOA, 2005).

A adoção de um maior rigor nos padrões de descarte de águas residuárias tem motivado a realização de pesquisas, cujo objetivo é reduzir o impacto ambiental, especialmente em efluentes contendo elevados teores de lipídeos. A Política Nacional de Recursos Hídricos, instituída pela Lei Federal nº 9.433 de 8 de janeiro de 1997 trata da cobrança pelo uso dos corpos d'água para o lançamento de despejos líquidos (MENDES et al., 2005).

Apesar dos teores de óleos e graxas dos esgotos sanitários domésticos serem, normalmente, bem inferiores aos apresentados por efluentes lipídicos industriais, é preocupante a presença de quantidades elevadas destes lipídeos, devido principalmente ao despejo indesejável de óleos residuais de fritura diretamente na rede de esgotos, com os seguintes efeitos impactantes (HOCEVAR, 2005):

- Os óleos emulsificam-se com a matéria orgânica, ocasionando entupimentos em caixas de gordura e tubulações;
- Quando lançados diretamente em bocas-de-lobo ocasionam obstruções, em função de emulsificarem-se formando “pastas”, inclusive retendo resíduos sólidos. Em alguns casos, a desobstrução de tubulações torna necessária a alocação de produtos químicos tóxicos;
- Na rede de esgotos os entupimentos podem ocasionar pressões que conduzem à infiltração do esgoto no solo, poluindo o lençol freático ou ocasionando refluxo à superfície;
- Os esgotos ingressos aos sistemas municipais de tratamento de esgotos dificultam o tratamento, podendo encarecê-lo em até 45%;
- Quando não houver tratamento de esgotos prévio ao lançamento ao corpo receptor, elevam-se as suas concentrações de óleos totais, depreciando sua qualidade, podendo verificar-se modificação pontual de pH e diminuição da taxa de trocas gasosas da água com a atmosfera. A temperatura do óleo sob o sol pode chegar a 60°C, matando animais e vegetais microscópicos;

- Em corpos hídricos, em função de imiscibilidade do óleo com a água e sua inferior densidade, há tendência à formação de filmes oleosos na superfície, o que dificulta a troca de gases da água com a atmosfera, ocasionando depleção das concentrações de oxigênio e anaerobiose, resultando em morte de peixes e outras criaturas aeróbias;
- No ambiente, em condições anaeróbias, pode haver metanização dos óleos, contribuindo para o efeito estufa.

É importante, finalmente, lembrar que, de acordo com Hocevar (2005), cada litro de óleo é capaz de comprometer, por poluição, cerca de um (1) milhão de litros de água, ou seja, 1000 m<sup>3</sup>, volume equivalente ao que uma pessoa consome ao longo de 14 anos de vida.

No que diz respeito à legislação, no Brasil, a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, atualmente em vigor, estabelece, no seu artigo de nº 34, as concentração de óleo mineral de até 20 mg.L<sup>-1</sup> e de óleos e gorduras vegetais e animais de até 50 mg.L<sup>-1</sup>, presentes em efluentes a serem lançados em corpos hídricos (CONAMA, 2005).

### **3.3.3 Efluentes oleosos: conseqüências aos sistemas de tratamento**

De uma maneira geral as águas residuais oleosas causam uma série de problemas em estações de tratamento e canalizações do esgoto. São responsáveis pelo entupimento da canalização, mal funcionamento das estações de tratamento e limitação da transferência de oxigênio para a biomassa devido a geração de um filme lipídico na interface ar/água. Se desconsideradas, estas águas residuais podem impedir de forma significativa a capacidade de recuperação dos desescumadores, reduzir os volumes de bombeamento e aumentar a mão de obra para a disposição e segregação dos resíduos, bem como os problemas para a sua estocagem. (WAKELIN e FORSTER, 1997; LEFEBVRE et al., 1998).

Nas estações de tratamento de efluentes oleosos, a elevada concentração de triacilgliceróis necessita inicialmente ser hidrolisada para, em seguida, ser transformada em fonte de carbono para as bactérias e, posteriormente, ser convertida em biomassa (lodo ativado). A hidrólise de triacilgliceróis libera ácidos graxos de cadeia longa e glicerol. Quando esses ácidos graxos de cadeia longa estão em

excesso, ocorre a adsorção deles na superfície do lodo, dificultando o transporte de substratos solúveis para os microrganismos, bem como a formação de grânulos de lodo nos reatores (MENDES et al., 2005).

Os lipídeos presentes nos efluentes de alguns tipos de indústrias, como de óleos comestíveis, sorvetes, frigoríficas, curtumes e de laticínios, representam em torno de 50% da DQO do resíduo, possuem baixa degradabilidade e representam problemas nos processos biológicos anaeróbios e aeróbios do sistema de tratamento de esgoto, causando danos operacionais significativos (CAMMAROTA, TEIXEIRA e FREIRE, 2001). Já em águas residuárias domésticas, conforme Lefebvre e outros (1998), os compostos lipídicos representam, pelo menos, 25 % da demanda química de oxigênio (DQO). Efluentes oleosos geralmente são submetidos a processos físico-químicos de tratamento, seguidos de tratamento biológico, para remoção de poluentes coloidais, como os lipídeos.

A etapa físico-química consiste na separação do óleo por flotação, com remoção média de 20 %, na floculação de sólidos totais e na coagulação da matéria orgânica; a etapa biológica que se segue pode ser feita em lagoas, lodo ativado ou filtros biológicos, onde a matéria orgânica é degradada pelos microrganismos que existem naturalmente nestes efluentes (LEFEBREVE et al., 1998). Os efluentes assim tratados seguem para corpos receptores. Esses processos empregam compostos inorgânicos como  $Al_2(SO_4)_3$ ,  $FeCl_3$  e  $FeSO_4$  que permitem apenas uma remoção parcial de sólidos totais (MENDES et al, 2005). Além disso, os reagentes químicos empregados são de custo elevado e causam uma redução na remoção dos sólidos dissolvidos e de óleos e graxas nos processos biológicos, pois a presença destes sais pode inibir a atividade microbiana (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; VIDAL et al., 2000).

De acordo com Mendes e outros (2005), elevadas concentrações de lipídeos presentes nos efluentes a serem tratados, resultam na formação de lodos com diferentes características físicas e reduzida atividade hidrolítica devido à flotação dessa biomassa, aumento do tempo de retenção hidráulica desses efluentes nas lagoas de estabilização, redução da capacidade de aeradores e elevada demanda de produtos floculantes. Além disso, altos níveis de gordura (acima de 150 mg/L) podem prejudicar o desempenho do processo biológico subsequente, levando à colmatação de filtros em reatores anaeróbio e aeróbio, além da inibição do metabolismo

microbiano. São observados também a formação excessiva de espuma, camada de matéria flutuante de compostos gordurosos, que pode gerar mau cheiro, transbordamento de fossas e caixas de gordura (WILLEY, 2001; PEREIRA, 2004; VIDAL et al., 2000; JORDÃO e PESSOA, 2005).

Na remoção de lipídeos em estado livre, geralmente são utilizadas caixas de gordura comuns que permitem sua separação por retirada manual ou por meio de raspadores na superfície. Para melhor desempenho dessas caixas, devem ser evitadas temperaturas superiores a 35°C e valores de pH acima de 8,5 na alimentação da caixa, pois nessas condições ocorre a saponificação ou emulsificação e o excesso de detergentes prejudica a eficiência de separação pela formação de gotículas de menor tamanho, com menor velocidade ascensional (MENDES et al., 2005). No caso de formação de emulsão, esta deve ser quebrada pela adição de produtos químicos e utilização de flotores com ar dissolvido. Apesar da eficiência de remoção melhorar significativamente, a flotação apresenta custos operacionais elevados, além de gerar lodo químico, que deve ter uma destinação adequada. Ao final do processo, caixas de gordura também são utilizadas para separar o restante dos sólidos que o flotor não conseguiu retirar, formando uma massa branca, que é misturada à borra oleosa proveniente do refino e à gordura do flotor. Muitas vezes, o resíduo lipídico flotado é descartado em aterros sanitários, o que polui o ambiente (MONGKOLTHANARUK e DHARMSTHITI, 2002).

Processos biológicos convencionais de tratamento de efluentes, aeróbios ou anaeróbios, requerem uma relação DBO/DQO (razão de biodegradabilidade) de no mínimo 0,4. Esta razão é necessária para que o consórcio de microrganismos possa consumir a matéria orgânica sem prejudicar o desempenho do tratamento biológico. No entanto, os efluentes gerados nas indústrias de refino de óleo e os produzidos pelas indústrias de laticínios geralmente apresentam DBO/DQO de 0,2, indicando a necessidade de um pré-tratamento antes da etapa biológica convencional (AZBAR e YONAR, 2004).

De acordo com Mendes e outros (2005), os sistemas biológicos de tratamento de resíduos devem atender alguns aspectos importantes: (1) remoção da matéria orgânica, portanto, redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) do resíduo a ser tratado; (2) se possível, degradação de compostos químicos orgânicos de difícil degradação (recalcitrantes); (3) fornecimento de um efluente em condições que não

afetem o equilíbrio do sistema receptor final (rios e lagos). A Tabela 4 fornece alguns exemplos de águas residuárias potencialmente tratáveis por processos biológicos, bem como os valores de DBO dos rejeitos.

Tabela 4 - Valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) para diferentes tipos de águas residuárias

<b>Águas residuárias</b>	<b>DBO (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Esgotos sanitários	200 - 600
Efluente de alimentos	500 – 2.000
Efluente de cervejarias	500 – 2.000
Efluente de processamento de óleo comestível	15.000 – 20.000
Efluente de destilaria de álcool (vinhaça)	15.000 – 20.000
Efluente de aterros sanitários (chorume)	15.000 – 20.000
Efluente de matadouros (sem recuperação de resíduos)	30.000
Efluente de laticínios ( sem recuperação de soro de queijo)	40.000 – 48.0000

Fonte: Mendes et al. (2005).

No tratamento de efluentes industriais de laticínios, frigoríficos, indústrias de alimentos, curtumes e outros com alta carga lipolítica dos resíduos, processos aeróbios são comumente empregados devido ao grande conteúdo de matéria orgânica biodegradável presente. Estes sistemas podem propiciar boa redução de matéria orgânica, boa resistência a choques de carga e boa flexibilidade operacional. Por outro lado, os custos, tanto os de implantação quanto os operacionais são elevados, a supervisão do processo deve ser contínua e a disposição do lodo excedente pode apresentar problemas (ROSA, 2004; MORENO, 2007).

Os tratamentos de natureza aeróbia englobam os lodos ativados, filtro biológico, lagoa de estabilização aeróbia, dentre outros, com destaque para o primeiro. Os sistemas de lodos ativados são em geral compostos por tanque (reator biológico), sistema de aeração, decantador secundário e sistema de recirculação e descarte do lodo. No reator biológico ocorre a exposição da matéria orgânica à massa biológica, a qual em presença de oxigênio cresce e floclula (VON SPERLING, 1997).

O problema em relação aos efluentes oleosos tratados por esta via é que o alto teor de óleos e graxas forma uma camada na superfície do tanque de aeração, que afeta principalmente a eficiência de transferência de oxigênio.

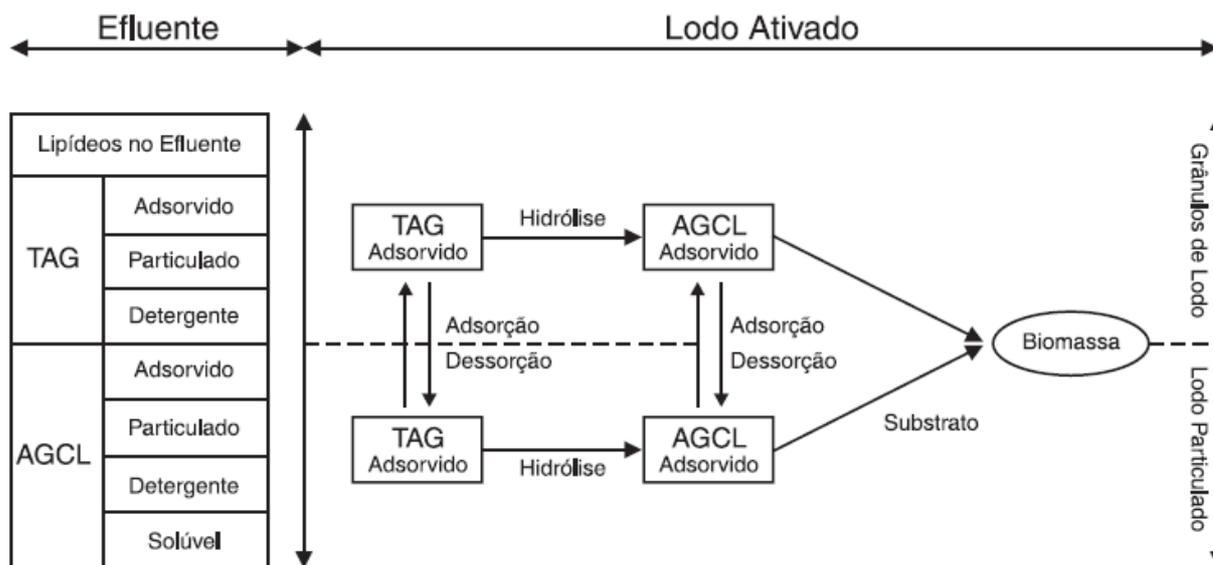


Figura 6 - Etapas envolvidas na transformação de lipídeos em lodo ativado (TAG: triacil gliceróis; AGCL: ácidos graxos de cadeia longa)

Fonte: Mendes et al. (2005).

Isto dificulta as trocas gasosas que são necessárias para a degradação biológica, ocasionando o desenvolvimento de bactérias filamentosas que, por sua vez, dificultam a sedimentação do lodo e prejudicam o desempenho dos sistemas em termos de remoção de matéria orgânica (CAMMAROTA e FREIRE, 2006). Conforme Dueholm e outros (apud MENDES et al., 2005), AGCL e TAG, adsorvidos pelo lodo dificultam a translocação de oxigênio e nitrogênio consumidos para a produção de células, e a hidrólise destes compostos é lenta (Figura 6).

Nas últimas décadas, tem crescido o uso de processos anaeróbios para o tratamento de efluentes, principalmente os oleosos. Esse tipo de processo é considerado vantajoso porque dispensa a aeração, apresenta baixo consumo de energia, baixos custos de implantação, baixa produção de sólidos, aplicabilidade em pequena e grande escala, tolerância a elevadas cargas orgânicas e baixo consumo de nutrientes (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; MENDES et al., 2005; ROSA, 2004; VIDAL et al., 2000).

Dentre os diversos tipos de reatores anaeróbios utilizados, o reator de leito de lodo anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) é o mais utilizado industrialmente no Brasil. A vantagem desse reator é a habilidade de reter alta concentração de biomassa, com alta velocidade de fluxo e alta produção de biogás. O reator UASB consiste, basicamente, em um tanque em cuja parte inferior está localizada a zona de digestão

e na parte superior, a zona de decantação e separação do gás. O efluente a ser tratado é uniformemente distribuído na base do reator e passa por meio da camada de lodo biológico, a qual transforma a matéria orgânica presente no efluente, principalmente, em metano e gás carbônico (Figura 7). Nos reatores de leito de lodo anaeróbico de fluxo ascendente, é importante a agregação de bactérias. A formação de agregados pode ser realizada por floculação microbiana ou granulação (MENDES et al., 2005).

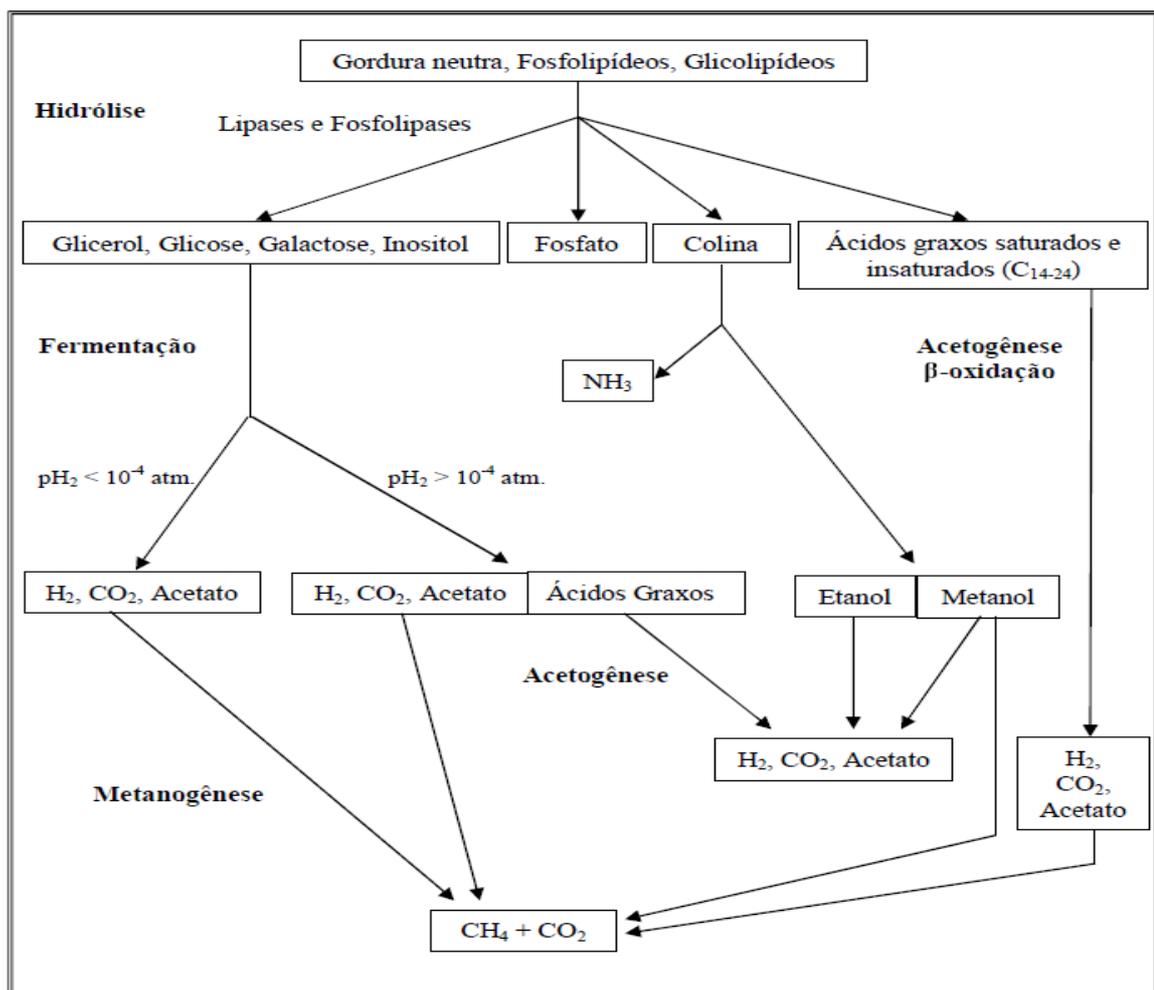


Figura 7 - Etapas de degradação anaeróbica das gorduras que são hidrolisadas, os produtos gerados sofrem fermentação,  $\beta$ -oxidação e são utilizadas para gerar acetato, e após há a formação de metano pela metanogênese

Fonte: Gallert e Winter (2005).

Nota: adaptado pelo autor.

Existem algumas preocupações sobre a capacidade de degradação de óleos e graxas por processos anaeróbios (LEAL et al., 2006). Em efluentes com grande quantidade de gorduras,, a digestão anaeróbica pode ser problemática, pois pode causar um

flotação do lodo, formação de espuma na superfície do reator e acúmulo de compostos intermediários (MENDES et al., 2005). Além disso, a baixas temperaturas as gorduras podem se solidificar, causando problemas operacionais como a colmatação e desenvolvimento de odores desagradáveis (CAMMAROTA, TEXEIRA e FREIRE, 2001).

### **3.3.4 Efluentes oleosos: hidrólise enzimática com lipases**

Muitos estudos vem sendo realizados para avaliar a utilização de lipases, principalmente microbianas, no tratamento de efluentes oleosos, como uma alternativa ou complemento aos tratamentos convencionais, através de metodologias isoladas ou associadas de tratamento (CAMMAROTA, TEXEIRA e FREIRE, 2001; SHARMA et al., 2001; JUNG, CAMMAROTA e FREIRE, 2002; PEREIRA, 2004; RIGO, 2004; ROSA, 2004; MENDES et al., 2005; DORS, 2006; HASAN et al., 2006; LEAL et al., 2006; SAIFUDDIN e CHUA, 2006; DURLI, 2007; VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007; RIGO et al., 2008; ALBERTON et al., 2010). Essas enzimas apresentam uma importância particular pelo fato de, apesar de apresentarem elevado nível de especificidade, poderem hidrolisar, de forma não totalmente específica, óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com altos teores de lipídeos (MENDES et al., 2005; ALBERTON et al., 2010).

Conforme Castro e outros (2004) e Mendes e outros (2005), o tratamento lipolítico de efluentes oleosos apresenta algumas vantagens, tais como a especificidade, que permite controlar os produtos, o que leva a um aumento dos rendimentos pela não geração de subprodutos tóxicos. Além desta, as condições moderadas de operação, a redução do custo em termos de energia e de equipamentos, a desnecessária aclimação de biomassa, a inexistência de efeitos de choque por carga de poluentes, a aplicação em processos com baixa ou alta concentração de poluentes, a operação em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade, tornando-o atrativo sob o ponto de vista ambiental. Tais relatos correspondem também aos de outros pesquisadores (BORJA, BANKS e GARRIDO, 1994; MASSE et al., 2002; EL-MASRY, EL-BESTAWY e EL-ADL, 2004).

Para os segmentos industriais geradores de efluentes com elevados níveis de lipídeos e, portanto, com elevados teores de DBO e DQO, tendo em vista que o conteúdo de

gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica, os processos alternativos que visam a recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de extremo interesse. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases, por exemplo, é capaz de reduzir o teor de lipídeos, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização, com amplas vantagens para o processo de tratamento (CASTRO et al., 2004).

Dentro deste contexto, diversos trabalhos vêm objetivando a avaliação de preparados lipolíticos obtidos por fermentação em estado líquido e sólido, como uma alternativa de baixo custo para o tratamento de efluentes com elevados teores de gordura, gerados em diversos segmentos industriais (CAMMAROTA, TEXEIRA e FREIRE, 2001; SHARMA et al., 2001; CAMMAROTA e FREIRE, 2002; ROSA, 2004; HASAN et al., 2006; LEAL et al., 2006; VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007; RIGO et al., 2008; ROSA, 2008; RIGO, 2009; BELO, 2009; ALBERTON et al., 2010).

A aplicação de lipases microbianas comerciais, na forma livre ou imobilizada, para o tratamento de águas residuárias, têm-se mostrado inviável sob o ponto de vista econômico (SAIFUDIN e CHUA, 2006) em razão do alto custo das mesmas. Portanto, tem sido crescente o interesse de utilização de microrganismos potencialmente produtores de lipases, diretamente no ambiente reacional (reator), na forma de células integrais lipolíticas (biomassa lipolítica), imobilizado em suportes de baixo custo, em prol da eficácia e economia do tratamento (EL-MASRY, EL-BESTAWY e EL-ADL, 2004). Dentre os microrganismos com esta possibilidade de utilização, é crescente o interesse pelos fungos filamentosos.

Cammarota, Teixeira e Freire (2001) pesquisaram a utilização das hidrolases (lipase, protease e amilase) produzidas pelo fungo *Penicillium restrictum*, em fermentação semi-sólida de rejeitos da indústria de óleo de babaçu, para tratamento anaeróbio de efluentes com uma concentração de lipídeos que variou entre 180-1200 mg/L. A aplicação de enzimas hidrolíticas, anterior ao tratamento anaeróbio, resultou no aumento de remoção de DQO de 1,3- 4,2 vezes, em relação ao efluente bruto. Esse preparado enzimático foi recomendado para ser utilizado também na limpeza de fossas sépticas, caixas de gorduras residenciais e de estabelecimentos comerciais e recuperação de reatores aeróbios e anaeróbios.

Jung, Cammarota e Freire (2002) estudaram a hidrólise enzimática com lipases produzidas pelo fungo *P. restrictum*, anterior à etapa biológica, em um reator de lodos ativados de batelada seqüencial para o tratamento de efluentes de laticínios. A hidrólise do efluente foi conduzida com 0,2 % (p/v) de torta de babaçu fermentada com atividade lipásica de 11 U/g de sólido. Diferentes concentrações de lipídeos foram avaliadas (400, 600 e 800 mg/L). Os reatores foram alimentados com efluente bruto (controle) ou hidrolisado e operaram à temperatura ambiente e com tempo de retenção hidráulica de 24 h. Até a concentração de 600 mg/L, a flora microbiana assimilou a carga orgânica introduzida em ambos reatores. A partir de 800 mg/L, a eficiência de remoção de DQO no reator controle decresceu, chegando a ser nula, enquanto no reator alimentado com o hidrolisado se manteve acima de 90%.

Robles e outros (2002) avaliaram o isolado fúngico *Penicillium* P4, obtido de um efluente da indústria de óleo de oliva, para a biodegradação deste efluente, contendo 114.000 mg/L de DQO. Após 20 dias de incubação, a 28°C, observou-se uma redução de 61% na DQO inicial do efluente.

Leal e outros (2002) usaram um extrato enzimático de *P. restrictum*, isolado de resíduos sólidos de uma indústria brasileira de óleo de babassu, com alto nível de atividade lipolítica, para o tratamento de águas residuárias da indústria de laticínios, com altos teores de gorduras. A água residuária foi tratada com 10% (v/v) de extrato enzimático com atividade lipolítica de 2,1 U/mL, por 12 horas, a 35°C, sem agitação. A taxa de remoção de DQO, durante as primeiras 24 horas do tratamento foi de 0,18 Kg/m<sup>3</sup> para o controle e 1,87 kg/m<sup>3</sup> para água residuária hidrolisada. A eficiência de remoção para diferentes concentrações de óleos e graxas, foi de 80-95% para os efluentes residuais pré-hidrolizados e de 19-55%, para os que não foram pré-hidrolizados.

Rosa (2004) investigou a eficiência de uma preparação enzimática sólida, produzida por *P. restrictum*, na pré-hidrólise de águas residuárias de laticínios com alto teor de gorduras (400-800 mg/L, de óleos e graxas), antes do tratamento em reatores de lodo ativado, operados continuamente, a 25°C. A hidrólise de óleos e graxas presentes no efluente foi conduzida a 30°C, por 24 h e com 0,1% (w/v) da torta fermentada. Dois sistemas de lodos ativados com taxa de retenção hidráulica de 20 h e 3 kg de DQO/m<sup>3</sup> foram utilizados, um com o efluente bruto (controle) e o outro com o efluente enzimaticamente hidrolisado. Ambos sistemas apresentaram similares eficiências de

remoção de DQO (80-90%), entretanto, a taxa de acumulação de óleos e graxas foi 1,7 vezes maior no reator cujo efluente não foi previamente hidrolisado.

Valladão (2005) avaliou a biodegradabilidade aeróbia de efluentes de indústria avícola, com e sem hidrólise enzimática, com preparações enzimáticas em estado sólido, do fungo *P. restrictum* em três concentrações: 0,1; 0,5 e 1,0% (w/v). O efeito do estágio de pré-hidrólise de óleos e graxas presentes no efluente foi nítido. Foi substancialmente maior a eficiência de remoção da DQO, 85% versus 53%, e os níveis de produção de biogás, 175 mL versus 37 mL, obtidos após 4 dias com o efluente pré-hidrolisado comparado com o efluente bruto, contendo o mesmo nível inicial de óleos e graxas, observados mesmo após 6 dias do tratamento.

Mendes e outros (2005) e Cammarota e Freire (2006) citaram vários documentos de patentes para a aplicação de enzimas hidrolíticas, especialmente lipases, no tratamento de águas residuárias. A maioria da lipases ou preparados microbianos lipolíticos relatados eram de natureza bacteriana e ou de leveduras, o que sugere a necessidade e abre o espaço para maior número de pesquisas com fungos filamentosos, com os mesmos objetivos.

Rosa, Cammarota e Freire (2006) avaliaram a eficiência de uma preparação enzimática sólida (PES) produzida através de fermentação em estado sólido pelo fungo *P. restrictum* com resíduo da indústria de óleo de babassu, em um estágio de pré-tratamento de um efluente oleoso, com diferentes concentrações de óleos e graxas (400, 600 e 800 mg de O&G.L<sup>-1</sup>). Dois sistemas paralelos de lodo ativado foram operados continuamente com um tempo de retenção hidráulica de 20 h, durante um período de 240 dias, um dos quais com o efluente residual tratado (controle) e o outro com o efluente pré-hidrolisado enzimaticamente (teste). Nos tratamentos com 800 mg de O&G.L<sup>-1</sup> no efluente obteve-se um tratamento significativo, incluindo a remoção de DQO 13 % maior, acúmulo de O&G em flocos 40% menor, concentração de biomassa 1,7 vezes maior, constante de degradação 4,7 vezes maior e, taxa de reposição específica de oxigênio 1,7 vezes maior, suficientes para atender aos padrões legais de descarga de efluentes tratados de acordo com a legislação ambiental local.

Damasceno, Freire e Cammarota (2008) avaliaram o impacto de um *pool* enzimático contendo lipases, produzidas pelo fungo *P. restrictum* em processo de fermentação em estado sólido, no tratamento de efluentes de laticínios com choques de carga em

lodos ativados. Os resultados obtidos mostraram que as médias das eficiências do biorreator teste, tratado enzimaticamente, foram maiores que as do controle (90% para o teste e 83% para o controle) e o acúmulo de gordura nos flocos do lodo foi 3,2 vezes maior no biorreator controle. A turbidez foi menor no biorreator teste (123 e 66 FTU no controle e teste, respectivamente) e este apresentou um curto tempo de recuperação entre os choques de carga, principalmente quando os intervalos entre as cargas eram menores do que um mês. Concluiu-se que a adição de um preparado enzimático sólido nas sobrecargas de gordura na alimentação do biorreator provou ser uma alternativa viável, mantendo elevadas remoções de DQO no biorreator teste por mais de 270 dias, sem qualquer problema operacional.

Rosa (2008), avaliou o efeito de um pré-tratamento enzimático no desempenho de três biorreatores (digestor anaeróbio, UASB e RAHLF) tratando efluentes de laticínios com 1200 mg de O&G.L<sup>-1</sup>. A etapa de pré-hidrólise foi realizada com 0,1% (m/v) de um preparado enzimático sólido, com o fungo lipolítico *Penicillium* sp., a partir de fermentação em estado sólido, contendo lipases, a 30°C por 24 h, resultando numa concentração final de ácidos livres 8 vezes maior que a inicial. Os biorreatores tiveram maiores eficiências de remoção de DQO: 95% (digestor), 89% (UASB) e 90% (RAHLF) quando alimentados com o efluente pré-hidrolisado. Quando a etapa de pré-hidrólise foi removida, o UASB e RAHLF mantiveram elevadas remoções de DQO, enquanto o digestor anaeróbio apresentou pior desempenho (32% eficiência de remoção de DQO). A adição de um preparado enzimático líquido (PEL) na alimentação do digestor anaeróbio aumentou gradualmente a eficiência de remoção de DQO (atingindo 64% após 92 dias).

Alberton (2009) após triagem de 11 cepas de fungos filamentosos para a produção de lipases, utilizou *Rhizopus microsporus* CPQBA 31207 DRM, que foi cultivado por fermentação no estado sólido (FES) e o sólido fermentado (SF) produzido foi usado para hidrolisar triacilgliceróis de efluente gerado por indústria de laticínios. Nos experimentos de hidrólise, após 12 h de incubação com SF a 35°C, a remoção de O&G das amostras de efluente esterilizado foi 30%, enquanto o efluente não esterilizado apresentou 20% de remoção. Após 72 h, a remoção de O&G foi 78% para o efluente esterilizado e 80% para o efluente não esterilizado. Segundo a autora, os resultados de produção de lipases, biodegradabilidade dos efluentes testados e remoção de matéria orgânica foram promissores e, sugerem que a otimização do

sistema envolvendo *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM, incluindo a produção do sólido fermentado e sua aplicação no tratamento de efluente contendo alta concentração de gordura, deve ser realizada.

Valente e outros (2010) avaliaram a aplicação de preparados enzimáticos sólidos (PES) ricos em lipases, produzido pelo fungo *P. simplicissimum* por fermentação em meio sólido (FMS) de resíduo industrial, no tratamento anaeróbio de efluente de indústria de conservas de pescado, através da hidrólise de gorduras presentes no efluente a fim de viabilizar a utilização de metano como fonte de energia. O efluente contendo 1500 mg de O&G.L<sup>-1</sup> foi hidrolisado com 0,2, 0,5 e 1,0% (m/v) de PES a 30 °C por até 18 h. O efeito do pré-tratamento enzimático dos O&G não foi significativo com relação à remoção de DQO, pois, independentemente das condições adotadas, obtiveram-se valores de 91 a 95%. Porém, enquanto no tratamento controle a produção específica de metano aumentou com o tempo de incubação, atingindo um máximo com 18 h (138 mL de CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> da DQO inicial, naquele com utilização de 0,5% PES e 8 h de hidrólise, obteve-se 216 mL de CH<sub>4</sub>. g<sup>-1</sup> da DQO inicial, correspondendo a um aumento de 2,7 vezes na produção específica de metano, indicando que a matéria orgânica foi mais facilmente assimilada pelos microrganismos anaeróbios nesta última condição.

### 3.4 INTERFACE TECNOLÓGICA: SANEAMENTO E GERAÇÃO DE ENERGIA

#### 3.4.1 Óleos e graxas residuais (OGR): matéria-prima para biodiesel

Entre 40 e 50 anos é o tempo estimado para a exaustão das reservas mundiais de petróleo, considerada a expectativa do consumo e, é uma das razões que justificam as atuais corridas econômica e tecnológica para a produção de combustíveis originários de fontes renováveis de energia. Outra razão, não menos significativa, reside nos atuais movimentos mundiais, políticos e sociais, cada vez mais exigentes em conservação ambiental, focados na preservação e qualidade da vida humana no planeta (QUINTELLA et al., 2009; CÂMARA, 2006). A poluição do ar das grandes cidades é, provavelmente, o mais visível impacto da queima de derivados de petróleo, principalmente por veículos automotores. Portanto, a busca por fontes alternativas de energia é de suma importância, como no caso do biodiesel (FACCIO, 2004; VAN GERPEN, 2005; MARCHETTI et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2001;

PASQUALETTO e BARBOSA, 2006; MARQUES et al., 2008; VASUDEVAN e BRIGGS, 2008; SUAREZ et al., 2009; DABDOUB, BRONZEL e RAMPIN, 2009).

O biodiesel é obtido através da reação de óleos vegetais, novos ou usados, gorduras animais, com um intermediário ativo, formado pela reação de um álcool com um catalisador, processo conhecido como transesterificação. Os produtos da reação química são um éster (o biodiesel) e glicerol. No caso da utilização de insumos ácidos, como esgoto sanitário ou ácidos graxos, a reação é de esterificação e não há formação de glicerol, mas de água simultaneamente ao éster. Em ambos processos, os ésteres têm características físico-químicas muito semelhantes às do diesel, conforme demonstram as experiências realizadas em diversos países, o que possibilita a sua utilização em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel) (COSTA NETO et al., 2000; ANP, 2009 e 2010).

Entre as características favoráveis apresentadas por este biocombustível, se comparado ao diesel de petróleo, citam-se: a) é derivado de fontes renováveis, vegetais ou animais, e sua combustão não contribui para aumentos significativos dos níveis atmosféricos de CO<sub>2</sub>, causadores do efeito estufa; b) pode ser de produção caseira, possibilitando a redução da importação petróleo, c) é biodegradável e sem toxicidade ambiental; d) em relação ao petrodiesel, seus produtos de combustão facultam a redução dos níveis de particulados e fumaça escura, monóxido de carbono, óxidos de enxofre (contem baixíssimos níveis, < 0,001%, de enxofre residual), hidrocarbonetos, e sob as mesmas condições, óxidos de nitrogênio (FUKUDA, KONDO e NODA, 2001; MACEDO e MACEDO, 2004; TORRES, CHIRINOS e SANTOS, 2006); d) alto número de cetano; teor médio de oxigênio e maior ponto de fulgor, conferindo excelentes propriedades combustíveis, e ; e) adapta-se ao motor diesel sem a necessidade de modificações mecânicas (SAAD, 2005; FERRARI, OLIVEIRA e SCABIO, 2005; TORRES, CHIRINOS e SANTOS , 2006; MARQUES et.al., 2008).

A partir de 1º de janeiro de 2010, passou a ser obrigatória a mistura de 5% de biodiesel em todo óleo diesel consumido no Brasil, exceto óleo diesel marítimo. Para os atuais dados de mercado, a nova mistura deverá gerar economia de divisas da ordem de US\$ 1,4 bilhão/ano devido à redução das importações de óleo diesel. Segundo estudo realizado pela ANP, cada litro da nova mistura diminui em 3% a

emissão de CO<sub>2</sub>, além de reduzir também a emissão de material particulado (ANP, 2010).

De forma geral, as matérias-primas potencialmente produtoras de biodiesel podem apresentar diferentes relações entre os compostos glicerídicos e não-glicerídicos, assim como, os ácidos graxos constituintes podem ter menor ou maior número de carbonos; nenhuma, uma ou mais duplas ligações (insaturações). Assim sendo, a qualidade do biodiesel obtido apresenta relação direta com a natureza e a qualidade da matéria-prima, como também com as condições em que esta foi produzida e processada (MORETTO e FETT, 1989). São elas:

1. Óleos vegetais: líquido à temperatura ambiente como os óleos de algodão, amendoim, babaçu, canola, dendê, girassol, mamona e, principalmente, soja.

2. Gorduras animais: pastosas ou sólidas à temperatura ambiente como o sebo bovino, óleo de peixe, banha de porco e óleo de mocotó.

3. Oleos e gorduras residuais: muitas matérias-primas relacionadas ao meio urbano como óleos residuais originários de cozinhas domésticas e industriais (óleo de fritura); gordura sobrenadante (escuma) de esgoto; óleos residuais de processamentos industriais.

Pimentel (1996) relatou restrições à expansão do emprego das principais oleaginosas cultivadas, como matéria prima para a produção de biocombustíveis, assim justificadas: concorrência no uso do solo e água com culturas alimentares e para outros fins técnicos; possíveis impactos ambientais resultantes de uma produção agrícola intensiva de culturas energéticas (erosão, contaminação do solo e água com resíduos de adubos, herbicidas e pesticidas) e; altos custos de produção, quando comparados aos custos atuais vigentes para produção de combustíveis fósseis (diesel, óleo combustível). Suarez *et al.* (2009), treze anos após, afirmaram que uma questão que permeia a utilização de biomassa para produzir combustível é o dilema entre a segurança alimentar e energética.

Segundo Saad e outros (2006), a importância da seleção da matéria-prima deve ser inicialmente avaliada pelo impacto de seu custo, porém também considerando sua competitividade técnica e sócio-ambiental. Em termos mundiais, Dabdoub, Bronzel e Rampin (2009) atribuíram à matéria prima a responsabilidade variável de 70 a 88% do preço final do biodiesel. No Brasil, apesar de difícil a obtenção de planilhas de custo

de produção fidedignos, dada a diversidade de matérias primas, estima-se que cerca de 80% do custo estão relacionados à matéria-prima processada, enquanto os outros 20% distribuem-se entre o álcool (etílico ou metílico), o catalisador (químico básico ou ácido) e os custos da administração (ANP, 2010).

Sob o aspecto da sustentabilidade ambiental, resguardada pela “produção limpa” e pela política ou pedagogia dos “3R” (redução, reutilização e reciclagem) dos subprodutos gerados, a produção de biodiesel é considerada uma das tecnologias-chave para o tratamento de óleo residual e reciclagem de resíduos domésticos e do processamento de alimentos (FUKUDA, KONDO e NODA, 2001; MURAYAMA, 1994).

As possíveis fontes de óleos e gorduras residuais são: as lanchonetes, cozinhas industriais, comerciais e domésticas, onde são praticadas as frituras de alimentos, indústrias, nas quais processam frituras de produtos alimentícios, os esgotos municipais, onde a nata sobrenadante é rica em matéria graxa, possível de extrair-se óleos e gorduras. Ainda, águas residuais de processos de certas indústrias alimentícias, como as indústrias de pescados, de couro, laticínios e frigoríficas. No Brasil sobram, por ano, por exemplo, 500 mil toneladas de gorduras provenientes do abate de animais, que poderiam servir à produção de biodiesel a um custo médio de R\$ 0,50.L<sup>-1</sup> (GOMES, 2005; LOPES, 2006). A reciclagem destes tipos de resíduos, muitos dos quais não têm um fim comercial, vem ganhando espaço cada vez maior, não simplesmente porque representam “matérias primas” de baixo custo, mas, principalmente, porque a presença de tais resíduos são ambientalmente impactantes, restando superar tecnologicamente as maiores limitações à sua utilização, quais sejam organizar sistemas eficientes de coleta e purificação (COSTA NETO et al., 2000; OLIVEIRA e ROSA, 2003; OLIVEIRA, 2004; FELIZARDO et al., 2006; PASQUALETTO e BARBOSA, 2006; OLIVEIRA et al., 2008; SUAREZ et al., 2009; LA ROVERE et al., 2010).

Oliveira e outros (2008), analisaram a sustentabilidade da utilização de diferentes fontes alternativas para a geração industrial de energia no Brasil, utilizando indicadores de natureza tecnológica, operacional, econômica, social e ambiental, e concluíram pela priorização dos resíduos oleosos para a geração de biodiesel. Alguns dados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados obtidos em relação à sustentabilidade da utilização de resíduos oleosos para a produção de biodiesel no Brasil

OGR/Álcool	Investimento (R\$/L)	Custos OM (R\$/L)	Kg CO <sub>2</sub> Eq/L	Número de empregos	Produção (milhões de litros/ano)
Óleo usado + metanol	0,076	0,410	- 1,294	1000	10
Escuma + metanol	0,106	0,120	- 1,294	100	50
Gordura + metanol	0,076	0,570	- 1,294	500	250
Graxa + metanol	0,091	0,250	- 1,294	700	150
Óleo usado + etanol	0,076	0,420	- 1,380	1130	10
Escuma + etanol	0,106	0,130	- 1,380	752	50
Gordura + etanol	0,076	0,580	- 1,380	3761	250
Graxa + etanol	0,091	0,260	- 1,380	2657	150

OGR = óleos e graxas residuais. OM = operacionais e manutenção.

Fonte: adaptado de Oliveira et al. (2008).

Nota: dados adaptados pelo autor.

De acordo com dados do Programa de Eficiência Energética em Saneamento Ambiental (PROCEL SANEAR, 2004), do Ministério de Minas e Energia, o setor de saneamento utiliza 2,3% do total de energia elétrica consumida no país. Isso equivale a 7,0 TWh/ano. Nos sistemas de saneamento, a energia elétrica é utilizada principalmente nos conjuntos motobomba dos sistemas de abastecimento de água, transporte do esgoto e no tratamento de água e esgotos. As despesas com energia elétrica têm sido crescentes no setor e podem ser consideradas, em muitos casos, como a segunda maior despesa dentre os custos operacionais (MME, 2005).

Desta forma, os investimentos para a exploração da interface tecnológica entre saneamento ambiental e geração de energia limpa vêm sendo estimulados na atualidade, visando à adaptação das ETEs já existentes e a adequação dos novos projetos a serem instalados, de forma a garantir, no própria estação de tratamento, o aproveitamento energético dos seus efluentes. O Brasil tem potencial para a geração de 220 milhões de litros de biodiesel ao ano – cálculo que toma como base o tratamento de apenas 42% do esgoto gerado no País, a um custo de, aproximadamente, R\$ 0,80.L<sup>-1</sup> e rendimento de 85 mL.L<sup>-1</sup> de esgoto (OLIVEIRA et al., 2008).

### 3.4.1.1 Óleo residual de fritura

De acordo com Lago e outros (apud CHRISTOFF, 2006), o processo de fritura expõe os óleos e gorduras a três agentes capazes de provocar alterações em suas composições químicas, tornando-os imprestáveis para novas frituras e com características químicas comprovadamente nocivas à saúde (50% de compostos polares, como polímeros, dímeros, ácidos graxos livres, diglicerídeos e ácidos graxos oxidados). O agentes relatados são:

- a) Água - proveniente do próprio alimento, responsável por alterações hidrolíticas e das quais resultam os ácidos graxos livres (monoglicerídeos), diglicerídeos glicerol.
- b) Oxigênio - ao entrar em contato com o óleo ou gordura a partir da área superficial de contato, provoca alterações oxidativas. A oxidação envolve reações químicas complexas e é responsável pela formação de produtos organolepticamente inaceitáveis, odores e sabores estranhos.
- c) Temperatura - a exposição de óleos e gorduras a temperaturas elevadas pode levar à formação de polímeros, que são constituídos por duas ou mais moléculas de ácidos graxos e que são responsáveis pelo aumento na viscosidade do óleo ou da gordura.

No Brasil, parte do óleo vegetal residual oriundo do consumo humano é destinado a fabricação de sabões e ração animal e, em menor volume, à produção de biodiesel (MITTELBAACH e TRITTHART, 1988; COSTA NETO et al., 2000). Porém, a maior parte ainda é descartada na rede de esgotos, sendo considerado um crime ambiental inadmissível. A pequena solubilidade dos óleos vegetais na água constitui como um fator negativo no que se refere à sua degradação em unidades de tratamento de despejos por processos biológicos e, por tal, representam a maior e mais indesejável contribuição para a poluição de esgotos sanitários por compostos lipídicos (COSTA NETO et al., 2000; ZHANG et al., 2003a e 2003b; FELIZARDO et al., 2006; PASQUALETTO e BARBOSA, 2006).

Por outro lado, as pesquisas vêm demonstrando um grande potencial de utilização do óleo residual de fritura como matéria prima para a geração de biodiesel, demonstrando que mesmo sendo um biodiesel de óleo parcialmente oxidado, suas características têm se mostrado bastante próximas às do óleo diesel convencional, com bons rendimentos nos processos reacionais de produção (MITTELBAACH e TRITTHART, 1988; KAIEDA et al., 1999; COSTA NETO et al., 2000; MURAYAMA,

FUJIWARA e NOTO, 2000; ZHANG et al., 2003a e 2003b; ZHENG et al., 2006; FELIZARDO et al., 2006; PASQUALETTO e BARBOSA, 2006; WANG et al., 2007; YAGIZ, KAZAN e AKIN, 2007).

Estima-se que no mundo em torno de 20 milhões de toneladas de óleos e gorduras são utilizados para fritura, anualmente, a maior parte industrialmente (KHEANG et al., 2006). Foi estimada para os Estados Unidos e Canadá uma produção per capita anual de aproximadamente 4 kg de óleo residual de fritura, o que corresponde a aproximadamente 700 mil a 1 milhão de toneladas ano e 135 mil toneladas ano, respectivamente. Para o Reino Unido a estimativa foi de 200 mil toneladas anuais (CHHETRI, WATTS e ISLAM, 2008). No Egito o consumo de óleo vegetal para fritura foi estimado em aproximadamente 1,25 milhão de toneladas por ano em 2005 (REFAAT et al., 2008).

No Brasil, um levantamento primário da oferta de óleos residuais de frituras, passíveis de serem coletados (produção superior a  $100 \text{ kg.mes}^{-1}$ ), revelou um valor da oferta superior a 30 mil toneladas anuais. Considerando em cerca de 80 % na conversão do óleo residual de fritura em biodiesel, é crescente o interesse pelo aproveitamento deste tipo de matéria prima para a geração do biocombustível no País (SILVA et al., 2005).

Christoff (2006) considerou três tipos principais de vantagens decorrentes da utilização de óleos residuais de fritura como matéria-prima para produção de biodiesel: a dispensa do processo de extração do óleo (tecnológica), a redução do custo da matéria prima (econômica) e a destinação adequada de um resíduo que, em geral, é descartado inadequadamente impactando o solo e o lençol freático e, conseqüentemente, a biota desses sistemas (ambiental).

Canakci e Özsezen (2005), Canakci (2007) e Enwearemadu e Mbarawa (2009), publicaram abrangentes artigos de revisão sobre o potencial de resíduos oleosos de fritura e aspectos técnicos da produção e análise de biodiesel de óleo de fritura usado. Ressaltaram que o alto custo do biodiesel na atualidade deve-se à matéria prima, predominantemente óleo vegetal e, que o óleo de fritura usado é uma das matérias primas econômicas para a produção deste combustível. Entretanto, destacaram que os produtos formados durante o processo de fritura, como a presença de elevados teores ácidos graxos livres, pH muito baixo (inferiores a 2,0) e água, podem afetar a reação de transesterificação e as propriedades do biodiesel.

### 3.4.1.2 Lodo de esgoto

Oliveira (2004) avaliou o potencial energético do lixo e da obtenção de biodiesel a partir de insumos residuais dentre eles do lodo gerado em estações de tratamento de efluentes. Este trabalho originou uma patente e uma empresa incubada pela COPPE/RJ, visando à produção de biodiesel a partir de óleos e graxas residuais do lodo de esgoto doméstico.

Pesquisas têm indicado, recentemente, que os lipídeos contidos no lodo de esgoto constituem matéria prima potencial para a produção de biodiesel, com a literatura indicando um conteúdo de, aproximadamente, 20% de óleos e graxas solúveis em éter, que podem ser convertidos em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (DUFRECHE et al., 2007). Estes autores concluíram que a integração de processos de extração de lipídeos em 50% das estações de tratamento de esgoto sanitário nos Estados Unidos e a transesterificação dos lipídeos extraídos poderia levar à produção de aproximadamente 1,8 bilhões de galões de biodiesel, que representava, na ocasião, em torno de 0,5% da demanda anual de diesel de petróleo naquele País. Relataram também a possibilidade de redução do preço do biodiesel, pela praticamente inexistência de custo da matéria prima e, a possibilidade de ajudar na solução de problemas ambientais relativos ao tratamento e à disposição do lodo.

A fração lipídica do lodo de esgoto sanitário é originada da adsorção direta de lipídeos de águas residuárias domésticas e industriais pelo lodo e ou dos fosfolipídeos constituintes da membrana celular dos microrganismos que compõem o lodo, seus metabólitos e por produtos da lise celular. Assume-se que as células microbianas que constituem o lodo apresentem cerca de 2% de fósforo em peso seco (com 50% de fósforo na membrana celular), o que leva a estimativas da massa de fosfolipídeos de 24% da biomassa, em peso seco, passivos de serem utilizados como matéria prima de ésteres de ácidos graxos (NELSON e COX, 2005).

Pesquisando o potencial de utilização dos lodos primário e secundário produzidos na estação de tratamento de esgoto sanitário de Tuscaloosa, nos Estados Unidos, Mondala e outros (2009) utilizaram o processo de transesterificação com metano e catálise com ácido sulfúrico. Por análise econômica foi estimado um custo de \$3,23/galão do biodiesel obtido por este processo, com um rendimento de 10% de ésteres metílicos de ácidos graxos por peso seco de lodo.

Conforme Jordão e Pessoa (2005), a presença de óleos e graxas nos lodos de fossa séptica ou tanque séptico é muito variável, com taxas de geração variáveis de 0,07 a 0,1 m<sup>3</sup>.hab<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>, para esgoto tipicamente doméstico, valores que podem interferir nos processos de tratamento e manuseio do lodo nas ETES receptoras. Os teores relatados de óleos e graxas são também muito variáveis, entre 327 a 8000 g.L<sup>-1</sup> (BORGES, 2009). Considerando-se, portanto, a concentração média de óleos e graxas de aproximadamente 4 g.L<sup>-1</sup>, pode-se estimar a geração líquida na faixa de aproximadamente 0,3 a 0,4 kg .hab<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> deste resíduo oleoso, o que torna muito interessante a extração desta fração lipídica, tornando-a, a partir de então, matéria-prima para a produção de biodiesel.

#### **3.4.1.3 Escuma de caixa de gordura**

O tratamento de águas residuárias domésticas é dificultado pela grande quantidade de óleos e gorduras nelas despejados, uma vez que, por exemplo, a água usada na cozinha traz grande quantidade destes produtos provenientes da limpeza dos utensílios, que, segundo Ben e MCauliffe apud Souza (2003), representam 50% dos compostos orgânicos em suspensão. Estas gorduras, segundo Allinger apud Souza (2003), são ésteres de alto peso molecular, formados a partir de ácidos graxos superiores (C12 - C22) e glicerol, portanto cadeias longas, que prejudicam o tratamento e provocam entupimentos nas tubulações por incrustações, dificultando o tratamento biológico (aeróbio/anaeróbio), propriamente dito, nas ETEs (Estações de Tratamento de Efluentes), além de constituírem grandes fontes de contaminação do solo e dos recursos hídricos, quando são dispostos.

Especificamente, os resíduos na caixa de gordura se encontram emulsificados devido ao uso de detergentes, que agem como tensoativos, formando uma película protetora na superfície das gotículas, e das próprias condições físicas e químicas existentes na caixa, tais como reações químicas e biológicas, temperatura, pH, que favorecem a emulsificação. Com a desemulsificação obtêm-se gorduras que podem ser reutilizadas como matéria prima (SOUZA, 2003).

Souza (2003) desenvolveu uma metodologia para desemulsificação e purificação dos ácidos graxos de resíduos gordurosos emulsificados em caixas de gordura dos sistemas de pré-tratamento de esgotos domésticos, classificados como resíduos

Classe I. O objetivo foi buscar a minimização do problema ambiental causado pela disposição inadequada destes resíduos na natureza e, propiciar o seu reaproveitamento como matéria prima para a produção de biocombustível (biodiesel e gás combustível), sabões e detergentes. Todo o estudo foi conduzido à luz de um procedimento de mudança de escala, iniciando-se com a determinação experimental da cinética da reação de desemulsificação em escala de laboratório, seguido do estudo de análise de superfície de resposta e planejamento experimental em escala de bancada, com a finalidade de desencadear a escalada do processo de desemulsificação de resíduos gordurosos.

WUST (2004) caracterizou resíduos oleosos emulsificados, com especial atenção à composição em ácidos graxos, teor de umidade e ácidos graxos livres. Uma das principais características destes resíduos é a existência de um elevado teor de ácidos graxos livres, resultantes da degradação da molécula do triglicerídeo. Estudou a transesterificação com catálise básica e ácida e, esterificação com catálise ácida. Os procedimentos baseados em reações com catálise básica não apresentaram bons resultados e por este motivo foram explorados os procedimentos baseados em reações com catálise ácida. Estas reações foram avaliadas, utilizando-se diferentes condições de temperatura e pressão e os rendimentos líquidos observados foram estimados como próximos a 80%.

Barros, Wust e Meier (2008) avaliaram resíduos gordurosos provenientes de caixas de gordura de um shopping center no Brasil, em coleta única, cuja praça de alimentação possuía 31 estabelecimentos distribuídos em diversos segmentos, os quais contavam com programa de coleta seletiva preliminar dos resíduos gordurosos, antes da emissão final para as caixas de gordura. Foram utilizadas reações catalíticas em duas etapas: inicialmente ácida (esterificação) e depois básica (transesterificação), com rendimentos de aproximadamente 80% na obtenção de ésteres de ácidos graxos (biodiesel), utilizando etanol como diluente. Concluíram os autores que as reações, de um modo geral, podem ser conduzidas em temperaturas inferiores a 100°C, com baixo consumo de energia; o procedimento permite a utilização de aproximadamente 80% dos resíduos gordurosos, hoje depositados inadequadamente em aterros; e que a desemulsificação de resíduos gordurosos e sua posterior conversão em biodiesel é uma atividade com potencial caráter gerador de empregos e renda.

### 3.4.2 Transesterificação de OGR por catálise química e enzimática

Na reação de transesterificação as ligações covalentes do triglicerídeo são rompidas pelo álcool, havendo transferência de átomos de hidrogênio deste para o triglicerídeo e a formação de glicerina ou glicerol (Figura 8). Os ésteres de ácidos graxos obtidos, cuja massa molecular e viscosidade é próximo ao do diesel de petróleo, são conhecidos como biodiesel e apresentam características físicas semelhantes às do óleo diesel (FUKUDA, KONDO e NODA., 2001; COSTA NETO, 2002; CASTRO et al., 2004; FELIZARDO et al., 2006; REGITANO D'ARCE, 2006).

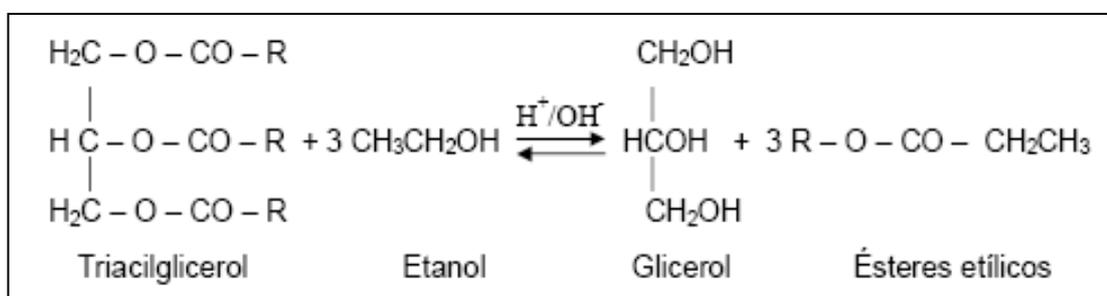


Figura 8 - Etanólise química ácida e básica de um triglicerídeo, resultando na formação de ésteres alquílicos ou biodiesel (B100) e glicerol

Fonte: Felizardo et al. (2006).

Para que o biodiesel seja economicamente competitivo, é imprescindível que no seu processo químico de síntese sejam utilizadas matérias primas e catalisadores de baixo custo. Os métodos reacionais na obtenção de biodiesel englobam os químicos (básicos ou ácidos), fluidos supercríticos, pirólise (craqueamento térmico) e enzimáticos. Para a catálise química, básica ou ácida, são utilizados vários catalisadores, com vantagens e desvantagens no processo, que podem se observadas na Tabela 6.

Ainda que represente a rota tecnológica mais utilizada, pelo elevado rendimento e rapidez do processo reacional, o emprego de NaOH ou KOH exige que a matéria-prima apresente baixa acidez (menor do que 1mg de KOH/g de amostra) para evitar o consumo improdutivo de álcali e a subsequente formação de sabões (VAN GERPEN, 2005). São considerados inconvenientes desta rota catalisadora a dificuldade na recuperação do glicerol, a dificuldade de reuso do catalisador alcalino que permanece no meio, a necessidade de tratamento posterior dos efluentes alcalinos, a

natureza fortemente energética do processo, a interferência dos ácidos graxos livres e a presença de água na reação (BAN et al., 2001 e 2002; DALLA-VECCHIA, 2004). Por outro lado, catalisadores ácidos, como o  $H_2SO_4$ , recomendados para utilização no caso de matérias primas ácidas, requerem a ausência de água, caso contrário também determinam saponificação, gerando subprodutos indesejáveis, com menores rendimentos, maior lentidão reacional, necessidade de elevadas temperaturas para a reação, além do que, devido a ação corrosiva, implicam na necessidade de utilização de equipamentos específicos (FACCIO, 2004). Ambos processos requerem a utilização excessiva de álcool (etanol), que precisa ser recuperado, produzindo sais que devem ser removidos e geram glicerina ruim (VAN GERPEN, 2005).

Tabela 6 - Vantagens e desvantagens de diferentes catalisadores utilizados na produção de biodiesel

Tipo	Exemplo	Vantagens	Desvantagens
Álcalinos	NaOH, KOH	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Alta atividade catalítica</li> <li>•Baixo custo</li> <li>•Cinéticas favoráveis</li> <li>•Operacional simples</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Baixa tolerância a AGL</li> <li>•Condições anídricas</li> <li>•Saponificação</li> <li>•Formação de emulsão</li> <li>•Mais água para a purificação</li> <li>•Descartável</li> </ul>
Ácidos	$H_2SO_4$	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Esterificação e transesterificação, simultaneas</li> <li>•Evitam a saponificação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Corrosão de equipamentos</li> <li>•Mais resíduos de neutralização</li> <li>•Dificuldade para reciclagem</li> <li>•Maior temperatura reacional</li> <li>•Longo tempo reacional</li> <li>•Frac atividade catalítica</li> </ul>
Enzimáticos	Lipases	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Evitam a saponificação</li> <li>•Não poluentes</li> <li>•Facilitam a purificação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Alto custo</li> <li>•Sofrem desnaturação</li> </ul>

AGL = ácidos graxos livres.

Fonte: Leung et al. (2010).

Óleos e graxas residuais (OGR) do saneamento ambiental, pelas características apresentadas quanto à presença de ácidos graxos livres e água, são matérias primas que limitam a utilização da catálise química básica ou ácida, necessitando de um pré-tratamento para a sua adequação (remoção de ácidos graxos e água), o que resulta em maior complexidade no processo e custo final de produção do biodiesel. (ÇANAKCI e VAN GERPEN, 2001).

Conforme Canakci e Van Gerpen (2001), os óleos e graxas residuais tipicamente contêm de 10 a 25% de ácidos graxos livres, o que leva à queda de rendimento no

processo de transesterificação alcalina e levam ao efeito deletério sobre a separação da glicerina dos ésteres de ácidos graxos devido ao efeito da saponificação. Os sabões promovem a formação de emulsões estáveis que previnem a separação do biodiesel da glicerina durante o processamento.

Lee, Foglia e Chang (2002) desenvolveram estudos sobre a produção de biodiesel a partir de gordura animal e gorduras resultantes dos processos de fritura, e constataram que a presença de compostos polares como água e ácidos graxos livres retardaram a reação e diminuíram o seu rendimento de 96% para 25%, quando não removidos, em processo de transesterificação com catálise básica.

### **3.4.3 Transesterificação de OGR com biocatalisadores lipolíticos**

#### **3.4.3.1 Biocatalisadores extracelulares (lipase imobilizada)**

Estudos visando alternativas à utilização da catálise química para a geração de biodiesel, a partir de óleos e graxas residuais (OGR) do saneamento ambiental, vêm sendo realizados. Os resultados obtidos têm demonstrado que a catálise enzimática com lipases é capaz de sintetizar especificamente ésteres alquílicos, permitir a recuperação simples do glicerol, permitir a esterificação ou transesterificação de matéria prima contendo altos teores de ácidos graxos e de água, transesterificar totalmente os ácidos graxos livres com bons rendimentos e economia de energia. Além disso, à catálise enzimática é atribuído o rótulo de “química verde”, pelas vantagens ambientais incontestáveis e desejáveis à produção industrial do biodiesel (KAIEDA et al., 1999; NASCIMENTO, COSTA NETO e MAZZUCO, 2001; BAN et al., 2001 e 2002; ODA et al., 2005; VIEIRA, SILVA e LANGONE, 2006; AKOH et al., 2007; BERNARDES et al., 2007; ANTCSAK et al., 2009; DABDOUB, BRONZEL e RAMPIN, 2009; FJERBAEK, CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009; LEUNG et al., 2010; BISEN et al., 2010; GHALY et al., 2010).

As lipases microbianas são, em sua maioria, extracelulares, que podem ser produzidas por fermentação submersa ou fermentação em estado sólido. O processo de produção pode ou não ser seguido por etapas de purificação, sendo que a purificação geralmente requer a utilização de processos complexos, que dependem

da origem e da estrutura da lipase e apresentam custos geralmente elevados (GHALY et al., 2010).

Considera-se também que o uso de lipases comerciais livres, não imobilizadas, fúngicas ou bacterianas, resulta em dificuldades técnicas, sendo praticamente impossível a sua recuperação e reuso, o que incrementa os custos econômicos do processo, além de promover a contaminação do produto (VAN GERPEN et al., 2005).

Para a superação destas dificuldades apresentadas na utilização das lipases livres, inúmeros pesquisadores propuseram em seus trabalhos a utilização dessas enzimas na sua forma imobilizada em estruturas físicas (suportes) visando maior estabilidade reacional e permitindo o reuso desses biocatalisadores várias, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido (YAGIZ, KAZAN e AKIN, 2007; BARON, 2008; DABDOUB, BRONZEL e RAMPIN, 2009; TAN et al., 2010).

A maioria das lipases imobilizadas comercialmente disponíveis são extracelulares, sendo as mais comuns: Novozyme 435, que é lipase de *Candida antarctica*; Lipozyme RM IM, que é lipase de *Rhizomucor miehei* e Lipozyme TL IM, que é lipase de *Thermomyces lanuginosus* (GHALY et al., 2010). Não por acaso, em relação às publicações, cujo objetivo é avaliar a transesterificação biocatalítica para geração de biodiesel, são mais citadas as utilizações de lipases produzidas por *C. antarctica* (SHIMADA et al., 1999; WATANABE et al., 2001; SHIMADA et al., 2002; ZHENG et al., 2009), *T. lanuginosus* (DIZGE e KESKINLER, 2007; RANGANATHAN, NARASMHAN e MUTHUKUMAR, 2007; BISEN et al., 2010; GHALY et al., 2010), *R. miehei* (NELSON, FOGLIA e MARMER, 1996; VIEIRA, SILVA e LANGONE, 2006), *C. rugosa* (KAIEDA et al., 2001) e *R. oryzae* (KAIEDA et al., 1999; BAN et al., 2001 e 2002).

Porém, a despeito dos bons resultados obtidos com as lipases imobilizadas, ao nível experimental, a complexidade, tempo e custos de imobilização, ainda mantêm sua utilização antieconômica, em grande escala, ainda que considerada a possibilidade de diversos reusos da enzima (SHIMADA et al., 2002; VAN GERPEN et al., 2005; DIZGE e KESKINLER, 2007; RANGANATHAN, NARASMHAN e MUTHUKUMAR, 2007; BISEN et al., 2010; GHALY et al., 2010, JIN e BIERMA, 2010).

Na Figura 9 encontra-se esquematizada uma comparação entre o desenvolvimento de processos de obtenção de biocatalisadores lipolíticos a partir de lipases

extracelulares e intracelulares, permitindo-se inferir a vantagem das últimas, devido à simplicidade de obtenção, uma vez que ocorre em poucas etapas, consequentemente com redução do tempo de obtenção e dos custos.

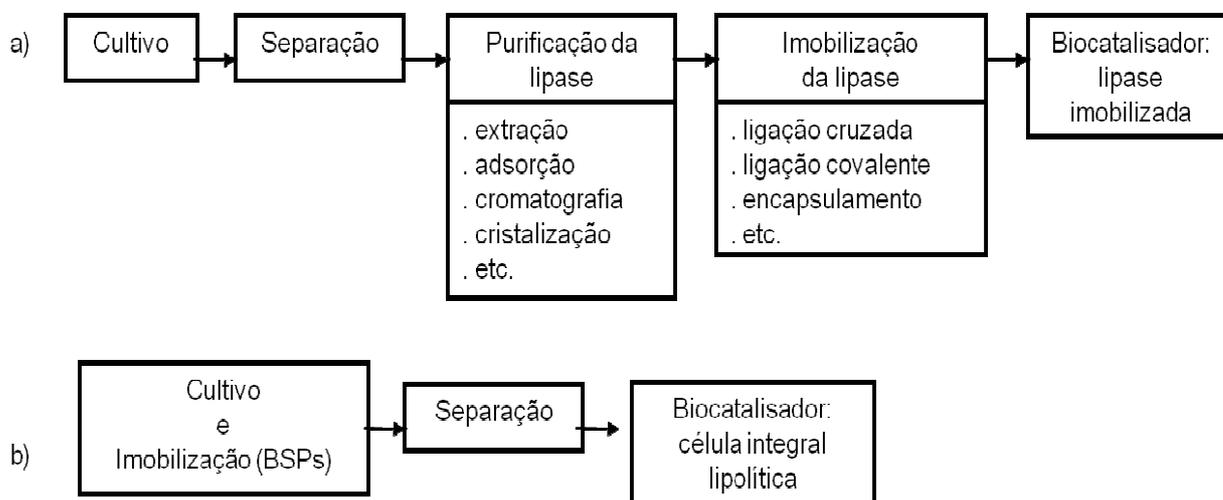


Figura 9 - Comparação de processos de produção de biocatalisadores utilizando lipases extra (a) e intracelulares (b)

Fonte: Fukuda, Kondo e Noda (2001) e Du et al. (2008).

### 3.4.3.2 Biocatalisadores intracelulares (célula integral lipolítica)

A busca por um biocatalisador adequado para uma determinada conversão pode envolver o uso de uma enzima já conhecida, disponível comercialmente ou descrita na literatura ou ainda a triagem da biodiversidade por organismos que possuam o perfil enzimático desejado. É possível afirmar que os biocatalisadores utilizados na atualidade representam uma fração bastante pequena do que é possível se estimar, visto que apenas 1% da diversidade microbiana existente é possível de ser cultivada utilizando metodologias padrão, de acordo com Oliveira e Mantovani (2009).

Por sua vez, é importante na eleição do biocatalisador avaliar se o conjunto enzimático a ser explorado constitui uma célula inteira ou um extrato enzimático puro ou parcialmente purificado. Entre as vantagens em utilizar lipases isoladas puras ou parcialmente purificadas estão a maior produtividade e facilidade de isolamento dos produtos, embora os fatores relacionados a custo, disponibilidade da enzima e inexistência de sistemas apropriados de regeneração da mesma, possam inviabilizar sua utilização para determinados processos. Por outro lado, a utilização de células integrais lipolíticas vem ganhando espaço nas pesquisas, em função da facilidade de recuperação e reuso, as baixas temperaturas requeridas, condições reacionais

suaves com baixo consumo energético e pH não agressivo, além de menores custos dos processos (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; JIN e BIERMA, 2010).

O maior problema em relação à produção enzimática de biodiesel é o custo da lipase, correspondente a 90% do custo do processo. Parte significativa deste custo está associado com a purificação das lipases e o uso de veículos ou suportes enzimáticos e ou processos de imobilização onerosos. Desta forma, vem sendo pesquisada a utilização direta de células fúngicas integrais, chamadas também de células compactas, produtoras de lipases intracelulares, sem imobilização ou imobilizadas, visando a geração deste biocombustível (GHALY et al., 2010).

A imobilização de lipases em suportes porosos para biomassa (BSP), obtidos com baixo custo, mas que permitam suficiência na transferência de massa para otimizar a eficiência da transesterificação (DIZGE e KESKINLER, 2008), é significativamente vantajosa, pois evita o processo de purificação da lipase e o biocatalisador pode ser utilizado repetidas vezes, sem perda de atividade ou com perda desprezível, com amplo potencial para a produção em biodiesel em escala real (BAN et al., 2001 e 2002; ADAMCZAK e BEDNARSKI, 2004; AKOH et al., 2007; ROMERO, BAIGORI, e PERA, 2007; RANGANATHAN, NARASIMHAN, e MUTHUKUMAR, 2008; FUKUDA et al., 2008; QIN et al., 2008; FUKUDA, KONDO e TAMALAMPUDI, 2009; SUAREZ et al., 2009; DABDOUB, BRONZEL e RAMPIN, 2009; RODRIGUES e FERNADEZ-LAFUENTE, 2010; TAN et al., 2010; BISEN et al., 2010; GHALY et al., 2010; JIN e BIERMA, 2010). A utilização de lipase enquanto contida nas células microbianas produtoras é referida como lipase intracelular (GHALY et al., 2010).

Ao nível mundial, alguns grupos de pesquisadores têm publicado sobre a produção de ésteres de ácidos graxos (biodiesel), com a utilização de células integrais (biomassa lipolítica), porém somente um pequeno grupo de microrganismos vem sendo utilizado nas pesquisas: *C. antarctica*, *R. chinensis* e *R. oryzae* (FUKUDA et al., 2008; FUKUDA, KONDO e TAMALAMPUDI, 2009; GHALY et al., 2010), com prevalência absoluta do fungo filamentosso *R. oryzae* (BAN et al., 2001 e 2002; MATSUMOTO et al., 2001; ODA et al., 2005; SHIRAGA et al., 2005; HAMA et al., 2006 e 2007; LI, DU E LIU, 2007; LI et al., 2008; TAMALAMPUDI et al., 2008; JIN e BIERMA, 2010). Constituem-se exceção, em relação à utilização direta dos fungos pesquisados Matsumoto e outros (2001) e Shiraga e outros (2005), que utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, geneticamente engenheirada para produzir a lipase de *R.*

*oryzae* e Tamalampudi e outros (2008), que desenvolveram um isolado recombinante do fungo *Aspergillus*, expressando o gene que codifica a produção de lipases por *Candida antarctica*.

Em condições de laboratório, os biocatalisadores lipolíticos de células integrais foram, em sua maioria, imobilizados em diferentes tipos de partículas suportes porosas de biomassa (BSPs), uma técnica desenvolvida por Atkinson e outros (1979), que permite o reuso do catalisador em reações subseqüentes. Porém, Matsumoto e outros (2001), Shiraga e outros (2005) e Romero, Baigori e Pera (2007), estes últimos trabalhando com lipases ligadas ao micélio de *Aspergillus niger* MYA 135, adicionaram o biocatalisador fúngico diretamente no reator, com bons resultados, sem sua previa imobilização em qualquer tipo de suporte; situação que, a princípio, não permite a reutilização do biocatalisador, contudo elimina o tempo e o custo necessários à processo de imobilização.

Adamczak e Bednarski (2004) avaliaram a imobilização de *Rhizomucor miehei* e *Y. lipolytica*, sobre partículas suportes de biomassa (BSPs), constituídas de partículas cúbicas de polipropileno ou poliuretano, quanto ao incremento da atividade de lipases intracelulares por estes fungos. Em poliuretano foi obtido o melhor resultado com atividade lipolítica cerca de 2,1 a 4,3 vezes maior que a obtida com a utilização da biomassa livre. A atividade lipolítica intracelular de *R. miehei* foi de 90,3 U.L<sup>-1</sup>, enquanto a de *Y. lipolytica* foi de 90,3 U.L<sup>-1</sup>. Em relação à utilização de enzimas livres os resultados foram similares, porém com vantagem para a biomassa imobilizada quanto à hidrólise de gorduras residuais.

Conforme Gunasekaran e Das (2005), em diversos casos, a imobilização de células produtoras de lipases aumenta a extensão da reação e facilita o fluxo do processo, devido, principalmente às seguintes razões: 1) evita a perda de células por lavagem em altas taxas de diluição, 2) maior concentração de células no reator, e, 3) fácil separação das células da solução contendo o produto.

Evidências sugerem que algumas lipases fúngicas são ligadas à membrana celular na parte interna da parede celular, com importante papel catalisador nos processos hidrolíticos e de síntese de ésteres, conforme se segue:

Pereira-Meirelles, Rocha-Leão e Sant'Anna Jr. (2000), verificaram que a maior atividade lipolítica por *Y. lipolytica* no início do processo de cultivo mostrou-se

vinculada a lipases intracelulares. A produção de lipase extracelular iniciou-se quando aproximadamente 50% da fonte de carbono (óleo de oliva ou glucose) foram consumidos, chegando ao máximo de concentração no final da fase estacionária de desenvolvimento da levedura.

Diyorov e outros (1994) observaram a presença de lipases com diferentes massas moleculares em dois isolados de *R. microsporus* (UzLT-4B e UzLT-5C). Em meio com substrato lipídico, o primeiro isolado secretou lipases com 45 e 69 kDa, enquanto que o segundo 32, 66 e 98 kDa. Observações utilizando imuno-eletro-microscopia indicaram que lipases intracelulares localizavam-se em zonas periféricas das hifas, principalmente no periplasma e vesículas adjacentes. Na parede celular verificou-se a presença de estruturas anômalas, que acumularam lipases e, que aparentemente, exportaram estas enzimas para fora da célula.

Hama e outros (2006) analisaram a localização de lipases em células de *R. oryzae*, imobilizadas em reticulado de poliuretano, e mostraram que as células produziram dois tipos de lipases com diferentes massas moleculares, de 34 e 31 kDa (Figura 10). A primeira, ligada à parede celular (ROL34) e a segunda (ROL 31), principalmente ligada à membrana celular. A imobilização inibiu fortemente a secreção de ROL 31 para o meio de cultura. As observações sugeriram que esta lipase originou-se da clivagem de um resíduo de 28 aminoácidos localizado na região N-terminal de ROL34. Verificou-se também forte correlação entre a atividade de metanólise intracelular com a quantidade de ROL31, sugerindo que esta enzima localizada na membrana fúngica desempenha um papel crucial na atividade de metanólise por células de *R. oryzae*. Em razão disto, pesquisas vem sendo conduzidas no sentido de promover o tratamento das células lipolíticas para aumentar a permeabilidade antes de sua utilização. Ban e outros (2001) pré-trataram as células fúngicas com vários solventes orgânicos. Matsumoto e outros (2001) e Shiraga e outros (2005) usaram secagem a frio para aumentar a permeabilidade. Por sua vez, Ban e outros (2002) e Oda e outros (2005) verificaram que a simples secagem ao ar por 24 a 48 h mostrou-se adequada.

Dentre os pesquisas acima citadas, apenas a de Jin e Bierma (2010) incluiu óleos e graxas residuais (OGR) do saneamento ambiental. Nesta, os pesquisadores avaliaram a utilização de células integrais de *R. oryzae* (ATCC 10260), não

imobilizadas, na conversão de óleos virgens e residuais (triglicerídeos) em biodiesel (metil éster de ácidos graxos, FAME) na presença de 15% de água.

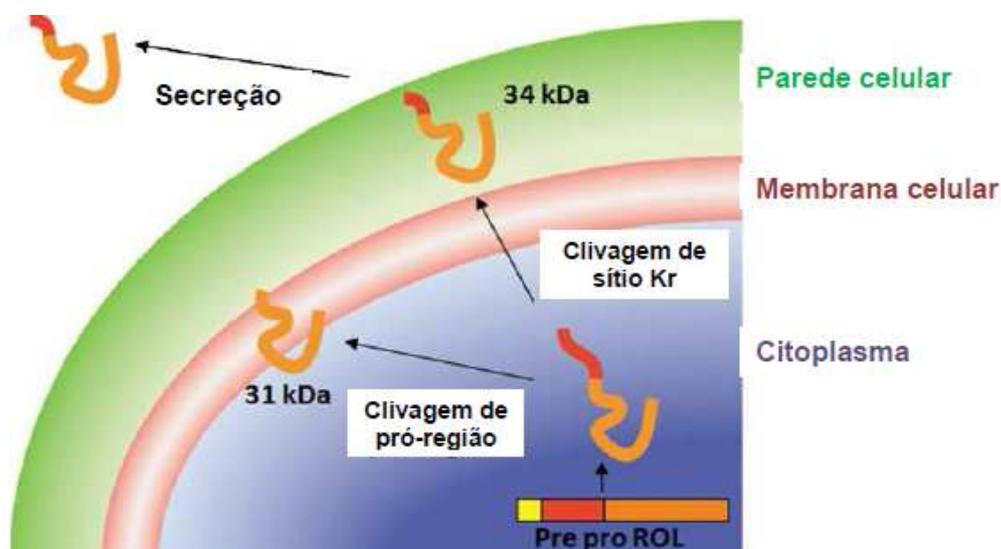


Figura 10 - Lipases produzidas por células integrais de *Rhizopus oryzae*, imobilizadas em poliuretano: 34kDa (ligada à parede celular) e 31kDa (ligada à membrana celular)  
 Fonte: adaptado de Fukuda, Kondo e Tamalampudi (2009).

Nota: informações adaptadas pelo autor.

Os resultados indicaram uma conversão de 90% a partir de óleos virgens e de, aproximadamente, 100% dos ácidos graxos remanescentes, com tempo de reação de 96 h e temperatura ambiente (25°C). Em 72 h a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos foi de, aproximadamente, 75% para óleo virgem, 80% para o óleo residual de fritura e 55% para a espuma de caixa de gordura. Verificou-se a disponibilidade de 80,2% do O&G da espuma para a conversão em ésteres de ácidos graxos.

O emprego de *pools* enzimáticos fúngicos produzidos por fermentação em meio sólido a partir de rejeitos industriais de custo reduzido pode representar importante contribuição como adjuvante no tratamento de efluentes com elevados teores de óleos e graxas. Afirma-se um amplo campo científico na investigação das etapas de hidrólise enzimática, anteriores aos tratamentos biológicos tradicionais, com o intuito de melhorar as características do efluente após tratamento, especialmente quando o material a ser tratado apresenta elevadas concentrações de óleos e graxas, e de melhorar o desempenho do tratamento biológico de interesse (MENDES et al, 2005; CAMMAROTA e FREIRE, 2006) . O mesmo se estima em relação à transesterificação de óleos e graxas residuais do saneamento, que são ricos em

ácidos graxos livres e com dificuldade para desidratar, com a finalidade de produzir biodiesel (JIN e BIERMA, 2010; BISEN et al., 2010 e GHALY et al, 2010).

Quando o biocatalisador lipolítico é célula integral, há a possibilidade de ocorrência de reações paralelas, resultantes do metabolismo celular, reversibilidade e baixa tolerância a substratos e solventes orgânicos, inativando o sistema enzimático, que são capazes de provocar quedas significativas no rendimento ou até mesmo inviabilizar o processo, conforme Oliveira e Mantovani (2009).

O tipo de estrutura fúngica inoculada também pode ser importante e influenciar a produção de lipases, o tempo reacional, portanto a obtenção de biocatalisadores de célula integral. A morfologia da estrutura fúngica é, por sua vez, função do tamanho e maturidade do inóculo, agitação, composição do meio, temperatura e pH, etc., conforme Jin e Bierma (2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia, vinculado ao Laboratório de Saneamento – LABSAN do Departamento de Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo (CT-UFES), localizado em Vitória, ES.

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, a água, os meios de cultura e/ou substratos, vidrarias e utensílios laboratoriais foram esterilizados em autoclave a 121°C (Autoclave vertical BIOENG, mo d. A75), durante 20 min, ou estufa de esterilização (Fisher Scientific) a 180°C por 2 h, após devidamente acondicionados. Os isolados microbianos foram mantidos armazenados à temperatura de 5°C, em tubos de cultura com o meio BDA (batata-dextrose-ágar) conforme Menezes e Assis (2004). A recuperação ocorreu, sempre que necessária, repicando uma porção da colônia para o centro de placa de Petri com o meio de cultura BDA, seguindo-se incubação a 28°C, por 5 dias, em estufa incubadora (DBO – Biotec BT424).

As análises estatísticas dos resultados de todas as etapas experimentais, bem como a confecção dos respectivos gráficos foram efetuadas com a utilização dos softwares “SPSS for Windows” versão 11.5.0 e Excel 2007.

Este capítulo está estruturado de acordo com os objetivos específicos, subdividindo-os para melhor entendimento das etapas metodológicas efetuadas neste trabalho.

### 4.1 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES A PARTIR DE DIFERENTES AMOSTRAS AMBIENTAIS, EM MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS

#### 4.1.1 Isolamento a partir de tecidos necrosados de plantas e de insetos

Para a obtenção de isolados fúngicos, procedeu-se o isolamento a partir de tecidos vegetais (banana, limão, mamão, manga e de folhas de oiti) necrosados por atividade fitopatogênica e, de insetos-pragas de plantas (formiga saúva, lagarta-da-goiabeira, lagarta do cartucho- do-milho, moleque- da-bananeira, gorgulho-do-milho,

broca-do-cafeeiro, cigarrinha da cana-de-açúcar e de pastagens) necrosados por atividade entomopatogênica.

Para o isolamento a partir de tecidos vegetais e dos insetos necrosados, foi utilizado o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), com a seguinte composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ): batata (200), dextrose (20) e ágar (17). O pH final foi corrigido para 6,0 usando NaOH 0,1 M. O método foi o de isolamento direto, descrito por Menezes e Assis (2004), com modificações, que consistiram na transferência de esporos presentes na superfície do tecido vegetal necrosado ou dos insetos-pragas mortos, para placas de Petri contendo 20 mL do meio BDA, acrescido de 1 mg de sulfato de estreptomicina e 1 mg de cloranfenicol, para evitar o desenvolvimento de bactérias e actinomicetos, em condições assépticas. A transferência de esporos dos fungos ocorreu com utilização de alça de repicagem descartável, ou com auxílio de um estilete flambado, usando o método de esgotamento em estrias, conforme Tortora (2005). As placas foram incubadas durante 96 h, à temperatura de 28°C. Após o período de incubação, as colônias morfológicamente diferentes foram repicadas, sucessivamente, para placas com os meios MB (Meio Basal) e MMOS<sub>R</sub> (meio mínimo mineral + óleo de soja + rodamina-B), reacionais para atividade lipolítica extra e intracelular. Também foi utilizada, para esta finalidade o método de esgotamento em estrias, até o completo isolamento, quando então as culturas puras foram repicadas para tubos de cultura com o meio BDA e armazenadas a 5°C.

O MB teve a seguinte composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ): peptona (10), NaCl (5), CaCl<sub>2</sub> (0,1), ágar (15) e, após autoclavado, teve acrescidos, como substrato lipídico, o sorbitol monolaurato (Tween 80) na proporção de 1% (v/v) e, 50 mg de sulfato de estreptomicina e 50 mg de cloranfenicol, antibióticos contra bactérias e actinomicetos, respectivamente, estes últimos acrescentados após o resfriamento do meio para 45°C, antes de ser vertido nas placas de Petri. O pH final do meio MB foi corrigido para 6,0, com NaOH 0,1 M.

O MMOS<sub>R</sub> teve a seguinte composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (5,0), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,9), NaCl (1,0), MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (0,3), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,2), ágar (15), solução de micronutrientes (1 mL). O pH inicial foi de 6,5 (tampão fosfato 0,1 M). A solução de micronutrientes apresentou a seguinte composição ( $\text{mg.L}^{-1}$ ): FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O (2000), ZnCl<sub>2</sub> (50), CuCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O (30), MnCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O (500), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>.Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O (50), AlCl<sub>3</sub> (50), CoCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O (2000), HCl concentrado (1 mL). A solução foi agitada em agitador magnético por 20

minutos e transferida para frascos erlenmeyers de 1000 mL para autoclavagem por 20 min a 120°C, seguindo-se o seu armazenamento a 5°C, para posteriores utilizações. De forma equivalente ao MB, foram acrescentados os mesmos antibióticos. Além destes, a este meio de cultura foi acrescentado o corante indicador rodamina-B (C.I. 45170 – Synth, Brasil) na concentração de 0,001% (m/v) do meio de cultura e, o óleo de soja comercial (Liza) na concentração de 10 % (v/v). Previamente o óleo de soja foi emulsificado com Tween 80, na concentração de 0,1 %, acrescentado de 1 mL de água esterilizada sob agitação em vortex por 5 min. As colônias fúngicas que apresentavam, no seu contorno, decorrido este período, um “halo opaco” (no meio MB) ou uma coloração “laranja fluorescente” (no meio MMOS<sub>R</sub>) observada diretamente na biomassa, sob radiação UV, com comprimento de onda de 365 nm (Spectroline model EA – 160, EUA), foram repicadas sucessivamente, para placas de Petri com o mesmo meio de cultura, até o completo isolamento e purificação. Os isolados obtidos foram repicados para tubos de cultura com o meio BDA e armazenados a 5°C. Este procedimento constituiu-se em uma pré-seleção dos isolados fúngicos com relação à produção de lipases.

#### **4.1.2 Isolamento a partir do solo e de resíduos oleosos do saneamento**

No caso da obtenção de fungos a partir do solo, os isolamentos ocorreram a partir de uma amostra coletada em uma área de pomar de mangueiras, localizada na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Vitória, ES. No caso da obtenção a partir de resíduos oleosos do saneamento, foram utilizados como fontes o lodo e espuma de esgoto sanitário, coletados na ETE-UFES (UASB-BF), e também espuma de uma caixa de gordura do Restaurante Universitário desta Universidade. Foi também utilizada a espuma de uma caixa de gordura residencial, pertencente a um condomínio de apartamentos localizado em Vila Velha-ES.

Inicialmente procedeu-se o enriquecimento microbiano do resíduo oleoso. Para tal, foi tomada uma alíquota de 10 g do resíduo e transferida para um frasco erlenmyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio mínimo mineral, acrescidos de 10% (v/v) de óleo de soja comercial (Liza). O frasco foi incubado em agitador rotativo (CERTOMAT MO) a 30°C, 120 rpm, por 96 h.

Para o isolamento dos fungos foi retirado um (1) g de cada resíduo oleoso previamente enriquecido, ao qual foram adicionados 100 mL de água destilada esterilizada e o frasco agitado manualmente por 1 min, para diluição e suspensão do conteúdo, e deixado em repouso por 5 min. Do sobrenadante foi coletada uma alíquota de 0,1 mL e transferida para a superfície de uma placa de Petri, contendo 20 ml do meio de cultura MB ou MMOS<sub>R</sub>, solidificado, procedendo-se conforme o método de esgotamento por estrias (TORTORA, 2005). Foram utilizadas seis placas para cada resíduo, três para cada meio de cultura, que foram incubadas a 28°C, por 96 h.

O procedimento de pré-seleção dos isolados fúngicos, com relação à produção de lipases ocorreu de maneira idêntica à descrita na etapa anterior.

#### **4.1.3 Seleção pela avaliação do crescimento e índice enzimático (IE)**

Todos os isolados de fungos obtidos a partir das amostras ambientais que apresentaram atividade lipolítica detectada na etapa anterior, nos meios de cultura MB e ou MMOS<sub>R</sub> foram avaliados, nesta etapa, quanto ao crescimento e atividade lipolítica, utilizando estes mesmos meios de cultura e procedimentos adotados nas etapas anteriores (pré-seleção). Foi também determinado o índice enzimático (IE), que corresponde à razão entre o diâmetro do halo opaco produzido no meio de cultura MB, utilizado para esta finalidade, e o diâmetro da colônia fúngica, conforme Hankin e Anagnostakis (1975), com modificações.

Para avaliação do crescimento cerca de 20 mL dos meios de cultura foram distribuídos em placas de Petri (100 x 10 mm). Após a solidificação, a placa foi inoculada no seu ponto central. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com triplicata para cada isolado analisado, representada por três placas de Petri para cada meio de cultura. A incubação foi por 96 h à temperatura de 28°C, e as medições das colônias ocorreram decorridas 96 h de incubação, utilizando régua milimetrada (Figura 11).

Para a determinação do índice enzimático (IE) foram distribuídos em placas de Petri (100 x 10 mm) cerca de 20 mL do meio de cultura MB. Após a solidificação do meio, por placa, foram transferidos três discos de cultura do fungo (5 mm de diâmetro), distribuídos de forma triangular e distanciados cerca de 2 cm do bordo da mesma. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com triplicatas para

cada isolado analisado, representada por tres colônias desenvolvidas na placa de Petri.

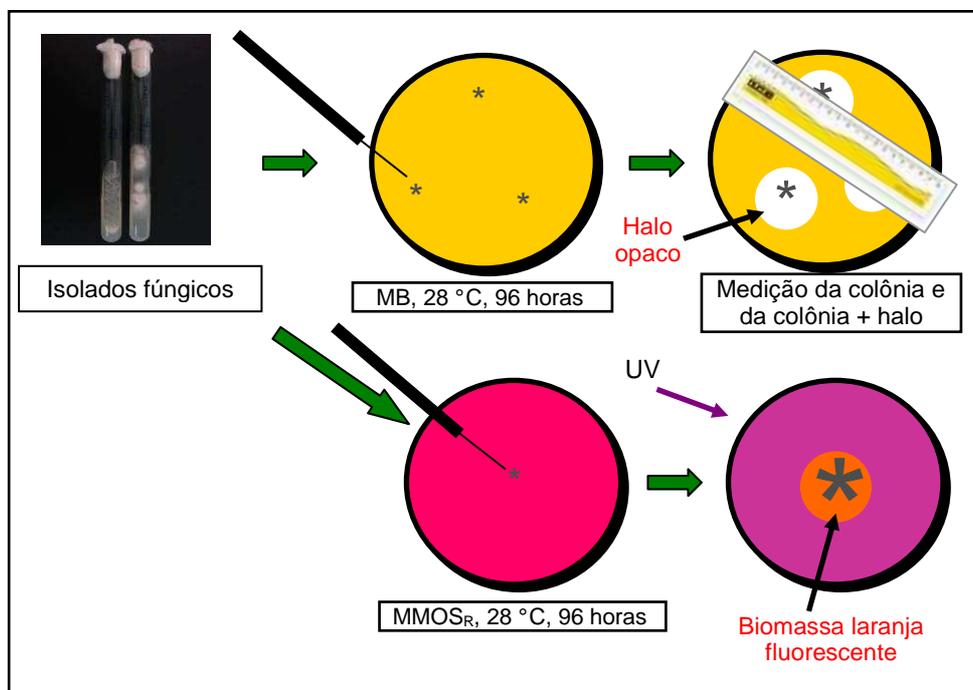


Figura 11 - Esquema do processo de seleção de fungos produtores de lipases extra e intracelulares, nos meios de cultura MB e MMOS<sub>R</sub>, respectivamente

A incubação foi por 96 h à temperatura de 28°C, e as medições do “halo opaco” e das colônias ocorreram decorridas 96 h, utilizando régua milimetrada. Para a quantificação padronizada da atividade lipolítica foi utilizada a equação descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), com modificações, determinando-se o índice enzimático (IE), pela seguinte relação:  $IE = [(diâmetro\ da\ colônia + halo) / diâmetro\ da\ colônia] - 1] \times 10$ .

#### 4.1.4 Identificação dos isolados fúngicos produtores de lipases

Visando a caracterização morfológica e a identificação dos isolados fúngicos produtores de lipases, ao nível de gênero, bem como o respectivo enquadramento taxonômico, foram utilizados cultivos em meio de cultura BDA, a 28°C, durante 7 dias, visando a avaliação do aspecto das colônias (estruturas macroscópicas). Para a caracterização morfológica microscópica, os fungos filamentosos foram cultivados em meio de cultura BDA utilizando a técnica de microcultura em lâminas, conforme Menezes e Assis (2004) e, Rigo (2009). Já a identificação foi efetuada de acordo com

Barnet e Hunter (1986); Domsch, Gams e Anderson (1980) e; Ellis (1976 e 1997). As leveduras foram identificadas somente ao nível de grupo taxonômico, em função das características das colônias e estruturas reprodutivas (forma, cor e esporogênese), com base em Barnett, Payne e Yarrow (2000).

## 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA ESPECÍFICA, SURFACTANTE, REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE FUNGOS, EM CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NOS ESTADOS LÍQUIDO E SÓLIDO

### 4.2.1 Atividade lipolítica específica

Nesta etapa foi avaliada a atividade lipolítica específica de 20 isolados fúngicos (filamentosos e leveduras) selecionados na etapa anterior. Foi utilizada a fermentação em estado líquido (FEL), tendo como substrato o MMOS, descrito anteriormente. Para o cultivo foram utilizados frascos erlenmeyers de 125 mL, com 50 mL do substrato por frasco. Cada frasco foi inoculado com 1 mL de suspensão de esporos fúngicos, na concentração de aproximadamente  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, determinada em câmara de Neubauer. Os frascos foram incubados em agitador orbital, por 120 h, a 150 rpm e 30°C. O conteúdo de cada frasco foi então filtrado a vácuo, e papel de filtro Whatman nº4. Do sobrenadante foram retiradas amostras de um (1) mL e, transferidas para eppendorfs estéreis, então centrifugados a 15000 x g por 20 min a 4°C e, a partir daí, coletados os sobrenadantes (extratos protéicos), destinados à dosagem das proteínas. O conteúdo proteico dos extratos foi determinado pelo método de Bradford (1976), com a curva padrão utilizando albumina bovina como substrato – BSA (Anexo A).

Os extratos enzimáticos obtidos na etapa anterior foram utilizados para a dosagem da atividade lipolítica específica em substrato à base de palmitato de p-nitrofenila (p-NPP), conforme Winkler e Stuckmann (1979). Para tal foi adicionado 0,1 mL do extrato protéico a cada tubo de ensaio contendo 2,4 mL do substrato, submetendo-o à temperatura de 37°C, durante 15 min, em banho-maria, após o seu pré-aquecimento à mesma temperatura. A reação ocorre por ação da lipase do extrato protéico, que gera hidrolisa o palmitato de p-nitrofenila produzindo o p-nitrofenol, um cromógeno

amarelo, medido por espectrofotometria ( $\lambda = 410 \text{ nm}$ ). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que promoveu a liberação de  $1 \mu\text{mol}$  de p-nitrofenol. $\text{min}^{-1}$ , nas condições do teste (concentração do substrato, pH, temperatura e tempo de reação), e calculada de acordo com a seguinte equação (ROWE e HOWARD, 2002)  $U = (\text{Abs.vol})/(\mathcal{E}.T.p)$ , onde U = unidade de atividade lipolítica, Abs = absorvância ( $\lambda = 410 \text{ nm}$ ), vol = volume do ensaio (mL),  $\mathcal{E}$  = coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol ( $18,5 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), T = tempo em minutos e, p = miligramas de proteína dosadas para determinação da curva padrão para o cálculo de proteínas totais (Anexo A).

#### **4.2.2 Atividade lipolítica específica e biossurfactante de *Penicillium* sp. e *Rhizomucor* sp.**

Os isolados F2 (*Penicillium* sp.) e F18 (*Rhizomucor* sp.), selecionados nas etapas anteriores, foram avaliados em fermentação em estado líquido (FEL) e sólido (FES), quanto à atividade lipolítica (AL) e atividade surfactante (AS), durante 120 h.

Para os cultivos em meio líquido (FEL) foram utilizados erlenmeyers de 2000 mL, contendo 400 mL do meio MMOS. Após inoculados 4,0 mL de uma suspensão com  $10^7$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$  dos fungos, foram incubados em agitador orbital a 150 rpm e  $30^\circ\text{C}$ , por 120 h. Em intervalos de 24 h, até o total de 120 h de incubação, foram coletadas três alíquotas de 20 mL de cada frasco, transferidas para tubos de ensaio de 20 mL e medido o pH. Os tubos foram centrifugados a  $3000 \times g$  e  $20^\circ\text{C}$ , por 15 min, separando-se assim a biomassa do sobrenadante, para a dosagem da atividade lipolítica, surfactante e quantificação da biomassa. A atividade lipolítica dos dois isolados foi medida, em intervalos de 24 h, até o total de 120 h de incubação, a partir do sobrenadante das amostras, cujas alíquotas foram coletadas em triplicata por tratamento. Foram utilizadas as metodologias para dosagem de proteínas e atividade lipolítica específica descritas na etapa anterior.

Para a atividade biossurfactante foi medida a densidade ótica da emulsificação óleo/água, em intervalos e tempo idênticos ao da atividade lipolítica. Para isto, foram adicionados 3,5 mL do sobrenadante obtido de cada alíquota centrifugada anteriormente, a tubos de ensaio com tampa e 2,0 mL de óleo de soja, e a mistura foi agitada por um minuto em "vortex" e transferida para cubeta de 3,5 mL, então

mantida em repouso por 60 minutos, após os quais mediu-se a absorbância ( $\lambda = 610$  nm).

Para os cultivos em meio sólido (FES) foram utilizados reatores (erlenmeyers) de 250 mL, contendo 40 mL do substrato suporte: uma mistura de areia e vermiculita (v/v), duas vezes autoclavados a 120°C por 1 h, após lavagem prévia com uma solução de HCl 0,1M e, repetidas vezes, com água corrente. Foi então adicionado o meio mínimo mineral até 50% da capacidade de campo (parâmetro que mede a capacidade de retenção de água) do substrato, e 10% de óleo de soja. Em seguida cada cultivo foi inoculado com 1 mL de suspensão de  $10^7$  esporos. mL<sup>-1</sup>. Os reatores foram incubados em condições estáticas, a 30°C e escuro, por 120 h. Em intervalos de 24 h, foram coletadas quatro alíquotas de 1 g do substrato, por cada um de três reatores, para as quantificações da umidade, pH, óleos e graxas e biomassa fúngica.

Para quantificar a atividade lipolítica e biossurfactante foram tomados dois frascos do cultivo em FES, e procedeu-se às extrações da enzima e do biossurfactante. No primeiro caso, procedeu-se conforme Alberton (2009) com modificações, acrescentando-se 120 mL de solução extratora de NaCl 2% (m/v), à temperatura de 30°C ao frasco. No segundo caso, procedeu-se conforme Castiglione et al. (2009), acrescentando-se ao frasco 120 mL de água destilada aquecida a 90°C. Seguiu-se a agitação dos frascos a 160 rpm, à 30°C e 50°C, durante 30 min, para as extrações de lipase e biossurfactante, respectivamente. Após isto, os conteúdos foram filtrados à vácuo em funil de Büchner, em papel de filtro Whatman nº1, obtendo-se os extratos para as análises, com alíquotas coletadas em triplicata.

No caso da FES, além da definição da atividade enzimática como unidade por miligrama de proteína (U.mg<sup>-1</sup>), também procedeu-se tal definição como unidade por gramas de substrato seco (U.g<sup>-1</sup> SS), que é o número de unidades totais do extrato bruto relacionado ao conteúdo de sólido seco (substrato de cultivo na FES) inicialmente pesado. Porém para comparação dos isolados F2 e F18, quanto a atividade lipolítica, neste trabalho, os resultados considerados foram aqueles com a definição de unidade de atividade lipolítica por miligrama de proteína.

A atividade surfactante foi medida através da emulsificação óleo/água, em intervalos de 24 h. Para isto, foram adicionados 3,5 mL de cada alíquota a tubos de ensaio com tampa e 2,0 mL de óleo de soja, e a mistura foi agitada por um minuto em "vortex" e transferida para cubeta de 3,5 mL, então mantida em repouso por 60 min, após os

quais mediu-se a absorvância ( $\lambda = 610$  nm). O resultado foi expresso em unidades emulsificantes (EU), definida como a massa de biossurfactante necessária para aumentar a absorvância (Abs) em 1,0 unidade à 610 nm, quando comparada com o branco (CASTIGLIONE et al., 2009), pela equação:  $AE = Abs.D/[m(1-U)]$ , onde: Abs = absorvância da suspensão do óleo em água; D = diluição da amostra em água; m = massa da amostra úmida (g); U = umidade do meio fermentado.

#### 4.2.3 Análise de óleos e graxas

A quantificação do teor de óleos e graxas ocorreu apenas nos cultivos em estado sólido (FES) e foi de acordo com metodologia descrita no "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (EATON, CLESCERI e GREENBERG, 1995) utilizando a técnica de extração com Soxhlet, e os resultados foram expressos em  $g.Kg^{-1}$  de peso seco do substrato, obtidos a cada 24 h, até o total de 120 h.

As amostras analisadas foram de um (1) g, e após a coleta procedeu-se a sua acidificação com HCl 1:1, até atingir o pH 2,0, e o armazenamento sob refrigeração até o momento das extrações. Para as análises as amostras foram filtradas em disco de papel de filtro (MN 640W), utilizando-se uma solução auxiliar de filtração constituída por Celite 1% e Caolim 0,5% (m/v). Após a filtração o papel de filtro contendo a amostra foi inserido em um cartucho de extração, que foi seco à 105°C por 30 min. A extração foi realizada no Determinador de Óleos e Graxas (MA 491, MARCONI), utilizando-se copos de vidro de 250 mL limpos, previamente tarados após secagem (105°C) e resfriamento em dessecador ( $M_1$ ). Em cada copo foram colocados 150 mL de hexano, sendo então os copos conectados ao extrator do equipamento já contendo o cartucho com a amostra, que foi 95% submergido no solvente. Durante análise a remoção do extrato para o solvente ocorreu em ciclos, através de um sistema de sifonamento, com uma extração contínua sendo realizada em aproximadamente 2 h a 100°C, conforme Lima Jr. (2009). Após esse período, o hexano foi recuperado no próprio equipamento a 130°C e o volume residual do solvente foi evaporado. Os copos foram resfriados em dessecador e pesados ( $M_2$ ). O teor de O&G foi determinado pela equação  $O\&G = [(M_2 - M_1) \times 10^6] / Va$ , onde: O&G = teor de óleos e graxas ( $mg.kg^{-1}$ ),  $M_1$  = massa do copo (g),  $M_2$  = massa do copo com resíduo oleoso e,  $Va$  = massa da amostra filtrada (g).

#### 4.2.4 Avaliação da produção de biomassa

Nos cultivos em estado líquido (FEL) a biomassa foi determinada gravimetricamente, a partir da diferença de peso entre os papéis de filtro contendo a biomassa microbiana retida na filtração, após lavados com acetona e água destilada, e secos a 100°C (até peso constante) e, os mesmos papéis, sem biomassa, previamente secos e pesados, nas mesmas condições.

Nos cultivos em estado sólido (FES) a biomassa foi quantificada a partir do teor de ergosterol presente nas amostras, via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para a extração do ergosterol das amostras, foi utilizado 1 g do substrato/suporte, obtido conforme descrito anteriormente. Adicionou-se 5 mL de metanol ao tubo contendo a amostra e procedeu-se sua agitação em vortex, durante 1 min. Após repouso por 10 min, os sobrenadantes foram transferidos para eppendorfs de 1,5 mL e estes, centrifugados por 10 min a 10.000 x g e temperatura de 22°C. Os sobrenadantes foram então filtrados em papel de filtro Millex com porosidade de 0,22  $\mu$ , e armazenados em frascos tipo "vials", e estes mantidos a 25°C negativos até a utilização, no máximo em 30 dias. Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu, com sistema binário de solventes, modelo LC – 20 AD/T (SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, Japão), equipado com coluna Kinetex 2,6  $\mu$ m, C18, 100 x 2,1 mm (ALLCROM, www.allcrom.com.br). A fase móvel foi isocrática com metanol/água (95:5, v/v) e a vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. O solvente (metanol) foi de grau HPLC, tanto para as extrações como para as análises cromatográficas, e a água com qualidade Milli-Q, sendo que os dois últimos foram filtrados e degaseificados por 15 min. O tempo de corrida durou aproximadamente 7 min e, a identificação e a integração do pico de ergosterol foi feita por comparação de tempos de retenção do padrão e da amostra, utilizando o software LCsolution (SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, Japão). A pureza foi verificada através dos espectros de absorvância obtidos no início, ápice e término do pico, cuja leitura ocorreu a 282 nm. Para a construção da curva padrão (padronização externa), que foi linear (Anexo B), passou pela origem e cobriu a faixa de concentração das amostras, utilizou-se ergosterol (Fluka Analytical, China, pureza mínima de 95%) e 7 pontos de leitura, cujas concentrações variaram de 5,0 a 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

Para adequar a transformação dos valores de ergosterol para biomassa fúngica, os isolados F2 e F18 foram cultivados em MMOS, durante 30 dias, à temperatura de 30°C e 150 rpm, em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultura. Aos 10, 20 e 30 dias foram coletadas por filtração, as biomassas produzidas, lavadas em acetona e com sucessivas lavagens em água, qualidade milli-Q. Transferidas para papéis de filtro previamente secos à 60°C, e pesados, procedeu-se a sua secagem à esta temperatura até peso constante e então a pesagem. A biomassa seca foi obtida pela diferença entre as pesagens dos papéis, sem e com a presença das biomassas fúngicas. Amostras de 1 g de biomassa seca foram congeladas com a utilização de nitrogênio líquido, e imediatamente após, foram trituradas separadamente em almofariz, que em seguida foram acrescidos de 5 mL de metanol, e o material coletado e transferido para tubos de cultura. Procedeu-se em seguida conforme anteriormente descrito para a extração do ergosterol das amostras para as análises cromatográficas. Em função das razões ergosterol: biomassa, obtidas para os dois isolados avaliados, nas três datas de coleta, foram calculados todos os valores de produção de biomassa fúngica nos dois sistemas reacionais.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE RESÍDUOS OLEOSOS DERIVADOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL, COMO INDICADORA DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Para avaliar a biodegradabilidade aeróbia de resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental, foram conduzidos experimentos, que foram repetidos, nos quais os resíduos oleosos (óleo de soja comercial, óleo residual de fritura e espuma de caixas de gordura da estação de tratamento de esgotos da UFES e do Restaurante Universitário da UFES) foram utilizados sem esterilização e, em complemento, com esterilização (óleo de soja e espuma de caixa de gordura do Restaurante Universitário da UFES).

##### 4.3.1 Biodegradabilidade aeróbia no SRAN

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, a água, os meios de cultura e/ou substratos, vidrarias e utensílios laboratoriais foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 20 min, ou estufa de esterilização a 180°C por 2 h,

após devidamente acondicionados. As pesagens de reagentes e meios de cultura foram efetuados em balança de precisão (marca SCIENTECH). Os isolados microbianos foram mantidos armazenados à temperatura de 5°C, em tubos de cultura com o meio BDA (batata-dextrose-ágar) conforme Menezes e Assis (2004). A recuperação ocorreu, sempre que necessária, repicando uma porção da colônia para o centro de placa de Petri com o meio de cultura BDA, seguindo-se incubação a 28°C, por 5 dias, em estufa incubadora (DBO – Biotec BT424).

#### 4.3.1.1 Produção de CO<sub>2</sub>

Os OGR avaliados foram: óleo residual de fritura residencial (OF), escuma de caixa de gordura do Restaurante Universitário – UFES (ECG-RU) e escuma de caixa de gordura da Estação Experimental de Tratamento de Esgotos da UFES (ECG-ETE), tendo como padrão óleo de soja comercial (OS), marca LIZA, que também serviu à calibração do teor de óleos e graxas (O&G) dos resíduos oleosos para 60 g.kg<sup>-1</sup> (Figura 12).

Como inoculantes foram utilizados suspensões de esporos de quatro isolados fúngicos filamentosos: F2 (*Penicillium* sp.), F41 (*Beauveria* sp.), F96 (*Geotrichum* sp.) e, F18 (*Rhizomucor* sp.), previamente isolados de amostras ambientais e selecionados conforme os itens 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 e 4.2.1 de “Material e Métodos”. Para a obtenção do inóculo, as cepas foram propagadas a 28°C por 5 dias, em placas de Petri com o meio de cultura BDA. Os esporos foram removidos pela adição 5 mL de água destilada esterilizada sobre a colônia, seguida por uma raspagem com alça de Drigalski, e a calibração da suspensão de esporos (inóculo) foi com a utilização de câmara de Neubauer, para aproximadamente 10<sup>7</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>. Como padrão para atividade enzimática foi utilizada uma lipase comercial (Lipase recombinante, de *Rhizomucor mihei* sobre *Aspergillus oryzae*, 20 U.mL<sup>-1</sup>, SIGMA) na concentração de 1µL.mL<sup>-1</sup> e volume de 1 mL por reator. O volume utilizado também foi de 1 mL por reator, tal qual o volume dos inóculos fúngicos. O tratamento controle não conteve os inoculantes e os produtos utilizados como padrões para os resíduos e atividade enzimática.

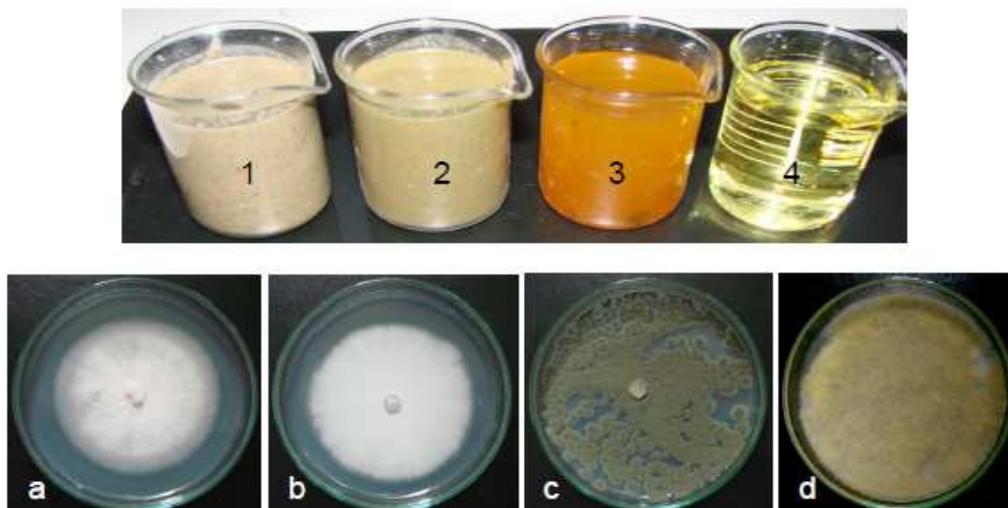


Figura 12- A) Resíduos oleosos do saneamento: 1) ECG-UFES, 2) ECG-ETE e, 3) Óleo residual de fritura (OF) e 4) Óleo de soja (padrão). B) Isolados fúngicos utilizados como inóculo, na avaliação da biodegradabilidade aeróbia de resíduos oleosos do saneamento: a) F41 – *Beauveria* sp., b) F96 – *Geotrichum* sp., c) F2 – *Penicillium* sp. e, d) F18 – *Rhizomucor* sp.

Como suporte foi utilizado uma mistura com 50% de areia e 50% de vermiculita (v/v), que é um mineral da família da mica, composto basicamente por silicatos de alumínio, magnésio e ferro. A areia grossa (0,6 a 2 mm de diâmetro) foi previamente lavada com uma solução de HCl 0,1M e posteriormente repetidas vezes com água corrente. Após a lavagem foi seca em estufa a 100°C, por 24 h, e autoclavada a 120 °C, por 30 min. Procedeu-se da mesma forma em relação à vermiculita, excetuando a lavagem com ácido.

Previamente à montagem do sistema respirométrico foram analisados nos OGR e no óleo de soja os seguintes parâmetros físico-químicos: pH, umidade, DQO total, DBO<sub>5</sub>, sólidos totais e voláteis e óleos e a graxas (O&G) segundo as metodologias descritas no “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (EATON, CLESCERI e GREENBERG, 1995).

Para avaliar a biodegradação aeróbia foi montado um sistema respirométrico estático (ALEXANDER,1994), com base em ABNT (1999), Matos, Fernandes e Bernardes (2002), Pedroti (2007), Teles (2007), Lima Junior (2009), com modificações, tendo como frascos reatores potes plásticos herméticos (900 mL), utilizados em triplicata para cada tratamento experimental. Cada reator comportou 100 g do substrato suporte (areia-vermiculita), aos quais foi adicionado o meio mineral mínimo (MM), até 50% de sua capacidade de campo. O meio mínimo (MM) foi preparado de acordo

com Pelczar, Chan e Krieg (1996) e Chernicharo (1997), cuja descrição foi efetuada anteriormente (item 3.1.1), sem a adição de ágar. A cada reator, ao substrato suporte, foram acrescentados 10 g do OGR, efetuada a mistura com bastão de vidro, de forma a obter-se a melhor homogeneização possível e, inoculado (1) mL da suspensão de esporos fúngicos e de lipase, conforme o tratamento experimental, seguindo-se nova mistura, da mesma forma. Após, foi introduzido ao reator um frasco de polietileno (50 mL), e a este, 20 ml de solução de NaOH  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ , destinado à absorção do  $\text{CO}_2$  produzido pela atividade de biodegradação, solução substituída diariamente por outra livre de íons carbonato, por ocasião das leituras para quantificação do  $\text{CO}_2$ .

De cada reator foram retiradas três amostras de um (1) g do substrato, sendo duas para a quantificação de microrganismos (fungos e bactérias totais) e a outra para quantificação do teor de óleos e graxas, aos 10, 20 e 30 dias decorridos da instalação do experimento.

A quantificação do  $\text{CO}_2$  foi realizada a cada 24 h, durante 30 dias, por meio de leitura de condutividade elétrica conforme Rodella e Saboya (1999), Pedroti (2007), Teles (2007) e Lima Junior (2009), utilizando um condutímetro (Jenco, modelo 1671, China). No ensaio de biodegradabilidade observa-se o decaimento da condutividade elétrica na solução de NaOH, na medida da reação do  $\text{CO}_2$ , liberado pelo processo de biodegradação, em contato com a mesma, formando inicialmente o  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (ácido carbônico) que em seguida dá origem a duas series de sais, o bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ) e o carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), conforme Rodella e Saboya (1999), a partir das reações:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$  e,  $\text{H}_2\text{CO}_3 + 2\text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$ .

A calibração para a determinação do  $\text{CO}_2$  foi realizada através da utilização de soluções de NaOH e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , de concentrações conhecidas, considerando-se que a solução de NaOH parcialmente neutralizada pelo  $\text{CO}_2$  pode ser comparada a mistura de soluções padrão de NaOH e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . O  $\text{CO}_2$  produzido em função dos tratamentos correspondeu ao resultado da subtração daquele produzido pelo controle, em miligramas, e foi calculado pela expressão:  $\text{CO}_2 = V \times M \times 22 \cdot [(C_1 - C_x)/(C_1 - C_2)]$ , onde: V e M são respectivamente, o volume da solução de NaOH em mL empregada na absorção do  $\text{CO}_2$  e sua concentração em  $\text{mol.L}^{-1}$ ;  $C_1$  é a medida da

condutividade elétrica da solução padrão de NaOH em  $\text{mS cm}^{-1}$ ;  $C_x$  é a medida da condutividade elétrica da amostra e  $C_2$  é a medida da condutividade

#### **4.3.1.2 Teor de óleos e graxas**

Na avaliação de óleos e graxas dos substratos reacionais, não foi determinada a quantidade absoluta de uma substância específica, mas a do total das substâncias oleosas solúveis no solvente empregado, ou seja, de ácidos graxos, gorduras animais, sabões, graxas, ceras, óleos vegetais e, qualquer outro tipo de substância que o solvente pôde extrair da amostra, que não se volatilizou durante o processo de extração. Os resultados foram expressos em  $\text{g.kg}^{-1}$  do substrado analisado.

Procedeu-se, nesta etapa, conforme metodologia descrita no “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (EATON, CLESCERI e GREENBERG, 1995), através de extração em Soxhlet chamada extração exaustiva, pois o solvente passa muitas vezes pela amostra, e é aplicada a analitos que são estáveis à temperatura de evaporação do solvente. As amostras analisadas foram de um (1) g, coletadas aos 0 (data da instalação do experimento), 10, 20 e 30 dias decorridos da instalação do experimento, sendo nestas ocasiões efetuada a leitura do pH e, em seguida procedida a sua acidificação com HCl 1:1, até atingir o pH 2,0, e o armazenamento sob refrigeração até o momento das extrações. Para as extrações procedeu-se conforme o item 4.2.3 em “Material e Métodos”, deste trabalho.

#### **4.3.1.3 Produção de biomassa fúngica**

Para a quantificação da biomassa fúngica foi utilizado o método tradicional de diluição em placas e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), conforme Tortora (2005), com modificações.

A partir da amostra de 1 g do substrato/suporte colonizado pelo fungo, coletada conforme o item 4.3.1.1, foram efetuadas diluições em série, em água destilada esterilizada, até a concentração de  $10^{-4} \text{ g. L}^{-1}$ , sendo então tomada uma alíquota de 0,1 mL e inoculada no centro de uma placa de Petri com o meio de cultura BDA, promovendo o seu espalhamento com alça de Drigalski. Foram utilizadas três placas por amostra, que foram incubadas por 96 horas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , quando se efetuou

a contagem das colônias formadas. O resultado foi expresso como número de UFC.g<sup>-1</sup> de substrato/suporte seco. Para obtenção do peso seco da amostra de substrato, um (1) g da mesma, coletada conforme o item 4.3.1.1, foi submetida a secagem em estufa à temperatura de 60°C, até o peso constante.

#### **4.3.2 Biodegradabilidade aeróbia no SRAE**

Nesta etapa, desenvolvida como complemento à avaliação da biodegradabilidade aeróbia de OGR no SRAN, foram avaliados como substratos oleosos somente o ECG-UFES e o OS, e como agentes da atividade lipolítica, os isolados fúngicos F2 e F18, tendo como padrão a mesma enzima utilizada na etapa anterior, porém na concentração de 10 µL.mL<sup>-1</sup>.

Os experimentos foram estruturados como anteriormente, porém os reatores passaram a ser constituídos por frascos de acrílico, redondos, com a mesma capacidade volumétrica, mas com vedação por pressão e borracha, garantindo maior hermeticidade. A produção de CO<sub>2</sub> e a remoção de óleos e graxas foram igualmente avaliados. A biomassa fúngica, além de quantificada através de contagem de colônias, também o foi através da determinação do teor de ergosterol utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

No preparo do material para as análises cromatográficas, para a extração do ergosterol das amostras foi utilizado 1 g do substrato/suporte, obtido conforme descrito no item 4.3.1.1. Adicionou-se 5 mL de metanol ao tubo contendo a amostra e procedeu-se sua agitação em vortex, durante 1 min. Após repouso por 10 min, os sobrenadantes foram transferidos para eppendorfs de 1,5 mL e estes, centrifugados por 10 min a 10.000 rpm e temperatura de 22°C. Os sobrenadantes foram então filtrados em papel de filtro Millex com porosidade de 0,22 µ, e armazenados em frascos tipo “vials”, e estes mantidos a 25°C negativos até a utilização, no máximo em 30 dias.

Para as análises foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu, com sistema binário de solventes, modelo LC – 20 AD/T (SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, Japão), equipado com coluna Kinetex 2,6 µm, C18, 100 x 2,1 mm (ALLCROM, www.allcrom.com.br), acoplada com HPLC KrudKatcher Ultra Column In-Line Filter, 0,5µm Porosity x 0,004 in. A fase móvel foi isocrática com metanol/água (95:5, v/v) e a

vazão de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O solvente (metanol) foi de grau HPLC, tanto para as extrações como para as análises cromatográficas, e a água com qualidade Milli-Q, sendo que os dois últimos foram filtrados e degaseificados por 15 min. O tempo de corrida durou aproximadamente 7 min e, a identificação e a integração do pico de ergosterol foi feita por comparação de tempos de retenção do padrão e da amostra, utilizando o software LCsolution (SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, Japão), e a pureza verificada através dos espectros de absorvância obtidos no início, ápice e término do pico, cuja leitura ocorreu a 282 nm. Para a construção da curva padrão (padronização externa), que foi linear, passou pela origem e cobriu a faixa de concentração das amostras, utilizou-se ergosterol (Fluka Analytical, China, pureza mínima de 95%) e 7 pontos de leitura, cujas concentrações variaram de 5,0 a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Para adequar a transformação dos valores de ergosterol para biomassa fúngica, os isolados F2 e F18 foram cultivados em MMOS, durante 30 dias, à temperatura de 30°C e 150 rpm, em frascos erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml do meio de cultura. Aos 10, 20 e 30 dias foram coletadas por filtragem, as biomassas produzidas, lavadas em acetona e com sucessivas lavagens em água, qualidade milli-Q. Transferidas para papéis de filtro previamente secos à 60°C, e pesados, procedeu-se a sua secagem à esta temperatura até peso constante e então a pesagem. A biomassa seca foi obtida pela diferença entre as pesagens dos papéis, sem e com a presença das biomassas fúngicas. Amostras de 1 g de biomassa seca foram congeladas com a utilização de nitrogênio líquido, e imediatamente após, foram trituradas separadamente em almofariz, que em seguida foram acrescidos de 5 mL de metanol, e o material coletado e transferido para tubos de cultura. Procedeu-se em seguida conforme anteriormente descrito para o preparo do material para as análises cromatográficas. Em função das razões ergosterol : biomassa seca, obtidas para os dois isolados avaliados, nas três datas de coleta, foram calculados todos os valores de biomassa dos tratamentos experimentais avaliados no SRAE.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES A PARTIR DE DIFERENTES AMOSTRAS AMBIENTAIS, EM MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS

#### 5.1.1 Isolamento de fungos produtores de lipases a partir de diferentes amostras ambientais

Foram isolados fungos produtores de lipases a partir de tecidos vegetais (banana, limão, mamão, manga e de folhas de oiti) necrosados por atividade fitopatogênica e, de insetos-pragas de plantas (formiga saúva, lagarta-da-goiabeira, lagarta do cartucho-do-milho, moleque-da-bananeira, gorgulho-do-milho, broca-do-cafeeiro, cigarrinha da cana-de-açúcar e de pastagens) necrosados por atividade entomopatogênica. Também foram isolados a partir de um solo coletado em uma área de pomar de mangueiras, localizada na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Vitória, ES. Além destes também foram obtidos isolados fúngicos (a maioria) produtores de lipases a partir de resíduos oleosos do saneamento, como lodo e espuma de esgoto sanitário, coletados na ETE-UFES (UASB-BF), e também espuma de uma caixa de gordura do Restaurante Universitário desta Universidade, bem como a espuma de uma caixa de gordura residencial, pertencente a um condomínio de apartamentos localizado em Vila Velha-ES.

Das amostras ambientais foi obtido um total de 113 isolados fúngicos: 100 de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Verticillium* sp. e, treze de fungos leveduriformes, não identificados ao nível genérico e ou específico.

Os isolados obtidos foram submetidos, na totalidade, à pré-seleção quanto à atividade lipolítica nos dois meios de cultura sólidos (MB e MMOS<sub>R</sub>). Apresentaram reação positiva 75 deles (67 de fungos filamentosos e 8 de leveduras), 50 com atividade lipolítica evidenciada no meio MB, 60 com atividade lipolítica evidenciada no meio MMOS<sub>R</sub> e, 35 com ambas (Figura 13 e Tabela 7). Cinco isolados de fungos leveduriformes (leveduras) e 33 de fungos filamentosos, estes últimos identificados

como pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Rhizopus* e *Trichoderma*, foram descartados em função da ausência de atividade lipolítica detectável nos dois meios de cultura utilizados. A atividade lipolítica foi observada em função da produção de um halo opaco produzido em torno da colônia fúngica, no meio MB, e pela fluorescência alaranjada da colônia, observada sob radiação ultravioleta.

Características dos gêneros de fungos filamentosos aos quais pertencem os 75 isolados selecionados, dos quais foram excluídos cinco isolados de leveduras e 33 de fungos filamentosos pertencentes aos, pela, são apresentadas na Tabela 7, de acordo com as observações microscópicas efetuadas e as descrições de Ellis (1976); Hawksworth, Sutton e Ainsworth (1983) e; Barnet e Hunter (1986).

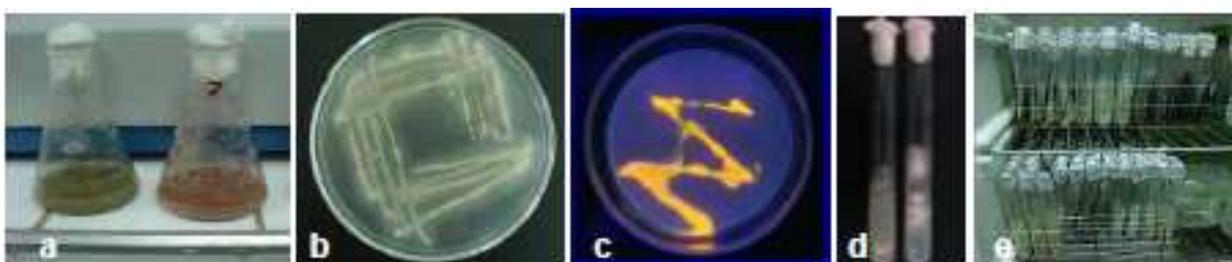


Figura 13 - a) Fungos enriquecidos nos resíduos oleosos do saneamento; b e c) crescimento e reações apresentadas pelo isolado F107 (levedura) nos meios de cultura MB e MMOS<sub>R</sub>, respectivamente; d) fungos repicados para tubos de cultura; e) armazenamento dos tubos de cultura com fungos, a 5°C

Frascos erlenmyers contendo a biomassa fúngica produzida nos resíduos oleosos do saneamento, ao final do processo de enriquecimento, podem ser vistos na Figura 13a. Nas Figuras 13b e 13c, são mostradas as colônias produzidas nos meios de cultura sólidos MB e MMOS<sub>R</sub>, respectivamente. A Figura 13e mostra os isolados fúngicos já transferidos para o meio de cultura BDA, inclinado em tubos de cultura, para o armazenamento à temperatura de 5°C. Tal forma de armazenamento é usual em laboratórios de microbiologia e permite a manutenção de culturas fúngicas e bacterianas durante alguns meses, devido a redução do seu metabolismo. Com a exaustão e dessecação do meio de cultura é necessária nova repicagem para novos tubos com o meio BDA para a continuidade do armazenamento das culturas microbianas (MENEZES e ASSIS, 2004; TORTORA, 2005).

Tem sido relativamente comum o isolamento de microrganismos lipolíticos a partir de várias fontes, como o solo, água, resíduos oleosos industriais e do saneamento, e de alimentos, ou outras amostras ambientais (ANDRETTA, DAMASCHI JUNIOR e

ONOFRE, 2007; COLEN, 2006; SEMIONATO, 2006; DARTORA et al., 2005; FEITOSA et al, 2003; KO, WANG e ANN, 2005; SHUKLA e GUPTA, 2007; PIMENTEL, 1996). No entanto, o isolamento a partir de amostras de insetos-pragas de plantas, afetados por microrganismos entomopatógenos e, de tecidos vegetais necrosados pelo ataque de microrganismos fitopatogênicos, pouco tem sido citado, apesar de vários pesquisadores utilizarem nos seus testes tais microrganismos a partir de Coleções de Microrganismos mantidos por inúmeras Instituições em todo o mundo, como Hou e Johnston (1992) e Colen (2006). Algumas menções na literatura sobre entomopatógenos lipolíticos citam *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, as duas espécies mais importantes de fungos utilizadas no controle biológico de insetos-pragas de plantas (SILVA et al., 2005), enquanto que de fitopatógenos incluem *Fusarium oxysporum* fsp. *vasinfectum*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides* (COLEN, 2006).

Em relação aos fungos filamentosos lipolíticos, os gêneros detectados neste trabalho, são compatíveis com os citados na literatura como maiores produtores de lipases, inclusive já produzidas e comercializadas, com inúmeras aplicações industriais. Exceção, no entanto, fazemos em relação à *Cladosporium*, *Botrytis* e *Verticillium*, com rara ou nenhuma citação anterior na literatura, como no caso deste último. Algumas das espécies melhores produtoras de lípases pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*, de acordo com Pimentel (1996) e Colen (2006).

Colen (2006) avaliou a capacidade de produção de lipase por 73 cepas fúngicas, 14 obtidas de coleções de cultura e 59 isoladas de amostras do solo do cerrado de Minas Gerais, com o emprego de técnicas de enriquecimento seletivo. O isolamento e seleção primária foram realizados em meio de cultura contendo ágar, emulsão de óleo de oliva, sais biliares e nutrientes. As colônias lipolíticas foram detectadas pela presença, no meio opaco, de uma zona clara ao seu redor. Vinte e uma cepas foram avaliadas como produtoras em potencial e a capacidade de produção determinada em condições de cultivo submerso e cultivo em estado sólido (seleção secundária). Apenas 7 delas foram selecionadas como boas produtoras. A cepa melhor produtora, foi identificada como *Colletotrichum gloeosporioides*. No presente trabalho, os isolados de *Colletotrichum* obtidos mostraram boa atividade lipolítica extracelular no meio MB, porém ao terem a atividade lipolítica específica avaliada em cultivo líquido

no meio MMOS, apresentaram níveis de atividade lipolítica inferiores a alguns isolados fúngicos de outras espécies.

Ko, Wang e Ann (2005) utilizaram um meio seletivo para o isolamento de bactérias, actinomicetos e fungos de um solo agrícola. O meio foi adicionado de 0,1% de óleo de girassol emulsificado com 0,01% de Tween 80. O maior número de isolados lipolíticos obtidos foi de actinomicetos, seguido pelos números de bactérias e fungos.

Tabela 7- Classificação e características dos isolados fúngicos quanto à procedência, ao crescimento de colônias e a atividade lipolítica apresentada nos meios de cultura reacionais: meio básico (MB) e meio mínimo + óleo de soja + rodamina-B (MMOS<sub>R</sub>)

Classificação genérica/ (Nº de isolados)	Isolado	Procedência	Colônia (mm) *		Reação em MB	Reação em MMOS <sub>R</sub>
			MB	MMOS <sub>R</sub>		
<b><i>Aspergillus</i> (4)</b>	F31	Caixa de gordura RU	22,0	**	+	-
	F68	Caixa de gordura RU	31,0	32,3	-	+
	F79	Caixa de gordura RU	31,3	**	+	-
	F81	Caixa de gordura RU	35,3	44,0	+	+
<b><i>Beauveria</i> (26)</b>	F9	Formiga saúva	14,8	4,5	+	+
	F35	Lag. cartucho do milho	30,2	6,5	+	+
	F36	Broca do cafeeiro	18,3	7,8	+	+
	F37	Broca do cafeeiro	18,3	7,8	+	+
	F38	Broca do cafeeiro	13,7	5,0	+	+
	F39	Broca do cafeeiro	16,7	6,7	+	+
	F40	Broca do cafeeiro	18,7	9,3	+	+
	F41	Broca do cafeeiro	13,8	5,8	+	+
	F42	Broca do cafeeiro	14,8	7,3	+	+
	F43	Broca do cafeeiro	15,5	5,8	+	+
	F46	Broca do cafeeiro	14,7	5,8	+	+
	F47	Broca do cafeeiro	14,3	5,8	+	+
	F48	Broca do cafeeiro	12,2	4,8	+	+
	F49	Broca do cafeeiro	14,7	5,5	+	+
	F50	Broca do cafeeiro	14,5	5,8	+	+
	F52	Broca do cafeeiro	16,3	7,5	+	+
	F53	Broca do cafeeiro	15,8	7,2	+	+
	F54	Broca do cafeeiro	12,5	5,5	-	+
	F55	Broca do cafeeiro	16,2	5,3	-	+
	F56	Broca do cafeeiro	16,7	6,7	-	+

(continuação)

Classificação genérica/ (Nº de isolados)	Isolado	Procedência	Colônia (mm) *		Reação em MB	Reação em MMOS <sub>R</sub>
<b>Botrytis (2)</b>	F59	Moleque da bananeira	16,5	7,0	-	+
	F60	Cigarrinha pastagem	17,8	8,7	-	+
	F61	Cigarrinha cana	18,0	7,8	-	+
	F92	Broca do cafeeiro	14,8	5,5	+	+
	F104	C. gordura residencial	13,3	8,0	+	+
	F105	C. gordura residencial	39,5	14,0	-	+
<b>Cladosporium (4)</b>	F27	Fruto de bananeira	10,7	**	+	-
	F28	Fruto de bananeira	9,7	**	+	-
	F76	Fruto de mamoeiro	11,3	6,7	+	+
	F98	Fruto de mamoeiro	10,7	6,0	+	+
<b>Colletotrichum(6)</b>	F64	Fruto de mangueira	20,7	**	+	-
	F65	Fruto de mangueira	24,5	10,7	+	+
	F66	Fruto de mamoeiro	31,7	**	+	-
	F71	Fruto de mamoeiro	28,7	**	+	-
	F26	Fruto de bananeira	38,7	**	+	-
	F72	Folhas de oití	30,2	13,2	+	+
<b>Fusarium (6)</b>	F10	Caule de bananeira	44,7	18,8	-	+
	F67	Fruto de mamoeiro	40,3	36,8	-	+
	F74	Fruto de mamoeiro	35,0	42,2	-	+
	F75	Fruto de mamoeiro	50,0	**	+	-
	F84	Solo pomar mangueira	16,7	7,3	-	+
	F103	C. gordura residencial	45,0	27,0	-	+
<b>Geotrichum (3)</b>	F96	Caixa de gordura RU	31,8	19,5	+	+
	F97	Caixa de gordura RU	27,3	16,3	-	+
	F99	Caixa de gordura RU	25,2	13,8	-	+
<b>Penicillium (10)</b>	F2	Caixa de gordura RU	9,7	**	+	-
	F6	Caixa de gordura RU	9,0	**	+	-
	F15	Caixa de gordura RU	26,2	**	+	-
	F22	Caixa de gordura RU	21,7	**	+	-
	F29	Caixa de gordura RU	14,7	7,3	-	+
	F62	Caixa de gordura RU	18,7	9,3	-	+
	F69	Caixa de gordura RU	13,3	7,0	-	+
	F83	Solo pomar mangueira	22,7	10,5	-	+
	F102	C. gordura residencial	7,3	6,0	+	+
	F110	C. gordura residencial	32,5	**	+	-
<b>Rhizomucor (5)</b>	F12	Escuma de esgoto	> 90,0	38,7	-	+

Classificação genérica/ (Nº de isolados)	Isolado	Procedência	(Conclusão)			
			Colônia (mm) *	Reação em MB	Reação em MMOS <sub>R</sub>	
<b>Verticillium (1)</b> <b>Levedura (8)</b>	F18	Caixa de gordura RU	> 90,0	59,5	-	+
	F19	Caixa de gordura RU	> 90,0	34,3	-	+
	F106	C. gordura residencial	> 90,0	56,0	-	+
	F113	Caixa de gordura RU	> 90,0	35,7	-	+
	F7	Escuma de esgoto	8,3	3,0	+	+
	F23	Lodo de esgoto	6,8	4,2	-	+
	F57	Fruto de bananeira	12,0	10,7	+	+
	F77	Fruto de bananeira	14,7	6,0	+	+
	F80	Fruto de mamoeiro	4,0	3,0	+	+
	F85	Fruto de bananeira	3,0	3,7	+	+
	F107	C. gordura residencial	9,9	7,5	+	+
	F108	C. gordura residencial	6,2	**	+	-
	F111	C. gordura residencial	4,2	5,5	+	+

\* Média de 3 repetições e leitura com 96 horas de incubação a 28 °C e escuro.

\*\* Inexistência de crescimento e ou biomassa rala e pouco perceptível, dificultando a medição da colônia.

Na Tabela 7 verifica-se que os isolados com crescimento insignificante ou muito ralo, dificultando a visualização e a medição a olho nu, tiveram os valores desconsiderados (\*\*) para efeito de seleção quanto à atividade lipolítica no meio de cultura MMOS<sub>R</sub>.

### 5.1.2 Seleção de fungos produtores de lipases através do crescimento, índice enzimático (IE) e reação lipolítica apresentada em meios de cultura sólidos

Os 75 isolados pré-selecionados na etapa anterior, pela avaliação do crescimento e atividade lipolítica nos meios MB e MMOS<sub>R</sub>, foram, nesta etapa, avaliados quanto ao crescimento das colônias nestes mesmos meios de cultura. Foram também avaliados quanto à atividade lipolítica pela determinação do índice enzimático (IE) no meio de cultura MB (Figura 14abc, Tabela 7) e pela reação apresentada pelas colônias desenvolvidas nos cultivos no meio de cultura MMOS<sub>R</sub>, com 96 h de incubação, quando observadas sob radiação ultravioleta (Figura 14d, Tabela 7).

Nesta etapa objetivou-se a seleção de 20 isolados fúngicos com maior atividade lipolítica, para serem avaliados em etapa subsequente da pesquisa. Com este propósito foram então selecionados os 20 isolados, sendo que 16 deles em função

dos índices enzimáticos apresentados (Tabela 8): F2, F7, F28, F35, F41, F64, F72, F76, F80, F96, F98, F102, F104, F107, F108 e F111, porém de forma que não prevaleceu numericamente na seleção, isolados de um mesmo gênero taxonômico, como *Beauveria* (F35, F36, F37, F38, F39, F41, F42, F44, F45, F46, F48, F49 e F53) alguns com valores elevados de IE, porém sem diferenças estatísticas significativas entre si, pelo teste de Tukey ( $p = 0,05$ ), conforme observado na Tabela 8. Os outros quatro (4) isolados foram selecionados em função do melhor crescimento da biomassa e resposta positiva (supostamente atividade lipolítica intracelular) ao teste de rodamina-B no meio MMOS<sub>R</sub>: F18, F74, F81 e F106. Em etapa subsequente estes 20 isolados foram testados quanto à atividade lipolítica específica, cultivados em meio de cultura líquido (FEL), quantificada através de espectrofotometria UV.

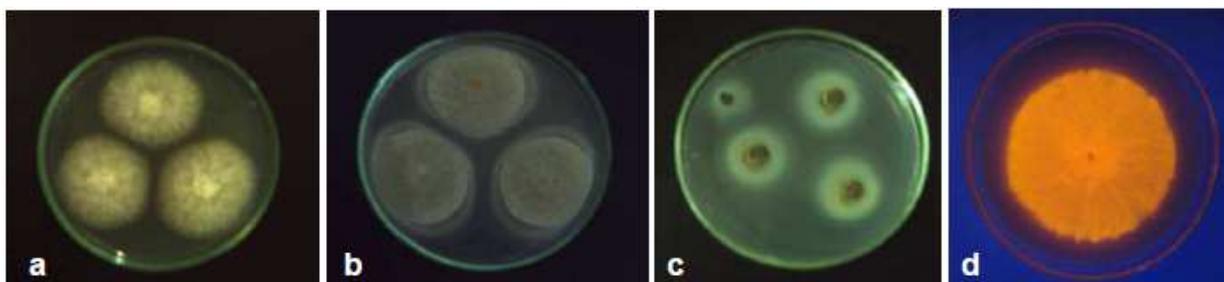


Figura 14 - a) Ausência de atividade lipolítica extracelular apresentada pelo isolado F74 em meio MB; b e c) presença de atividade lipolítica extracelular (halo opaco) apresentada pelos isolados F66 e F28 em meio MB e; d) Presença de atividade lipolítica apresentada pelo isolado F18 no meio MMOS<sub>R</sub>; todos com 96 h de incubação

O halo opaco observado nas Figuras 14b e 14c, em torno das colônias dos isolados F66 e F28, é um indicativo de atividade lipásica extracelular, e decorre da formação, no meio MB, de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pela ação da lipase e pela completa degradação dos sais de lipídio (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975; MENEZES e ASSIS, 2004). A coloração “laranja fluorescente” observada na própria biomassa fúngica do isolado F18, no meio de cultura MMOS<sub>R</sub> (Figura 14d), sugere atividade lipolítica intracelular e decorre da presença de cadeias longas de glicerídios não solúveis, produzidos pela hidrólise enzimática, e está de acordo com o que Haba e outros (2000), Semionato (2006) e Lima Jr. (2009) verificaram para bactérias e, Rodrigues e outros (2009a, 2009b) e Cassini e outros (2009a) verificaram em relação a fungos filamentosos e leveduriformes.

Tabela 8 - Isolados fúngicos com índice enzimático (IE) detectado no meio de cultura MB, com 96 horas de incubação, a 28°C.

Isolado	Índice Enzimático *		Isolado	Índice Enzimático *	
F80	68,33 ± 4,00	a	F27	7,27 ± 0,00	hijlmn
F111	35,99 ± 2,00	b	F104	7,13 ± 2,13	hijlmn
F96	18,87 ± 0,75	c	F09	6,93 ± 0,79	ijlmn
F02	17,63 ± 1,48	c	F06	6,76 ± 1,53	ijlmn
F108	17,58 ± 2,00	c	F102	6,25 ± 0,00	jlmno
F07	11,67 ± 1,91	d	F64	5,98 ± 0,35	lmno
F35	10,75 ± 0,00	de	F40	5,37 ± 0,00	mnop
F41	10,57 ± 2,28	def	F57	5,11 ± 0,00	nop
F49	10,49 ± 1,05	defg	F65	3,95 ± 0,09	op
F50	10,23 ± 0,40	defg	F107	3,95 ± 0,00	opq
F42	10,17 ± 1,69	defg	F85	3,89 ± 0,56	opq
F28	9,67 ± 1,20	defgh	F47	3,33 ± 0,00	pqr
F44	9,65 ± 1,87	defgh	F77	2,96 ± 0,00	pqrs
F48	9,43 ± 0,50	defgh	F72	2,93 ± 0,05	pqrs
F46	9,32 ± 0,67	defghi	F22	2,92 ± 0,23	pqrs
F36	9,27 ± 0,33	defghi	F71	2,80 ± 0,40	pqrs
F52	9,26 ± 1,28	defghi	F66	1,37 ± 0,23	qrs
F38	9,01 ± 0,86	defghi	F79	1,17 ± 0,00	rs
F39	9,01 ± 0,30	defghi	F81	1,08 ± 0,19	rs
F53	9,00 ± 1,22	defghi	F31	0,91 ± 0,04	rs
F45	8,67 ± 1,37	defghij	F26	0,87 ± 0,00	rs
F37	8,31 ± 1,03	defghijl	F110	0,86 ± 0,00	rs
F76	7,95 ± 0,39	fghijlm	F92	0,76 ± 0,02	rs
F98	7,83 ± 0,20	ghijlm	F15	0,76 ± 0,00	rs
F43	7,44 ± 1,03	hijlmn	F75	0,54 ± 0,04	s

\* = Médias (n=3) seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente (teste deTukey, p=0,05)

Verificou-se em função dos resultados, que o meio MB, proposto por Hankin e Anagnostakis (1975), modificado, propiciou boa detecção da atividade lipolítica extracelular, confirmando vários relatos como os de Andretta, Damschi Junior e Onofre (2007) e, Dartora e outros (2005).

O teste de rodamina B vem sendo utilizado para a detecção em meio sólido da atividade lipolítica extracelular de microrganismos lipolíticos. No caso de bactérias, tal fato já foi relatado com uma sensibilidade mínima de atividade lipolítica de até 0,002 U.mg<sup>-1</sup> proteína, por Jette e Ziomek (1994). No presente trabalho, em que foram avaliados isolados fúngicos leveduriformes em um meio de cultura mineral mínimo acrescido de 10 % de óleo de soja e de rodamina-B (MMOS<sub>R</sub>) verificou-se boa detecção de atividade lipolítica após 48 h e, principalmente, 96 horas de incubação a 28°C, com a típica coloração “laranja fluorescente”, visualizada sob radiação ultravioleta, ocorrendo diretamente na biomassa, sem que, no entanto, pudesse ser visualizado halo, com estas características, em torno da colônia, diferentemente do

verificado para bactérias lipolíticas por Kouker e Jaeger (1986), Jette e Ziomek (1994), Haba e outros (2000a), Semionato (2006) e Lima Jr. (2009). Na ausência de justificativa para tal fato na literatura consultada, supomos tratar-se esta atividade lipolítica de atividade lipolítica intracelular. Tal suposição também em função da ausência de atividade lipolítica extracelular, avaliado em função do índice enzimático no meio MB, pelo isolado F18 (*Rhizomucor* sp.) que, por outro lado, apresentou o maior crescimento de colônia (59,5 mm de diâmetro, com 96 h de incubação) no meio MMOS<sub>R</sub>. Acresce-se a estas observações os bons resultados obtidos com o isolado F18, em relação à produção de biomassa e à remoção de óleos e graxas em substratos sólidos acrescidos de óleo de soja e resíduos oleosos do saneamento, verificados em etapas subseqüentes desta pesquisa.

Para a avaliação do índice enzimático (IE) o meio de cultura MB foi preparado com o Tween 80, em substituição ao Tween 20, que é a fonte lipídica mencionada na composição deste meio por Menezes e Assis (2004). Assim como a concentração em ágar também foi modificada deixando de ser utilizada 20 g.L<sup>-1</sup> e sim 17 g. L<sup>-1</sup>, o que parece ter facilitado a difusão das lipases produzidas e, conseqüentemente, a reação que leva a formação de cristais de cálcio do ácido láurico, visível como um halo opaco, citada como oriunda da atividade lipolítica extracelular em fungos (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975; MENEZES e ASSIS, 2004).

Também, diferentemente de Hankin e Anagnostakis (1975) e de Menezes e Assis (2004) utilizou-se no meio MB, nesta etapa do trabalho, antibióticos (sulfato de estreptomicina e cloranfenicol), aumentando a eficiência do processo, por evitar contaminações bacterianas e por actinomicetos, sem nenhum comprometimento detectável da expressão da atividade lipolítica dos isolados fúngicos obtidos. O meio de cultura MMOS<sub>R</sub> também teve acrescido os antibióticos e, sua utilização com o propósito específico de isolamento de fungos filamentosos e leveduriformes, com a composição que propusemos e utilizamos, parece não ter precedentes na literatura.

### **5.1.3 Descrição das características morfológicas, identificação e classificação taxonômica dos isolados fúngicos filamentosos produtores de lipases**

Visando a caracterização morfológica e a identificação dos isolados fúngicos produtores de lipases, ao nível de gênero, bem como o respectivo enquadramento

taxonômico, foram utilizados cultivos em meio de cultura BDA, a 28°C, durante 7 dias, visando a avaliação do aspecto das colônias (estruturas macroscópicas). O mesmo meio de cultura e condições de incubação foram utilizados para microcultivos, conforme descrito no item 4.1.4. O enquadramento taxonômico dos isolados fúngicos filamentosos ocorreu com base nas características morfológicas apresentadas e de acordo com Barnett e Hunter (1986), Domsch, Gams e Anderson (1980) e Ellis (1997), sendo a classificação efetuada ao nível de gênero. Os isolados de fungos filamentosos pertencentes a cada um dos gêneros descritos constam da Tabela 7.

### ***Penicillium***

**Morfologia das colônias** – as colônias destes isolados mostraram-se filamentosas e com crescimento rápido, inicialmente brancas e depois (120 h) verde oliváceas, consistindo de um denso feltro de conidióforos com conídios hialinos, que agrupados mostram uma coloração verde-oliva.

**Morfologia microscópica** – foram observadas hifas septadas com 1,5 a 5 µm de diâmetro, conidióforos simples ou ramificados, hialinos, com parede lisa, com a presença de fiálides (células conidiogênicas) em forma de pincel (largura 120-220 µm), cujas ramificações primárias apresentam dimensões de 10-12,5 x 2,5 µm, com os conídios (ameroconídios) produzidos em sucessão basipetal (catenulados) a partir da extremidade das mesmas. Os conídios (fialosporos) apresentam forma esférica, elíptica ou oval, são unicelulares, lisos ou de superfície equinulada e apresentaram as dimensões de 2,7-3,5 x 2,2-2,3 µm.

**Classificação taxonômica** – na forma teleomórfica (reprodução sexuada) os isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Penicillium*, do reino Fungi, filo Ascomycota, classe Euscomycetes, ordem Eurotiales e família Trichomaceae. Na forma anamórfica (reprodução assexuada) os isolados foram classificados como do Reino Fungi, de divisão *incertae sedis*, grupo dos fungos mitospóricos (classe-forma) e sub-grupo dos hifomicetos.

### ***Rhizomucor***

**Morfologia das colônias** – as colônias mostraram com coloração cinza amarronzada (aspécto de sujeira) com crescimento muito rápido (superior a 90 mm, em 7 dias de incubação), com abundante esporulação amarelo-amarronzada na superfície.

**Morfologia microscópica** – observou-se a formação de micélio contínuo, a partir dos quais desenvolveram-se esporangióforos e esporângios com coloração amarelo-amarronzada e com 50 a 60  $\mu\text{m}$  de diâmetro e columelas de 10 a 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro, dentro dos quais os esporangiósporos globosos, com cerca de 2,5 a 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro, facilmente liberados para o meio. Verificou-se a presença de estolões e rizóides pouco desenvolvidos na base dos esporangióforos. Em culturas velhas observou-se a formação de zigósporos, com coloração marron escura, globosos.

**Classificação taxonômica** – os isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Rhizomucor*, do reino Fungi, filo Zygomycota, ordem Mucorales e família Mucoraceae.

### ***Aspergillus***

**Morfologia das colônias** - as colônias mostraram-se com coloração verde-amarelado, verde claro e escuro, com textura pulverulenta, superficialmente. A margem das colônias apresentou-se com coloração branca e textura cotonosa. No reverso das placas (fundo) verificou-se a coloração verde-creme a escuro.

**Morfologia microscópica** - observou-se a formação de micélio septado, com conidióforos hialinos, ligeiramente rugosos. Também a presença de vesícula globosa a subglobosa com 20 - 35  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As fiálides (6 -10 x 4,0 – 5,5  $\mu\text{m}$ ) cresceram diretamente sobre a vesícula ou sobre as métulas. Métulas com 6,5-10 x 3 – 5,0  $\mu\text{m}$ . Conídios globosos a subglobosos, 2 - 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro, de cor verde claro.

**Classificação taxonômica** – na forma teleomórfica os isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus*, do reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Eurotiales e família Trichomaceae. Na forma anamórfica os isolados foram classificados como do Reino Fungi, de divisão *incertae sedis*, grupo dos fungos mitospóricos e sub-grupo dos hifomicetos.

## ***Fusarium***

**Morfologia das colônias** - as colônias apresentaram-se de lisas, com características de lanosas, a cotonosas. As colônias, superficialmente mostraram coloração variável: branca, creme, bege, salmão, canela, amarela, vermelha, violeta, rosa ou roxa. No reverso da placa de Petri também variaram em cor: incolor, castanha, vermelha, roxa escura ou marrom.

**Morfologia microscópica** - observou-se a formação de micélio septado, com a presença de fiálides cilíndricas, com um colarete de pequeno porte, solitárias ou produzidas como um componente de um complexo sistema de ramificação. Monofiálides e polifiálides localizaram-se na porção superior ou em cadeias. Macroconídios (3-8 x 11-70  $\mu\text{m}$ ) foram produzidos a partir de fiálides em conidióforos ramificados ou não ramificados, mostrando-se pluricelulares, com parede celular lisa e grossa, em forma de fuso ou cilíndrica. Microconídios (2-4 x 4-16  $\mu\text{m}$ ), formados a partir de conidióforos simples, longos ou curtos, mostraram-se unicelulares, lisos, hialinos e ovóides a cilíndricos, agrupados ou ocasionalmente em cadeias. Clamidósporos, quando presentes, mostraram-se globosos, intercalares ou terminais nas hifas, com paredes lisas e grossas, aos pares, grupos ou cadeias.

**Classificação taxonômica** – na forma teleomórfica os isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Fusarium*, do reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Hypocreales, família Hypocreaceae. Na forma anamórfica os isolados foram classificados como do Reino Fungi, de divisão *incertae sedis*, grupo dos fungos mitospóricos e sub-grupo dos hifomicetos.

## ***Geotrichum***

**Morfologia das colônias** - as colônias mostraram-se de rápido crescimento, com coloração branca, seca, pulverulentas a cotonosas, com aspecto leveduriforme e textura arenosa.

**Morfologia microscópica** - observou-se a formação de artroconídios unicelulares retangulares, produzidos em cadeia (os do final com forma de barril) medindo de 3-6 x 6-12  $\mu\text{m}$ , hialinos, como resultado da fragmentação das hifas.

**Classificação taxonômica** – na forma teleomórfica os isolados foram classificados como pertencendo ao gênero *Geotrichum*, do reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales e família Endomycetidae. Na forma anamórfica os isolados foram classificados como do Reino Fungi, de divisão *incertae sedis*, grupo dos fungos mitospóricos e sub-grupo dos hifomicetos.

### ***Cladosporium***

**Morfologia das colônias** - as colônias mostraram-se com baixa taxa de crescimento, com coloração marron olivácea a marron escuro, algumas vezes cinza, bege ou marron, semelhante à camurça a flocoso, algumas vezes tornando-se pulverulento devido a abundante produção de conídios.

**Morfologia microscópica** - observou-se a formação de micélio septado, pigmentado como descrito anteriormente, com condióforos mais ou menos distintos das hifas vegetativas, eretos, retos ou flexuosos, não ramificados ou ramificados somente na região apical. Os conídios mostraram-se com 1 a 4 células, lisos, verrugosos ou equinulados, suglobosos, com um hilum escuro e produzidos em cadeias ramificadas e acropetais, com forma de escudo, facilmente desarticulada. As dimensões conidiais variaram de 3-8 x 9-47  $\mu\text{m}$ .

**Classificação taxonômica** – na forma teleomórfica os isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Cladosporium*, do reino Fungi e filo Ascomycota. Na forma anamórfica os isolados foram classificados como do Reino Fungi, de divisão *incertae sedis*, grupo dos fungos mitospóricos e sub-grupo dos hifomicetos.

### ***Beauveria***

**Morfologia das colônias** - as colônias mostraram-se com coloração branco a branco amareladas, com textura cotonosa a pulverulentas ou flocosas e taxa de crescimento moderadamente rápido (1 a 3 cm, com 7 dias de incubação).

**Morfologia microscópica** - observou-se a formação de hifas estreitas, septadas e hialinas (2-8  $\mu\text{m}$  de largura). As células conidiogênicas sobre as hifas mostraram-se em forma de frasco com uma dilatação na base e filamentos estreitos zig-zagueando

no ápice, formando agrupamentos densos, com aparência de pequenas bolas pulverulentas nas hifas aéreas quando observadas em microscópio estereoscópico. Os conídios formaram-se a partir de cada ponto lateral do conidióforo (crescimento geniculado simpodial), e apresentaram diâmetro variável de 2-4  $\mu\text{m}$ , hialinos, unicelulares, com formato globoso a ovóide.

**Classificação taxonômica** – na forma teleomórfica os isolados foram classificados como pertencendo ao gênero *Beauveria*, do reino Fungi, filo Ascomycota, classe Euscomycetes, ordem Clavicipitales. Na forma anamórfica os isolados foram classificados como do Reino Fungi, de divisão *incertae sedis*, grupo dos fungos mitospóricos e sub-grupo dos hifomicetos.

### ***Verticillium***

**Morfologia das colônias** - as colônias mostraram-se inicialmente com coloração branca, com crescimento moderadamente rápido, veludas a lanosas, tornando-se ligeiramente amareladas posteriormente. No reverso da placa observou-se coloração branca.

**Morfologia microscópica** - observou-se a formação de hifas hialinas e septadas, com conidióforos hialinos, simples ou ramificados. A ramificação dos conidióforos ocorreram verticiladamente (semelhante a raios de uma roda a partir de um eixo central) em níveis diversos. Os conidióforos sustentam fiálides ponteagudas em seu entorno, em cujos ápices formaram-se os conídios. Os conídios, com 2-13  $\mu\text{m}$  de comprimento, mostraram-se hialinos ou ligeiramente coloridos, unicelulares, com formato oval a piriforme, isolados ou em grupos em forma de bolas ou cabeças.

**Classificação taxonômica** – o isolado fungico, na forma teleomórfica, foi classificado como pertencendo ao gênero *Verticillium*, do reino Fungi, de divisão *incertae sedis*, grupo dos fungos mitospóricos e sub-grupo dos hifomicetos.

### ***Botrytis***

**Morfologia das colônias** - as colônias mostraram-se de rápido crescimento (3-9 cm de diâmetro, com 7 dias de incubação). A textura das colônias mostrou-se lanosa com

coloração superficial inicialmente branca tornando-se cinza amarronzada com o tempo. No reverso da placa de Petri a coloração apresentada pela colônia é negra.

**Morfologia microscópica** - observou-se a produção de hifas septadas, hialinas a marrons. Os conidióforos mostraram-se também septados, porém largos e marrons, com ramificação apical. Estas ramificações terminavam em vesículas que originaram blastoconídios sobre suas superfícies. Os artroconídios localizavam-se sobre denticulos curtos, e apresentaram-se hialinos a marrons, unicelulares e circulares a ovais na sua forma ((7-14 x 5-9  $\mu\text{m}$ ). Observou-se também, em culturas velhas, a produção de escleródios visualizados como manchas de coloração escura na superfície das colônias.

**Classificação taxonômica** - os isolados fúngicos, na forma teleomórfica, foram classificados como pertencendo ao gênero *Botrytis*, do reino Fungi, de divisão *insertae sedis*, grupo dos fungos mitospóricos e sub-grupo dos hifomicetos.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA ESPECÍFICA, ATIVIDADE BLOSSURFACTANTE, REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS E PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR FUNGOS, EM CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NOS ESTADOS LÍQUIDO E SÓLIDO

### 5.2.1 Atividade lipolítica e produção de biomassa por isolados fúngicos com 120 horas em condições de fermentação no estado líquido (FEL)

Os resultados relativos à atividade lipolítica específica e à produção de biomassa dos 20 isolados fúngicos (filamentosos e leveduriformes) analisados, encontram-se na Tabela 9.

Observa-se (Tabela 9) que a atividade lipolítica às 120 h de incubação, à 30°C e 150 rpm, em processo de fermentação no estado líquido (FEL) no meio MMOS, variou de  $0,13 \pm 0,03$  (F18: *Rhizomucor* sp.) a  $18,06 \pm 0,36$  U.mg<sup>-1</sup> (F2: *Penicillium* sp.).

Por sua vez, a produção de biomassa, com os resultados expressos em base seca (Tabela 9), variou de  $7,82 \pm 0,13$  (F98: *Cladosporium* sp.) a  $12,68 \pm 0,15$  mg.mL<sup>-1</sup> (F80: levedura).

Para a atividade lipolítica específica os resultados mostraram-se coerentes com os obtidos em relação à atividade lipolítica extracelular evidenciada através do índice enzimático (IE) no meio sólido MB, considerando a maioria dos isolados avaliados em ambas etapas desta pesquisa, com exceção do isolado F80 que destacou-se com o maior valor (IE =  $68,33 \pm 4,00$ ) e colocou-se (em ordem decrescente) como o sétimo valor em atividade lipolítica específica (AL =  $2,74 \pm 0,17$  U. mg<sup>-1</sup>) no FEL (Tabela 9).

Espécies de *Penicillium* têm sido relatadas como produtoras de lipases extracelulares, como *P. citrinum*, *P. cyclopium*, *P. simplicissimum*, *P. caseicolum*, *P. restrictum*, *P. expansum*, *P. corylophilum*, *P. chrysogenum*, *P. roquefortii*, *P. camembertii*, *P. abeanum*, entre outras (FREIRE et al., 1997; JESUS et al., 1999; REETZ, 2002; BARON et al., 2005, CARVALHO et al., 2005, AZEREDO et al., 2007).

Baron e outros (2005) pesquisaram o fungo *Penicillium corylophilum* (IOC 4211) visando biocatálise enzimática e verificaram atividade lipolítica específica de  $11,82 \pm$

1,35 U.mg<sup>-1</sup> de proteína, após 142 h, a 29°C e 120 rpm, inferior à obtida neste trabalho para o isolado F2, mas superior ao F102 (*Penicillium* sp.).

Tabela 9 - Produção de biomassa e atividade lipolítica apresentada por 20 isolados fúngicos em FEL (meio de cultura MMOS), com 120 h de incubação a 30°C e 150 rpm

Isolado	Gênero	Atividade lipolítica* (U.mg <sup>-1</sup> )	Atividade lipolítica* (U.mL <sup>-1</sup> )	Biomassa seca* (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade lipolítica por biomassa seca (U.mg <sup>-1</sup> )**
F02	<i>Penicillium</i>	18,06 ± 0,36 a	7,22 ± 0,14 a	10,19 ± 0,13 cdef	0,71
F96	<i>Geotrichum</i>	14,25 ± 0,31 b	5,70 ± 0,12 b	9,23 ± 0,18 h	0,62
F41	<i>Beauveria</i>	9,13 ± 0,23 c	3,65 ± 0,09 c	9,62 ± 0,14 g	0,38
F28	<i>Cladosporium</i>	6,10 ± 0,22 d	2,44 ± 0,09 d	7,61 ± 0,15 j	0,32
F98	<i>Cladosporium</i>	4,85 ± 0,16 e	1,94 ± 0,07 e	7,82 ± 0,13 j	0,25
F64	<i>Colletotrichum</i>	3,79 ± 0,07 f	1,52 ± 0,03 f	9,71 ± 0,16 g	0,16
F80	Levedura	2,74 ± 0,17 g	1,09 ± 0,07 g	10,12 ± 0,16 ef	0,11
F102	<i>Penicillium</i>	2,56 ± 0,05 g	1,02 ± 0,02 g	8,77 ± 0,12 i	0,12
F72	<i>Colletotrichum</i>	2,49 ± 0,25 g	0,99 ± 0,09 g	9,05 ± 0,18 hi	0,11
F76	<i>Colletotrichum</i>	2,36 ± 0,39 g	0,94 ± 0,16 g	9,02 ± 0,13 hi	0,10
F111	Levedura	1,53 ± 0,25 h	0,61 ± 0,09 h	10,45 ± 0,11 cde	0,06
F104	<i>Botrytis</i>	1,44 ± 0,11 h	0,58 ± 0,11 h	11,89 ± 0,10 b	0,05
F107	Levedura	0,51 ± 0,10 i	0,20 ± 0,04 i	12,68 ± 0,15 a	0,02
F35	<i>Beauveria</i>	0,47 ± 0,01 i	0,18 ± 0,01 i	10,74 ± 0,19 c	0,02
F74	<i>Fusarium</i>	0,39 ± 0,04 i	0,15 ± 0,01 i	10,27 ± 0,12 cde	0,10
F108	Levedura	0,28 ± 0,08 i	0,11 ± 0,03 i	9,07 ± 0,15 hi	0,01
F106	<i>Rhizomucor</i>	0,25 ± 0,01 i	0,10 ± 0,01 i	9,91 ± 0,12 fg	0,01
F07	<i>Verticillium</i>	0,18 ± 0,01 i	0,07 ± 0,01 i	10,50 ± 0,15 cd	0,01
F81	<i>Aspergillus</i>	0,18 ± 0,05 i	0,07 ± 0,02 i	9,87 ± 0,21 fg	0,01
F18	<i>Rhizomucor</i>	0,13 ± 0,03 i	0,05 ± 0,01 i	10,25 ± 0,80 cde	0,01

\* = Médias (n=4) seguidas por letras diferentes, no sentido vertical, apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey (p=0,05). \*\* Atividade lipolítica extracelular Carvalho e outros (2005), comparando, em meio líquido composto de óleo de oliva 1,0%, peptona 2,0%, extrato de levedura 0,1% e NaCl 0,5%, isolados de duas

espécies de *Penicillium*, quanto à atividade lipolítica e a produção de biomassa, verificaram que *P. restrictum* produziu 14,2 mg de biomassa.mL<sup>-1</sup> de meio e atividade lipolítica de 13,0 U. mL<sup>-1</sup> e, *P. solitum* produziu 6,56 mg de biomassa. mL<sup>-1</sup> e atividade lipolítica de 10,5 U. mL<sup>-1</sup>, o que indicou a inexistência de correlação entre a biomassa produzida e a atividade lipolítica, o que também se verificou no presente trabalho (R= - 0,251), para o conjunto de isolados.

A partir dos resultados de atividade lipolítica específica obtidos nesta etapa, foram selecionados os isolados F2 (*Penicillium* sp.), F41 (*Beauveria* sp.) e F94 (*Geotrichum* sp.) para os ensaios de biodegradação de resíduos oleosos do saneamento ambiental em substrato sólido, avaliada por respirometria aeróbia em condições estáticas, que também constituem este trabalho de pesquisa. Foram também escolhidos para a etapa subsequente desta pesquisa, a partir dos resultados de atividade lipolítica específica desta etapa, os isolados F2 (18,06 ± 0,36 U.mg<sup>-1</sup>) e F18 (0,13 ± 0,03) em função de representarem os extremos em relação aos resultados obtidos.

### **5.2.2 Monitoramento da atividade lipolítica, atividade biossurfactante, remoção de óleos e graxas e, produção de biomassa pelos isolados F2 e F18, em condições de FEL e FES**

Em relação à avaliação da atividade lipolítica e atividade biossurfactante de F2 e F18, em condições de fermentação em estado líquido (FEL) e sólido (FES), os valores de pico, que foram obtidos com 48 horas de incubação, e correspondem à média de amostras analisadas em triplicata, são ilustrados na Tabela 10. Nesta tabela também são observados os valores de biomassa, em base seca, obtidos para os tempos de incubação de 48 e 120 h e de remoção de óleos e graxas, que corresponde ao consumo do óleo de soja acrescentado ao substrato de cultivo na proporção de 10%, para o crescimento dos isolados fúngicos, com 120 h de incubação. O pH observado nos substratos, com 48 horas de incubação, também é mostrado nesta tabela.

Na íntegra os resultados relativos às principais variáveis analisadas nesta etapa da pesquisa, obtidos por análises de amostras coletadas em intervalos de tempo de 24

h, totalizando as 120 h de incubação, adotadas para a FES, podem ser observados através das Figura 15, 16 e 17.

Observa-se na Figura 15 e nas Tabelas 10 e 11, que o isolado F18 apresentou, em condições de FEL, atividade lipolítica extracelular muito inferior àquela apresentada pelo isolado F2, confirmando os resultados obtidos na etapa anterior, nas mesmas condições de fermentação e, aqueles verificados em nos meios de cultura sólidos MB e MMOS<sub>R</sub>. Estes resultados parecem indicar a tendência acentuada de F18 para atividade lipolítica intracelular, enquanto que F2 confirmou seu potencial para atividade lipolítica extracelular. Para ambos, os picos de atividade lipolítica, tanto quanto os de atividade biossurfactante, ocorreram com 48 h de incubação. Em ambas condições de fermentação, F18 superou F2 em relação à atividade biossurfactante (Figura 1 e Tabelas 10 e 11), com diferença estatística evidenciada entre as médias, pelo teste de tukey ( $p = 0,05$ ).

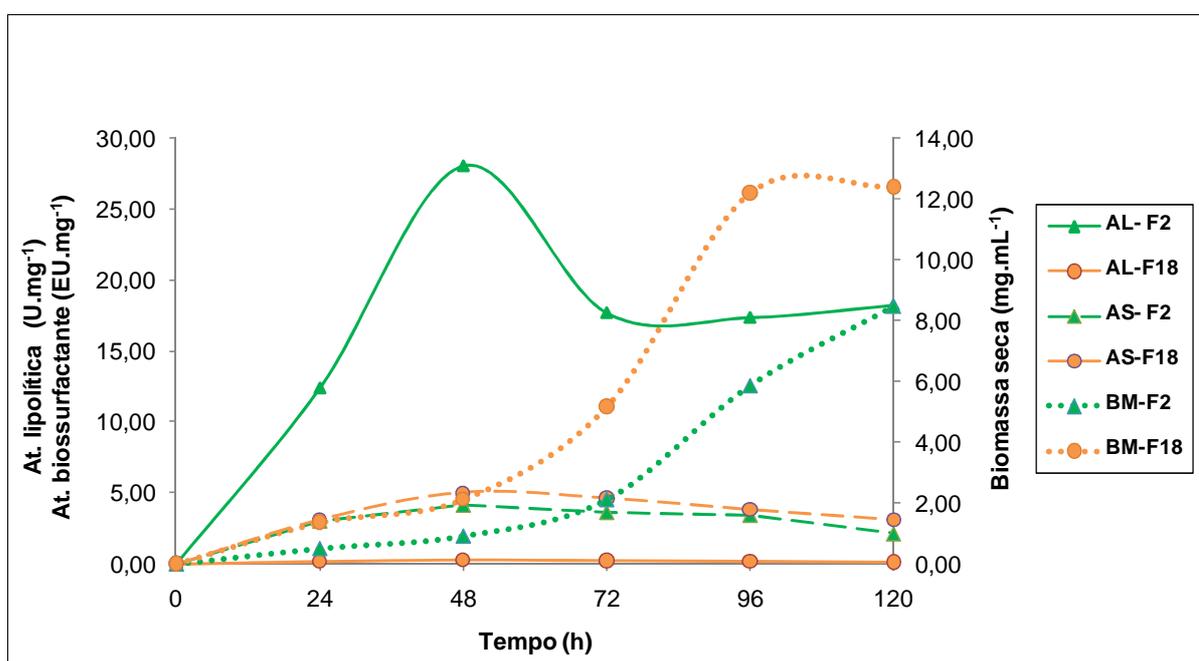


Figura 15 – Atividade lipolítica, atividade biossurfactante e biomassa seca produzidos pelos isolados fúngicos F2 e F18 em FEL, à 30°C e 150 rpm, por 120 h

O valores médios observados para as variáveis analisadas, integrando os resultados para as cinco avaliações nos dois sistemas reacionais, são apresentados na Tabela 11, estatisticamente analisados e comparados através do teste de Tukey ( $p=0,05$ ). A mesma tabela é utilizada para apresentar os valores médios e as regressões

lineares para as correlações (  $n=3$  para repetições e  $n=5$  para os tempos de incubação: 24, 48, 72, 96 e 120 h) entre atividade lipolítica específica (AL) , atividade biossurfactante (AS), biomassa seca (BM) e conteúdo de óleos e graxas (O&G), representado pelo óleo soja acrescentado inicialmente ao substrato, na concentração de 10%. Também os valores médios de pH dos substratos de cultivo de F2 e F18 nos processos de fermentação em estado líquido (FEL) e sólido (FES) são apresentados nesta tabela.

Na Figura 16 são expressos os resultados do monitoramento da atividade lipolítica, atividade biossurfactante e produção de biomassa seca, pelos isolados fúngicos F2 e F18, em condições de fermentação em estado sólido (FES). A atividade lipolítica, neste caso, foi expressa em unidades volumétricas ( $U \cdot mg^{-1} \cdot SS$ ). Verificou-se elevada superioridade F2 em relação a F18 quanto à atividade lipolítica extracelular por unidade do substrato utilizado no processo de fermentação, em base seca, confirmando, nesta condição de fermentação, os resultados observados anteriormente na FEL.

Comparativamente à FEL, a FES possibilitou maiores níveis de atividade lipolítica e atividade surfactante, assim como produção de biomassa pelos fungos analisados. Estes resultados, em relação à atividade lipolítica assemelham-se com aqueles obtidos por Pinheiro (2006), que para o fungo *Penicillium verrucosum*, obteve valores de atividade lipolítica de 40 e de 52  $U \cdot mg^{-1} \cdot SS$  com 48 e 72 horas de fermentação em estado sólido, enquanto que , com a fermentação submersa, os valores foram de 3,15  $U \cdot mL^{-1}$ , após 96 h. Os resultados obtidos no presente trabalho em relação a F2 (*Penicillium* sp.) superam estes valores, porém, as condições experimentais foram diferentes. Azeredo et. al. (2007), também verificaram su

Vários autores (MAHADIK et al., 2002; VARGAS, 2004; PINHEIRO, 2006; MACAGNAN, 2007; DUTRA, 2007; AZEREDO et al., 2007; RIGO, 2009; ALBERTON, 2009, ALBERTON et al., 2010), vêm observando a superioridade da produção de lípases por fungos filamentosos em condições de FES em relação à FEL.

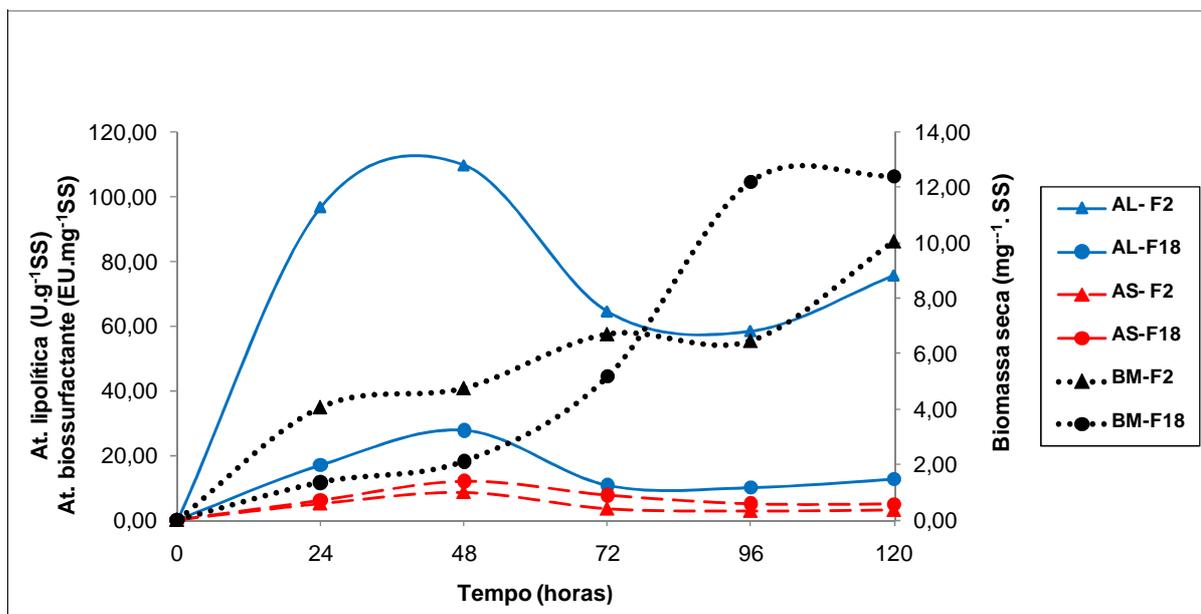


Figura 16 – Atividade lipolítica (AL), atividade biossurfactante (AS) e biomassa seca (BM) produzidos pelos isolados fúngicos F2 e F18 em FES, à 30°C, por 120 h

Verificou-se que a AL do isolado F2 (*Penicillium* sp.) foi significativamente maior que a do F18 (*Rhizomucor* sp.) em ambos processos de fermentação. De fato, estes valores refletem a exo-atividade da lipase, visto que foi medida a partir do sobrenadante do cultivo, após filtração, e expressa por mg de proteína contida no mesmo.

Tabela 10 - Valores de pico ( n=3) observados com 48 h de crescimento, da atividade lipolítica específica, atividade biossurfactante, produção de biomassa seca, remoção de óleos e graxas e, pH, referentes aos isolados F2 (*Penicillium* sp.) e F18 (*Rhizomucor* sp.) em condições de FES e FES

Parâmetros	FEL		FES	
	F2	F18	F2	F18
Atividade Lipolítica Específica (U. mg <sup>-1</sup> )	28,09 ± 0,25	0,25 ± 0,02	34,11 ± 0,62	5,81 ± 0,25
Atividade Surfactante (EU.g <sup>-1</sup> )	4,23 ± 0,27	5,00 ± 0,21	8,58 ± 0,22	11,97 ± 0,95
Biomassa <sup>BM</sup> Seca (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,92 ± 0,14*	2,12 ± 0,32*	4,76 ± 0,26*	5,87 ± 0,39*
	8,48 ± 0,46**	12,40 ± 0,94**	10,07 ± 0,41**	16,83 ± 1,67**
Remoção de O&G (%)	NA	NA	79,30 ± 0,43**	71,50 ± 0,32**
pH	7,5 ± 0,08*	7,0 ± 0,09*	4,9 ± 0,05*	4,4 ± 0,06*

Na = não aplicável \* = Biomassa e pH com 48 h. \*\* = Biomassa e remoção de O&G com 120 h.  
<sup>BM</sup> Conversão a partir das concentrações médias (n=3) de ergosterol por grama de biomassa fúngica seca (mg. g<sup>-1</sup>), para F2: 1,28 (10 dias), 1,57 (20 dias) e 1,49 (30 dias) e, para F18: 1,55 (10 dias), 1,52 (20 dias) e 1,54 (30 dias).

Tal resultado aproximou-se do obtido para estes isolados avaliados entre os 20 na etapa anterior, sendo que na FES, F18 apresentou acréscimo substancial na atividade lipolítica específica, comparado com o obtido na FEL, embora com resultados ainda muito inferiores aos de F2, o que indica menor potencial de atividade lipolítica extracelular que o exibido por F2 (Figura 17). O acréscimo verificado pode ser devido às condições propiciadas na FES, visto que este processo de fermentação tem-se mostrado mais eficiente para a produção de enzimas, especialmente por fungos filamentosos, por propiciar condições ambientais similares ao seu *habitat* natural, conforme observado por Damaso e outros (2008), Castiglione (2006) e Castiglione, Bertolin e Costa (2009).

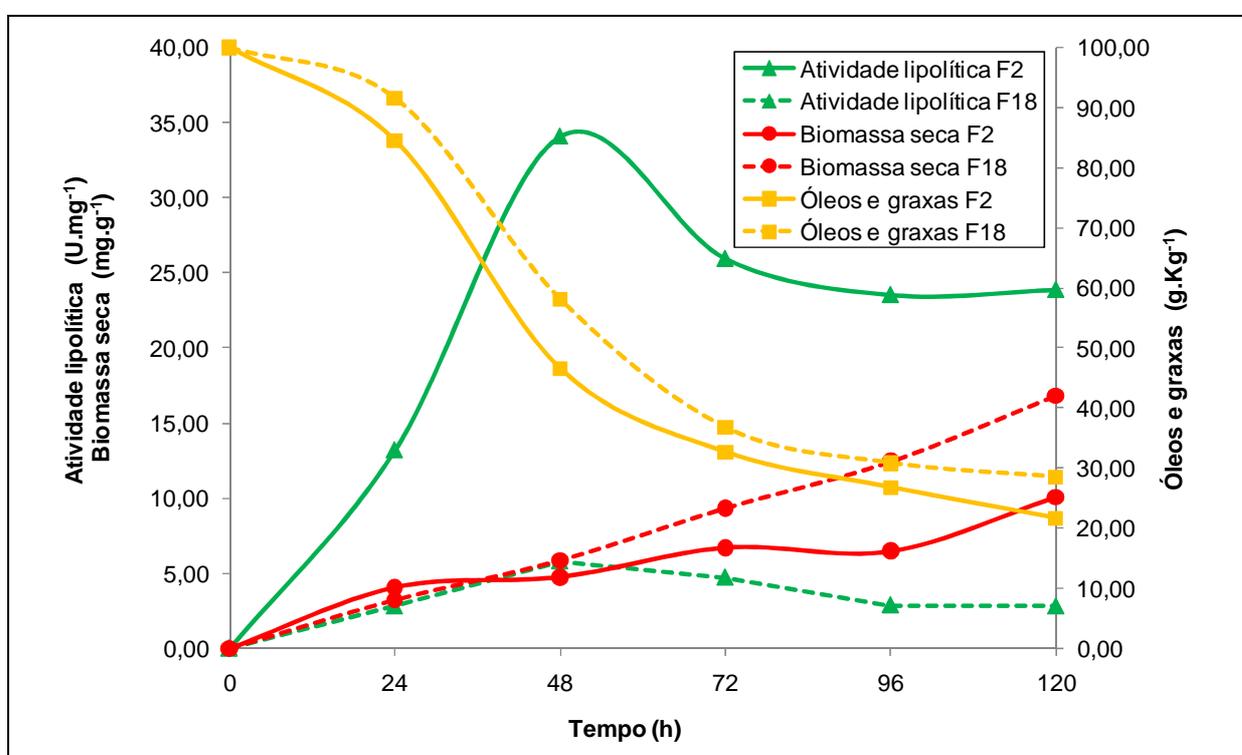


Figura 17 – Atividade lipolítica, teor de óleos e graxas e biomassa seca, apresentados pelos isolados fúngicos F2 e F18, em FES, a 30°C, por 120 h

A AL foi maior e estatisticamente superior para F2 nos dos sistemas reacionais, porém o contrário ocorreu em relação à AS, crescimento (produção de biomassa), significativamente superiores para F18 (Tabela 11). Isto pode dever-se à endoatividade ou seja, à atividade de lipases ligadas às células de F18 (*Rhizomucor* sp.), em contraste com aquela extracelular observada em F2 (*Penicillium* sp.). Deve-se enfatizar que, apesar da atividade lipolítica de específica de F18 ter sido menor

em ambos sistemas reacionais, sua atividade lipolítica intracelular foi muito significativa, como demonstrado pelo crescimento da biomassa e pelos valores de remoção de óleos e graxas observados no processo de FES, embora um pouco inferiores aos observados para F2.

Ressalta-se que a presença de lipídios no meio e a atividade surfactante demonstrada por F2 e F18, são possíveis incrementos à atividade lipolítica, conforme verificado também para *Yarrowia lipolytica*, por Dominguez e outros (2003) e para *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium* sp. por Martins, Kalil e Costa (2008).

Conforme Luz (2007), a adição de alguns compostos como os surfactantes aumenta a permeabilidade das células, facilitando a passagem das moléculas de lipídeos através da membrana celular fúngica, sugerindo um favorecimento à atividade lipolítica intracelular por estes microrganismos. Tal observação talvez seja a justificativa para os resultados relativos aos valores de remoção de óleos e graxas (consumo do óleo de soja) dos substratos de cultivo na FES, pelo isolados F2 e F18, principalmente em relação a este último, dado que apresentou valores de atividade lipolítica específica (extracelular) bem inferiores ao primeiro.

Resultados obtidos por outros pesquisadores, embora em condições experimentais distintas daquelas que utilizamos, corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho. Mahadik e outros (2002) aumentaram em duas vezes a quantidade de lipase extraída após fermentação semi-sólida de *Aspergillus*, através da adição 0,5% do surfactante Triton X-100. Silva e outros (2005) realizaram a extração da lipase de *M. anisopliae* após o cultivo submerso deste microrganismo, pela adição de surfactantes, sendo que os melhores resultados foram alcançados pela utilização de 0,25% de SDS e Tween 80. Tan e outros (2004) adicionaram o surfactante Tween 60 em um meio de cultura para a produção de lipase por *P. camemberti* e obteve aumento na quantidade produzida desta enzima.

Na Tabela 11 são mostradas as correlações e os resultados (inclusive modelos) das análises de regressão linear correspondentes, em relação às atividades lipolítica específica (AL), surfactante (AS), conteúdo de óleos e graxas (O&G) e produção de biomassa fúngica (BM) pelos isolados F2 e F18, nos dois sistemas reacionais. Verificou-se inexistente, fraca ou média as correlações lineares entre AL ou AS

com a BM e AL e AF com a BM para ambos isolados nos dois sistemas reacionais, explicável em função de que tais atividades não foram avaliadas diretamente a partir da biomassa micelial dos fungos, e sim, do extrato protéico obtido dos seus cultivos. Enquanto a produção de biomassa foi crescente ao longo das 120 h de incubação, nas duas condições de fermentação (FEL e FES), a atividade lipolítica e a atividade surfactante oscilaram no período conforme observado nas Figuras 15, 16 e 17, o que comprometeu a linearidade das correlações entre os mesmos, conforme verificados através das análises estatísticas.

Tabela 11 – Valores médios e regressões lineares para as correlações ( n=3 para repetições e n=5 para tempos de incubação: 24, 48, 72, 96 e 120 h) entre atividade lipolítica específica (AL) , atividade biosurfactante (AS), biomassa seca (BM), teor de óleos e graxas (O&G) e, os valores médios de pH dos substrato de cultivo de F2 e F18 nos processos de fermentação em estado líquido (FEL) e sólido (FES)

Parâmetros	FEL		FES	
	F2	F18	F2	F18
AL * (U. mg <sup>-1</sup> )	18,77 a	0,18 b	24,14 a	3,80 b
AS * (EU.g <sup>-1</sup> )	3,25 b	3,90 a	4,61 b	7,13 a
BM * (mg.mL <sup>-1</sup> ou kg <sup>-1</sup> )	3,58 b	6,65 a	6,42 b	9,54 a
O&G * (g.kg <sup>-1</sup> )	NA	NA	16,9 a	18,4 b
pH	7,29	6,66	4,79	4,51
AL x BM	y = -0,1923x + 19,4623 R <sup>2</sup> = 0,0136 Valor p = 0,67816	y = -0,0053x + 0,2166 R <sup>2</sup> = 0,2724 Valor p = 0,0459455	y = -0,4197x + 21,4498 R <sup>2</sup> = 0,01725 Valor p = 0,64083	y = -0,0878x + 4,6409 R <sup>2</sup> = 0,1123 Valor p = 0,22213
AS x BM	y = -0,1487x + 3,7809 R <sup>2</sup> = 0,4594 Valor p = 0,00549	y = -0,0591x + 4,2988 R <sup>2</sup> = 0,1328 Valor p = 0,1816957	y = -0,6164x + 8,5751 R <sup>2</sup> = 0,3647 Valor p = 0,01712	y = -0,2831x + 9,8319 R <sup>2</sup> = 0,2706 Valor p = 0,04683
BM x AL x AS	y = -4,0085x + 0,2228x + 12,4207 R <sup>2</sup> = 0,5531 Valor p = 0,00797	y = 2,5087x - 86,55x + 12,44 R <sup>2</sup> = 0,3105 Valor p = 0,1073854	y = -0,8358x + 0,1663x + 6,2645 R <sup>2</sup> = 0,5850 Valor p = 0,00511	y = -1,9969x - 2,422x + 14,5708 R <sup>2</sup> = 0,3526 Valor p = 0,07362
AL x O&G	NA	NA	y = 0,6003x + 7,475 R <sup>2</sup> = 0,8004 Valor p = 6,7E-06	y = 0,0514x + 2,5253 R <sup>2</sup> = 0,3758 Valor p = 0,0151
BM x O&G	NA	NA	y = -0,1858x + 9,5781 R <sup>2</sup> = 0,6602 Valor p = 0,00023	y = -0,4196x + 17,3001 R <sup>2</sup> = 0,8129 Valor p = 4,4E-06

\* = Médias (n=4) seguidas por letras diferentes, no sentido horizontal, apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey (p=0,05).

<sup>BM</sup> Conversão a partir das concentrações médias (n=3) de ergosterol por grama de biomassa fúngica seca (mg. g<sup>-1</sup>), para F2: 1,28 (10 dias), 1,57 (20 dias) e 1,49 (30 dias) e, para F18: 1,55 (10 dias), 1,52 (20 dias) e 1,54 (30 dias).

Por outro lado, quando analisaram-se as correlações lineares entre AL e porcentagem de remoção de O&G, para F2 no processo de FEL, a correlação foi forte ( $R^2 = 0,8004$ ), confirmando a predominante atividade lipolítica extracelular em F2, satisfatoriamente quantificada através de sua atividade lipolítica específica, o que não ocorreu em relação à F18, que foi fraca ( $R^2 = 0,3758$ ), confirmando a importância de sua atividade intracelular, dependente diretamente da produção de biomassa ou seja, de suas células integrais lipolíticas, apesar de apresentar também bom nível de atividade extracelular, em FES. Os resultados das análises de regressão linear em relação às correlações entre BM e O&G para F2 ( $R^2 = 0,6602$ ) e F18 ( $R^2 = 0,8129$ ), reforçam esta assertiva.

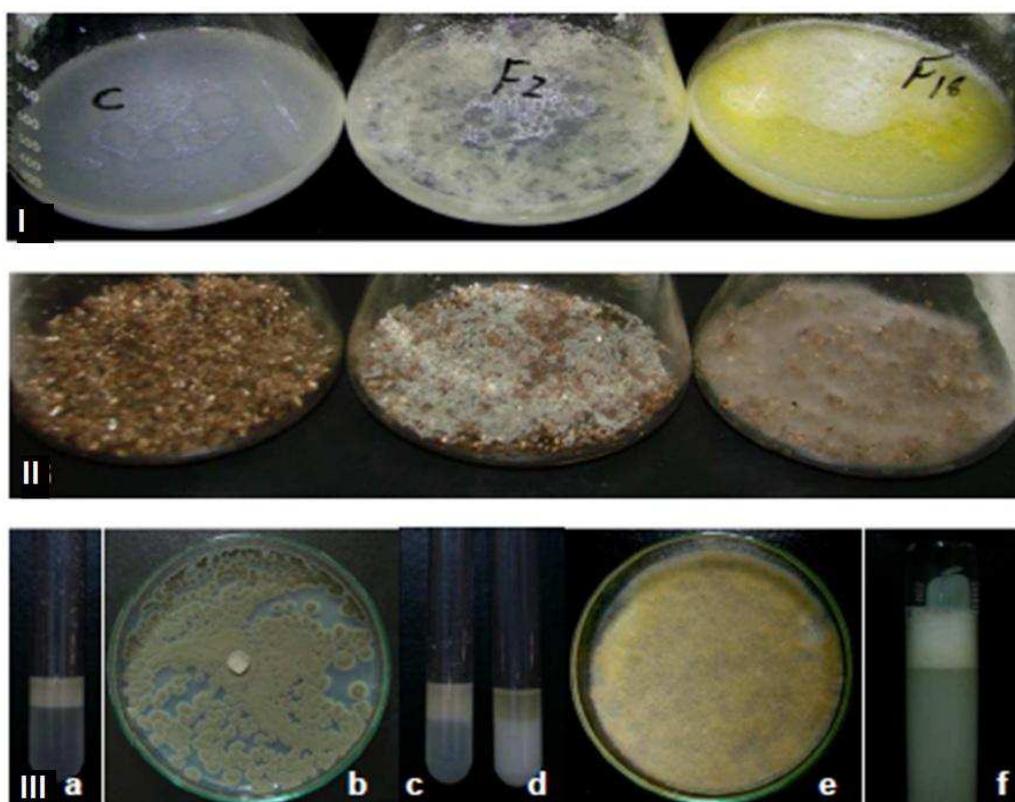


Figura 18 - I) FEL, com 120 horas de incubação a 30°C e 150 rpm; II) FES, com 120 horas de incubação a 30°C e; III) a - emulsificação óleo em água – controle, b - F2 (*Penicillium* sp.), c - emulsificação com F2, d - emulsificação com F18, e - F18 (*Rhizomucor* sp.), f - produção de espuma pelo extrato do cultivo de F18 a partir do processo de FES

Reatores utilizados nos processos de fermentação em estado líquido (FEL) e sólido (FES) exibindo crescimento de biomassa de F2 e F18, com 120 horas de incubação, são mostrados na Figura 18I e 18II, respectivamente. Na Figura 18IIIa, visualiza-se

um tubo controle do teste de emulsificação óleo em água. Na 18IIIc e 18III d, são mostrados resultados de emulsificações com F2 e F18, respectivamente e, na 18III f, a produção de espuma em função da maior produção de biossurfactantes por F18. As Figuras 18III b e 18III e, correspondem aos isolados F2 e F18, com 5 dias de crescimento em placas de Petri com o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) a 30°C.

Geralmente, as enzimas de interesse industrial são produzidas na presença de indutores. No caso de lipases, a presença de triacilgliceróis, surfactantes, óleos vegetais, resíduos oleosos industriais ou seus produtos de hidrólise no meio de cultura, na maioria dos casos, apresentam um efeito indutor sobre a produção (TAN et al., 2004; DAMASO et al., 2008). Por sua vez, o processo de fermentação em estado sólido (FES) envolve o crescimento e metabolismo de microrganismos na ausência (ou próximo) de água livre, empregando um substrato sólido como suporte. Processos usando substratos sólidos são economicamente importantes para países, como o Brasil, que apresentam abundância de biomassa e resíduos industriais, que podem ser utilizados como matérias primas de baixo custo. Esta técnica tem muitas vantagens em relação à fermentação em estado líquido (FEL), incluindo maiores produções e menor demanda de energia (CASTILHO et al., 2000; DAMASO et al., 2008).

Verificou-se nesta etapa que as atividades lipolíticas de F2 (*Penicillium* sp.) e de F18 (*Rhizomucor* sp.) foram aparentemente potencializadas pelas respectivas atividades surfactantes, e os resultados foram promissores quando ao seu potencial de atividade lipolítica, o que os credencia a futuras pesquisas visando sua utilização como biocatalisadores lipolíticos, como verificado anteriormente por vários autores em relação a fungos filamentosos (NELSON, FOGLIA e MARMER, 1996; FREIRE et al., 1997; JESUS et al., 1999; REETZ, 2002; BARON et al., 2005; CARVALHO et al., 2005; VIEIRA, SILVA e LANGONE, 2006; AZEREDO et al., 2007).

### 5.3 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE RESÍDUOS OLEOSOS DERIVADOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL, COMO INDICADORA DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS

#### 5.3.1 Biodegração aeróbia de resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental, não previamente esterilizados, em um sistema respirométrico estático (SRAN)

Os resultados relativos à análise físico-química do óleo de soja (OS), óleo residual de fritura (OF), espuma de caixa de gordura da ETE-UFES (ECG-ETE) e espuma de caixa de gordura do Restaurante Universitário da UFES (ECG-RU), utilizados nesta etapa, são apresentados na Tabela 12. Os valores para os diferentes parâmetros são próximos aos relatados por alguns autores para resíduos oleosos e óleo de soja (SOUZA, 2003; WUST, 2004; AQUINO, SILVA e CHERNICHARO, 2006).

Tabela 12 - Caracterização físico-química dos resíduos oleosos do saneamento e do óleo de soja comercial (Liza) utilizados nos SRA

<i>Resíduo</i>	<i>Umidade (% m/m)</i>	<i>SV (% m/m)</i>	<i>DQO (g O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>)</i>	<i>DBO (g O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>)</i>	<i><math>\frac{DQO}{DBO}</math></i>	<i>O&amp;G (g.kg<sup>-1</sup>)</i>	<i>pH</i>
<b>OS</b>	2,50	88,11	1435,0	375,0	3,82	721,9	6,88
<b>OF</b>	3,62	89,97	1336,0	380,0	3,51	665,3	3,94
<b>ECG-ETE</b>	89,71	8,60	191,0	82,0	2,33	17,9	5,51
<b>ECG-RU</b>	93,86	4,50	101,9	30,4	3,35	59,5	6,60

A relação DQO:DBO mede o potencial de biodegradabilidade de resíduos orgânicos. De acordo com a Tabela 12, embora somente no caso da ECG-ETE o valor tenha sido próximo a 2,0 (50 % do resíduo com potencial para a biodegradabilidade), os valores para os demais resíduos e para o óleo de soja indicam a viabilidade de utilização da respirometria aeróbia para quantificação da biodegradabilidade.

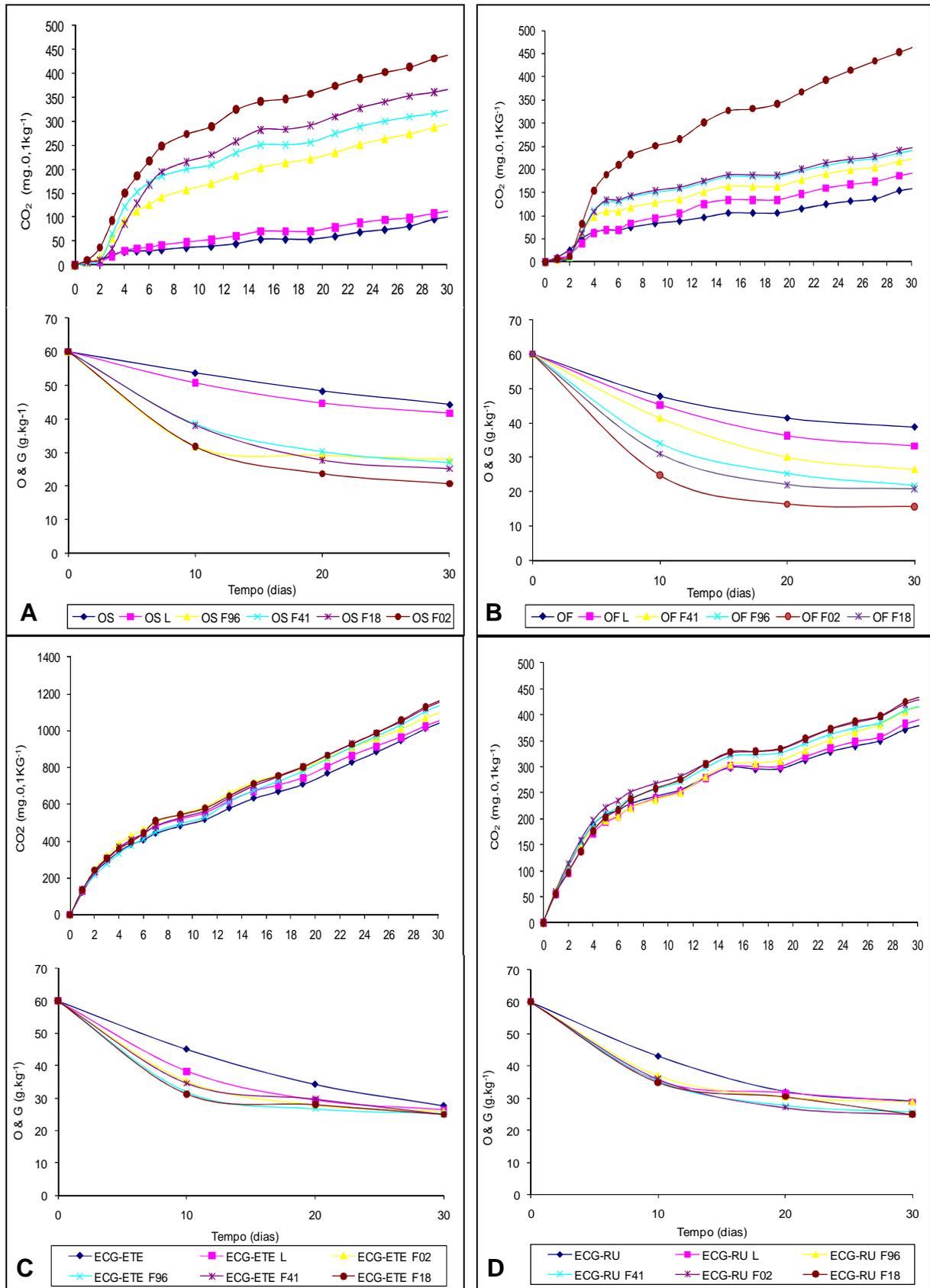


Figura 19 – CO<sub>2</sub> e óleos e graxas (O&G), no SRAN, em escuro a 30±2°C: A) com óleo de soja (OS), B) óleo de fritura (OF), C) ECG-ETE e, D) ECG-RU. Inoculantes: F2 – *Penicillium* sp., F18 – *Rhizomucor* sp., F41 - *Beauveria* sp. e F96 – *Geotrichum* sp.

A Figura 17 mostra os gráficos relativos à evolução, ao longo dos 30 dias experimentais, das produções acumuladas de CO<sub>2</sub> e os correspondentes conteúdos de O&G, em relação a todos os tratamentos analisados no SRAN. Percebe-se, nas curvas de produção de CO<sub>2</sub> para OS e OF (Figura 15: gráficos A e B) que houve um período de aclimação dos inoculantes, de dois a três dias, que é considerado como uma fase de ajuste ou adaptação dos microrganismos ao novo ambiente, de acordo com Alexander (1999), diferente em relação à ECG-ETE e ECG-RU (Figura 15: gráficos C e D), pela considerável população microbiana intrínseca, detectada pela contagem de UFC (Figura 16).

A Figura 18 ilustra as características do crescimento da biomassa fúngica em reatores utilizados nos sistemas respirométricos SRAN (série horizontal de fotos acima) e SRAE (série horizontal de fotos abaixo), nos quais são visualizadas as diferenças entre os tratamentos inoculados com F2 (*Penicillium* sp.) e F18 (*Rhizomucor* sp.), decorridos 30 dias da instalação dos experimentos.

No SRAN, a produção acumulada (30 dias) de CO<sub>2</sub> foi de 103,6 mg.0,1kg<sup>-1</sup> de substrato com OS (controle). As produções de 443,9 (OS F2), 370,6 (OS F18), 328,0 (OS F41) e 300,5 (OS F96) mg .0,1kg<sup>-1</sup> dos respectivos substratos, evidenciam o efeito dos inoculantes fúngicos na biodegradação do óleo de soja (OS), destacando a superioridade de F2 em relação aos demais inoculantes (Tabela 13).

No tratamento com acréscimo somente da lipase comercial (OS L), por sua vez, a biodegradação não destacou-se em relação ao controle (OS), embora estatisticamente diferente (Tabela 13), isto possivelmente devido à dose utilizada da enzima (0,1 µl/ml), que pode ter sido insuficiente para a expressão de sua atividade lipolítica nas condições experimentais e, à esterilidade inerente ao OS, devendo-se a detecção numérica de microrganismos (UFC), provavelmente, à contaminação por manipulação experimental e ou sobrevivência parcial à prévia autoclavagem do substrato-suporte (areia + vermiculita), pela presença de estruturas de resistência dos microrganismos ou insuficiências deste processo de esterilização. Tal fato também foi relatado por outros autores em relação à viabilidade da aplicação do método respirométrico para a determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos ou outros substratos (MELLO et al., 2007; CAMPO et al., 2007).

Resultados com tendências semelhantes verificaram-se em relação aos tratamentos experimentais para avaliação da biodegradação aeróbia do óleo residual de fritura (OF), e podem ser observados na Tabela 13. Ficou evidente o fato de que, no SRAN, a produção acumulada de CO<sub>2</sub> para todos os tratamentos com os inoculantes fúngicos foi superior à daqueles não inoculados, também visualizado nos gráficos apresentados na Figura 17, confirmado pelas diferenças entre as médias (n=3) estatisticamente significativas ( $p = 0,05$ ) entre si, detectadas pelos testes de F e Tukey, apresentados na Tabela 13.

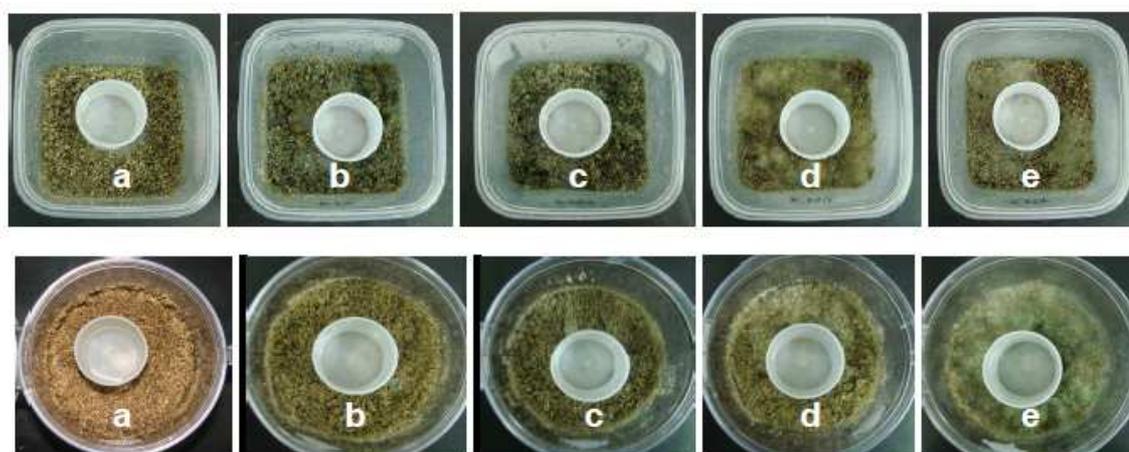
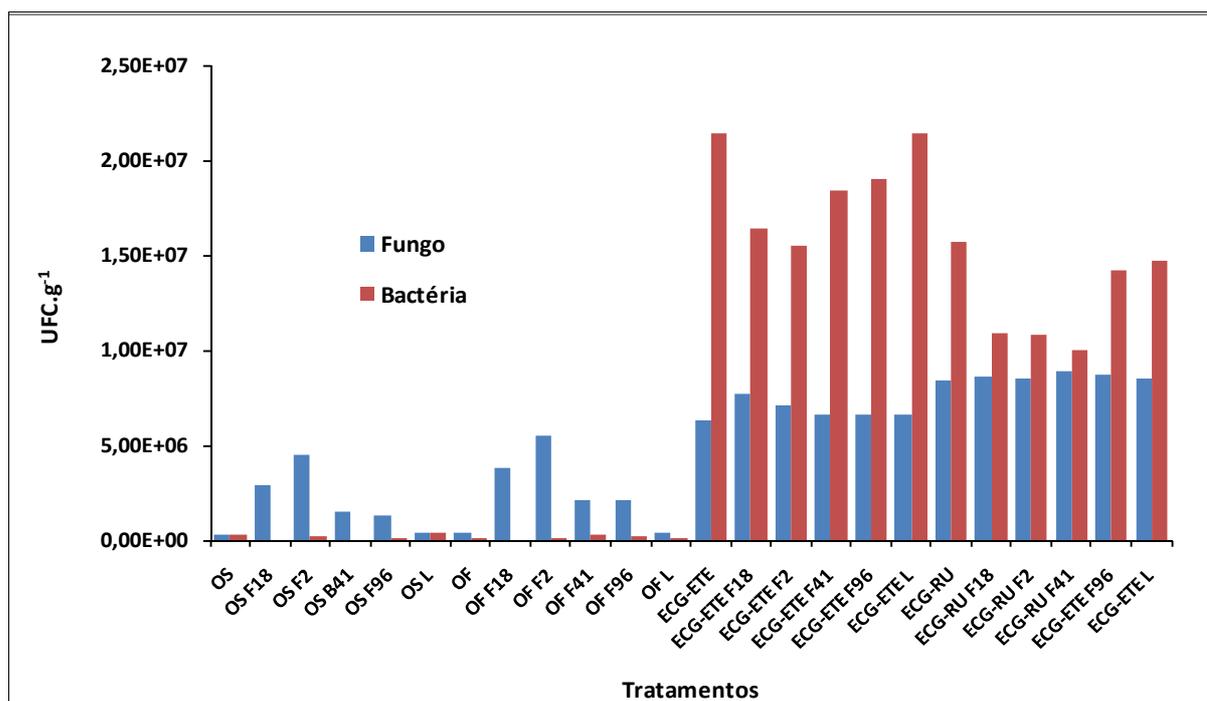


Figura 20 - Reatores dos SRAN ( série horizontal de fotos acima) e SRAE ( série horizontal de fotos abaixo) aos 30 dias de incubação em escuro e  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . No SRAN: a = OS, b = OS F2, c = OF F2, d = ECG-ETE F18, e = ECG-RU F18. No SRAE: a) OS (0 dia), b) OS, c) OS F02, d) OS F18, e) OS F2 F18

Ainda no SRAN, as maiores produções acumuladas de CO<sub>2</sub> foram observadas nos tratamentos em que foi utilizada a ECG-ETE, com comportamento semelhante e aparentando pouco efeito diferencial entre os inoculantes utilizados (Figura 17: gráficos C e D), apesar da diferença estatística constatada entre alguns (Tabela 13). Os valores mínimo e máximo constatados foram de 1066,5 e 1186,2 mg de CO<sub>2</sub>, aos 30 dias. Atribuímos este resultado à biomassa microbiana intrínseca e portanto já adaptada ao mesmo, principalmente bacteriana (Figura 19) e a relação DQO/DBO de 2,33, indicando superior degradabilidade deste resíduo se comparado aos demais (Tabela 12). Quando utilizado a ECG-RU, o comportamento foi parecido com o anterior, porém com menores valores de produção de CO<sub>2</sub> (mínimo de 383,3 e máximo de 439,1 mg). A relação DQO/DBO (3,35), portanto menor biodegradabilidade (Tabela 12), bem como uma menor população microbiana

intrínseca, principalmente bacteriana, comparada à da ECG-ETE, podem explicar estes resultados (Figura 19 e Tabela 13).

A Figura 19 mostra os valores plotados de unidade formadoras de colônias (UFC) de fungos e bactérias totais por g de substrato seco (UFC.g<sup>-1</sup>), aos 30 dias decorridos da instalação do experimento (SRAN).



OS = Óleo de soja; OF = Óleo de fritura; ECG-ETE = Escuma da caixa de gordura da ETE-UFES; ECG-ETE F18 (*Rhizomucor* sp.); ECG-ETE F2 (*Penicillium* sp.); ECG-ETE F41 (*Beauveria bassiana*); ECG-ETE F96 (*Geotrichum candidum*); ECG-ETE L (lipase comercial); ECG-RU = Escuma de caixa de gordura do RU-UFES.

Figura 21 - Unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de substrato seco, acumuladas (30 dias), em um sistema de respirometria aeróbia com substratos oleosos não esterilizados (SRAN), no escuro, a 30 ± 2°C

Os percentuais acumulados (30 dias) de remoção de O&G no SRAN, variaram de 26,16 (OS) a 65,50% (OS F2), de 35,5 (OF) a 74,16% (OF F2), de 53,33 (ECG-ETE) a 58,33% (ECG-ETE F18) e, de 51,66 (ECG-RU) a 58,33% (ECG-RU F18). Os valores limites superiores verificados para os dois últimos resíduos, foram próximos, apesar da superioridade numérica bacteriana nos tratamentos com ECG-ETE, sugerindo que parte desta biomassa pode não ser lipolítica, e a atividade enzimática pode ter sido preponderantemente de fungos, cujos valores numéricos foram superiores nos tratamentos com ECG-RU, ao longo do período experimental.

Tabela 13 - Comparação de médias da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>: mg.0,1kg<sup>-1</sup>), população fúngica (F: UFC. g<sup>-1</sup>), e teor de óleos e graxas (O&G: g.kg<sup>-1</sup>), em três tempos de avaliação da biodegradação aeróbia de óleo de soja (OS), óleo residual de fritura (OF), espuma de caixa de gordura do RU-UFES (ECG-RU) e, espuma de caixa de gordura da ETE-UFES (ECG-ETE), no SRAN

Tratamento	CO <sub>2</sub> (mg.0,1kg <sup>-1</sup> )			O&G (g.kg <sup>-1</sup> )			F (UFC. g <sup>-1</sup> )		
	10 d	20 d	30 d	10 d	20 d	30 d	10 d	20 d	30 d
OS	38,9 f	59,9 f	103,6 f	51,7 c	48,3 d	44,3 e	29 d	35 e	34 d
OS L	52,7 e	78,9 e	114,6 e	50,6 c	44,6 c	41,7 d	32 d	35 e	42 d
OS F2	289,6 a	373,7 a	443,9 a	31,6 a	23,3 a	20,6 a	108 b	330 a	454 a
OS F18	229,9 b	309,0 b	370,6 b	38,0 b	27,6 b	25,1 b	100 c	258 b	287 b
OS F41	209,6 c	273,8 c	328,0 c	38,5 b	30,3 b	27,0 b	129 a	177 c	146 c
OS F96	170,4 d	235,2 d	300,5 d	31,3 a	29,1 b	27,9 bc	128 a	128 d	134 c
OF	88,3 e	114,7 e	162,0 e	47,6 e	41,2 f	38,7 e	33 e	41 d	44 d
OF L	104,6 d	146,6 d	195,0 d	45,3 e	36,3 e	33,3 d	42 d	42 d	45 d
OF F2	265,9 a	367,2 a	473,4 a	24,6 a	16,3 a	15,4 a	165 a	476 a	555 a
OF F18	158,3 b	197,3 bc	244,8 b	31,0 b	22,0 b	20,6 b	111 b	321 b	381 b
OF F41	161,1 b	200,3 b	251,1 b	33,6 c	25,1 c	21,6 b	114 b	214 c	213 c
OF F96	142,3 c	178,1 c	227,5 c	41,4 d	30,0 d	26,3 c	95 c	208 c	206 c
ECG-RU	255,1 b	312,6 d	383,3 c	43,1 b	32,0 a	29,0 b	<u>422 b</u>	<u>850 a</u>	<u>846 a</u>
ECG-RU L	252,5 b	320,0 cd	396,3bc	35,5 a	31,6 a	28,8 b	<u>360 c</u>	<u>827 a</u>	<u>855 a</u>
ECG-RU F2	281,1 a	351,5 a	434,2 a	36,0 a	27,0 a	25,0 a	<u>396 c</u>	<u>849 a</u>	<u>853 a</u>
ECG-RU F18	274,9 a	354,6 a	439,1 a	35,0 a	30,5 a	25,0 a	<u>644 a</u>	<u>860 a</u>	<u>864 a</u>
ECG-RU F41	271,3 a	345,2 ab	421,5ab	35,3 a	27,6 a	25,6 a	<u>300 d</u>	<u>838 a</u>	<u>887 a</u>
ECG-RU F96	252,0 b	332,1 b	420,5ab	37,0 a	30,3 a	28,8 b	<u>288 d</u>	<u>834 a</u>	<u>869 a</u>
ECG-ETE	517,4 c	767,9 c	1066,5c	45,1 d	34,3 b	27,6 a	<u>232 d</u>	<u>676 b</u>	<u>633 c</u>
ECG-ETE L	552,5 b	806,0 b	1073,5c	38,2 c	29,3 ab	26,3 a	<u>240 d</u>	<u>624 c</u>	<u>658 c</u>
ECG-ETE F2	564,1 b	867,1 a	1180,2a	36,0 bc	28,0 ab	26,0 a	<u>333 b</u>	<u>658 bc</u>	<u>715 b</u>
ECG-ETE F18	578,8 a	867,0 a	1186,2a	31,3 a	28,0 ab	25,0 a	<u>646 a</u>	<u>742 a</u>	<u>773 a</u>
ECG-ETE F41	531,5 c	847,9 a	1158,9a	34,0 ab	29,6 ab	25,0 a	<u>275 c</u>	<u>677 b</u>	<u>661 c</u>
ECG- ETE F96	585,9 a	853,9 a	1120,1b	31,9 a	26,6 a	25,3 a	<u>238 d</u>	<u>638 bc</u>	<u>659 c</u>

Médias seguidas por letras diferentes, no sentido vertical, apresentam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey (p=0,05).

Valores sublinhados correspondem à população total de fungos e não somente aos inoculados.

Tabela 14 - Correlações e correspondentes regressões lineares entre a produção acumulada de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>: mg.0,1kg<sup>-1</sup>), a população fúngica (F: UFC. g<sup>-1</sup>), e o conteúdo de óleos e graxas (O&G: g.kg<sup>-1</sup>), em três tempos de avaliação da biodegradação aeróbia de OS (1), OF (2), ECG-RU (3) e, ECG-ETE (4), no SRAN

Correlação	Regressão Linear/Tempo (dias)		
	10	20	30
<b>F X CO<sub>2</sub></b> <b>(1)</b>	y = 0,3772x + 25,8181 R <sup>2</sup> = 0,6833 Valor p = 2,35E-05	y = 0,9094x - 40,8607 R <sup>2</sup> = 0,9227 Valor p = 2,59484E-10	y = 1,04612x - 106,3228 R <sup>2</sup> = 0,8080 Valor p = 4E-07
<b>O&amp;G X CO<sub>2</sub></b> <b>(1)</b>	y = -0,0785x + 53,3368 R <sup>2</sup> = 0,7627 Valor p = 2,22E-06	y = -0,07795x + 51,1918 R <sup>2</sup> = 0,9432 Valor p = 2,18437E-11	y = -0,06861x + 50,1201 R <sup>2</sup> = 0,9778 Valor p = 1,2E-14
<b>O&amp;G X F</b> <b>(1)</b>	y = -0,1794x + 56,1446 R <sup>2</sup> = 0,8249 Valor p = 1,89E-07	y = -0,0754x + 46,0305 R <sup>2</sup> = 0,7909 Valor p = 7,93041E-07	y = -0,0507x + 40,4270 R <sup>2</sup> = 0,7246 Valor p = 7,5E-06
<b>F X CO<sub>2</sub></b> <b>(2)</b>	y = 0,7466x - 20,6729 R <sup>2</sup> = 0,9045 Valor - p = 1,4E-09	y = 1,7355x - 131,1189 R <sup>2</sup> = 0,8312 Valor p = 1,401E-07	y = 1,6160x - 177,5407 R <sup>2</sup> = 0,8020 Valor p = 5,1E-07
<b>O&amp;G X CO<sub>2</sub></b> <b>(2)</b>	y = -0,1312x + 57,4190 R <sup>2</sup> = 0,8255 Valor p = 1,83E-07	y = -0,0917x + 46,9147 R <sup>2</sup> = 0,7508 Valor p = 3,31E-06	y = -0,0632x + 42,4016 R <sup>2</sup> = 0,6472 Valor p = 5,69E-05
<b>O&amp;G X F</b> <b>(2)</b>	y = -0,1744x + 53,6718 R <sup>2</sup> = 0,9000 Valor p = 2,06E-09	y = -0,0528x + 39,9827 R <sup>2</sup> = 0,9025 Valor p = 1,678E-09	y = -0,0397x + 35,6087 R <sup>2</sup> = 0,8334 Valor p = 1,263E-07
<b>F X CO<sub>2</sub></b> <b>(3)</b>	y = 3,1794x - 443,2986 R <sup>2</sup> = 0,1130 Valor - p = 0,172595	y = 0,3605x + 722,2189 R <sup>2</sup> = 0,0514 Valor p = 0,3653	y = 0,3917x - 699,8106 R <sup>2</sup> = 0,1429 Valor p = 0,1219
<b>O&amp;G X CO<sub>2</sub></b> <b>(3)</b>	y = -0,0921x + 61,3712 R <sup>2</sup> = 0,1548 Valor p = 0,106195	y = -0,08514x + 58,5737 R <sup>2</sup> = 0,2539 Valor p = 0,0391518	y = -0,0651x + 54,1380 R <sup>2</sup> = 0,4825 Valor p = 0,001397
<b>O&amp;G X F</b> <b>(3)</b>	y = -0,0007x + 37,2769 R <sup>2</sup> = 0,0008 Valor p = 0,908278	y = -0,0118x + 39,8702 R <sup>2</sup> = 0,0135 Valor p = 0,6461466	y = -0,01644x + 41,2315 R <sup>2</sup> = 0,0330 Valor p = 0,470601
<b>F X CO<sub>2</sub></b> <b>(4)</b>	y = 2,6378x - 1136,5254 R <sup>2</sup> = 0,2007 Valor - p = 0,062223	y = 0,3004x + 418,8462 R <sup>2</sup> = 0,0803 Valor p = 0,2544	y = 0,7470x - 161,2392 R <sup>2</sup> = 0,5997 Valor p = 0,000162
<b>O&amp;G X CO<sub>2</sub></b> <b>(4)</b>	y = -0,1470x + 117,6988 R <sup>2</sup> = 0,5795 Valor p = 0,000243	y = -0,0549x + 75,1755 R <sup>2</sup> = 0,4358 Valor p = 0,0028677	y = -0,0218x + 44,1339 R <sup>2</sup> = 0,4539 Valor p = 0,002171
<b>O&amp;G X F</b> <b>(4)</b>	y = -0,0160x + 41,3582 R <sup>2</sup> = 0,2385 Valor p = 0,039739	y = 0,0051x + 25,9281 R <sup>2</sup> = 0,0042 Valor p = 0,7986824	y = -0,0051x + 25,9281 R <sup>2</sup> = 0,0042 Valor p = 0,7986824
<b>F X CO<sub>2</sub></b> <b>(1)(2)(3)(4)</b>	y = 0,5583x + 67,9519 R <sup>2</sup> = 0,3155 Valor - p = 2,48E-07	y = 0,6720x + 205,0786 R <sup>2</sup> = 0,3434 Valor p = 6,37E-08	y = 0,3066x - 247,7106 R <sup>2</sup> = 0,3066 Valor p = 4,25E-07
<b>O&amp;G X CO<sub>2</sub></b> <b>(1)(2)(3)(4)</b>	y = -0,01595x + 42,2181 R <sup>2</sup> = 0,1671 Valor p = 0,000364	y = -0,0084x + 33,7742 R <sup>2</sup> = 0,1057 Valor p = 0,0053178	y = -0,0084x + 33,7742 R <sup>2</sup> = 0,1057 Valor p = 0,0053178
<b>O&amp;G X F</b> <b>(1)(2)(3)(4)</b>	y = -0,0139x + 40,8350 R <sup>2</sup> = 0,1256 Valor p = 0,002258	y = -0,0084x + 34,3749 R <sup>2</sup> = 0,1370 Valor p = 0,0013702	y = -0,0059x + 30,6433 R <sup>2</sup> = 0,1185 Valor p = 0,00306

Assim sendo, a maior produção de CO<sub>2</sub> verificada pela biodegradação da ECG-ETE, pode ser atribuída à degradação de material orgânico não lipídico, abundante neste tipo de resíduo, pela fração não lipolítica da população microbiana.

As correlações verificadas entre a produção acumulada de CO<sub>2</sub> e o teor de O&G (30 dias), considerando o conjunto de tratamentos para cada resíduo testado, foram as seguintes: OS (R= - 0,98), OF (R= - 0,81 ), ECG-ETE (R= -0,66) e, ECG-RU (R= - 0,61), contribuindo com a assertiva anterior.

Na Tabela 13, além dos valores observados aos 30 dias, encontram-se também os relativos a 10 e 20 dias decorridos do experimento, estatisticamente analisados. Valores maiores obtidos em ECG-ETE e ECG-RU, devem-se à população microbiana intrínseca a estes resíduos, visto que não foram esterilizados previamente.

No caso do OS e OF, apesar de intrinsecamente não terem apresentado microrganismos, sua presença, embora numericamente inferior aos outros dois resíduos, foi constatada, e explicada anteriormente. Nos tratamentos com ECG-ETE prevaleceu, numericamente, população bacteriana, enquanto que naqueles com ECG-RU, fúngica.

Na Tabela 14 encontram-se resultados de correlações entre produção acumulada de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>: mg.0,1kg<sup>-1</sup>), população fúngica (F: UFC. g<sup>-1</sup>), e conteúdo de óleos e graxas (O&G: g.kg<sup>-1</sup>), em três tempos de avaliação da biodegradação aeróbia de óleo de soja (1), óleo residual de fritura (2), espuma de caixa de gordura do RU-UFES (3) e, espuma de caixa de gordura da ETE-UFES (4), no SRAN.

Foram efetuadas análises de regressão linear simples considerando os valores obtidos para os tratamentos com um OGR, e também com a integração dos valores para todos os OGR avaliados, com os respectivos valores de significância ao nível de p=0,95 (Valor-p). De forma geral, foram bons os valores correlacionais positivos ou negativos, em se tratando de tratamentos com OS e OF, confirmados pelos coeficientes de regressão (R<sup>2</sup>) e de significância (Valor-p). Tal não ocorreu em relação aos tratamentos com ECG-RU e ECG-ETE ou, quando integrados.

### 5.3.1 Biodegração aeróbia de óleo de soja comercial e de espuma de uma caixa de gordura do Restaurante Universitário da UFES, previamente esterilizados (SRAE)

Os experimentos de biodegração aeróbia nos quais as fontes oleosas utilizadas, ou seja, o óleo de soja comercial (OS) e a espuma de uma caixa de gordura do Restaurante Universitário da UFES (ECG-UFES) com prévia esterilização por autoclavagem, constituíram-se em um complemento àqueles efetuados através do SRAN. Foram conduzidos através da montagem de um sistema de respirometria aeróbia estatático como o da etapa anterior, com as modificações mencionadas no item 4.3.2, que denominamos abreviadamente de SRAE, para diferenciá-lo do anterior em função da utilização das fontes oleosas com esterilização prévia.

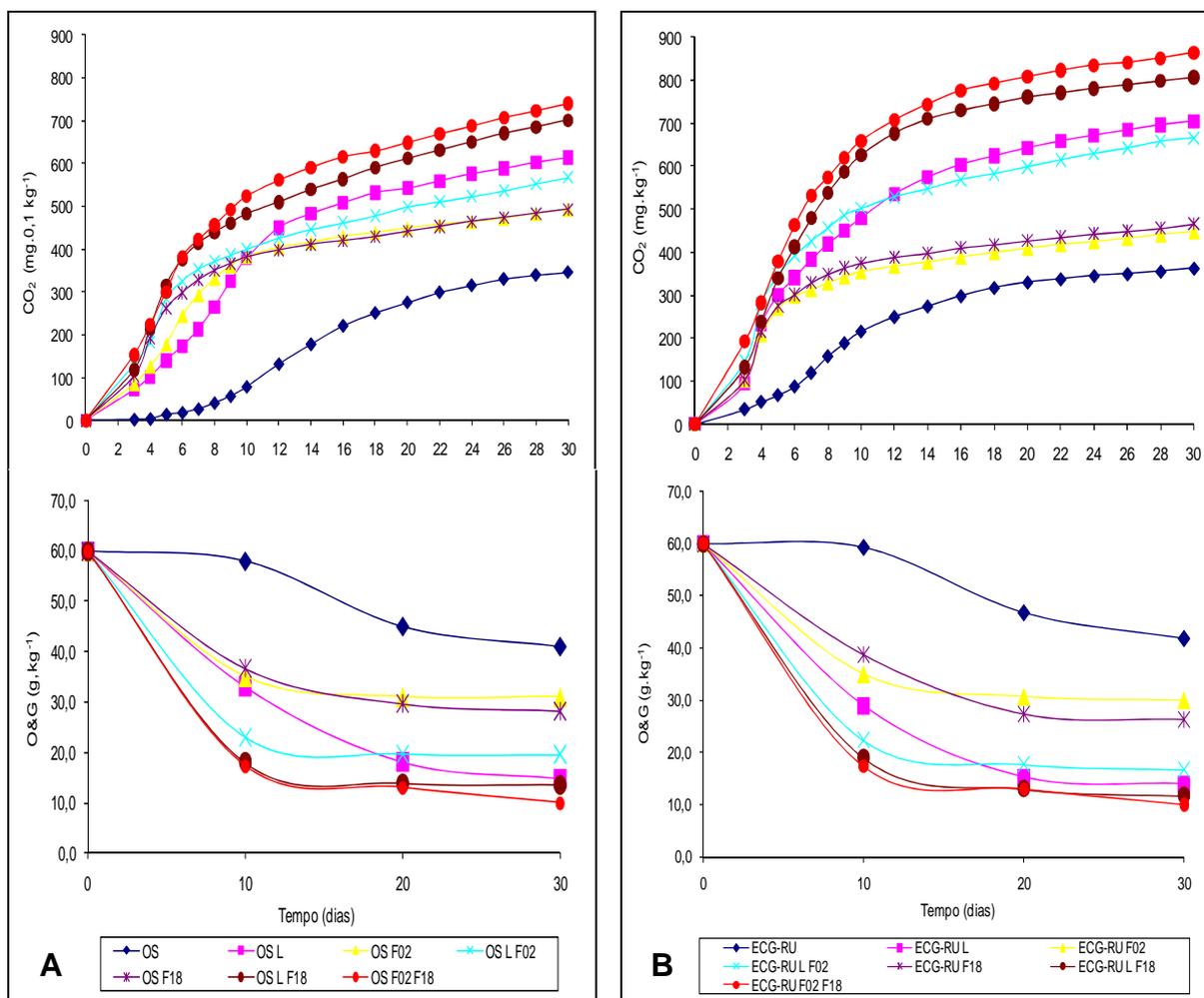


Figura 22 – CO<sub>2</sub> e óleos e graxas (O&G), no SRAE, em escuro a 30±2°C: A) com óleo de soja (OS) e B) espuma de caixa de gordura do Restaurante Universitário (ECG-RU). Inoculantes: F2 (*Penicillium* sp.) e F18 (*Rhizomucor* sp.)

Os resultados obtidos com o SRAE são ilustrados através da Figura 18 (série horizontal de fotos abaixo) e da Figura 20 (gráficos A e B), bem como através das Tabelas 15 e 16.

Verificou-se no SRAE, uma potencialização da biodegradação aeróbia, principalmente notável em relação aos tratamentos nos quais o inóculo foi o isolado F18 com acréscimo da lipase (OS L F18 e ECG-RU L F18), provavelmente por apresentar este isolado elevado nível de atividade lipolítica intracelular, beneficiada pela simplificação dos triglicerídeos presentes no substrato, e de forma inerente, pela atividade biossurfactante constatada e relatada por nós em outro trabalho. Este acréscimo de biodegradação também foi verificado, com valores inferiores, em relação ao isolado F2 e, em relação aos tratamentos com acréscimo de lipase, porém sem inoculação voluntária de fungos ( OS L e ECG-RU L), porém com biomassa fúngica constatada pelas análises das amostras coletadas aos 10, 20 e 30 dias decorridos do experimento. Justifica-se a presença destes como efetuado para o SRAN, porém no caso do SRAE, a potencialização deu-se por conta da elevada dose enzimática utilizada.

Os resultados das análises de regressão reforçam as discussões e assertivas até aqui colocadas em relação ao SRAN.

Além dos substratos autoclavados, a utilização da lipase comercial em dose dez vezes superior à utilizada no SRAN, e de forma também associada aos isolados fúngicos avaliados ( neste caso somente o F2 e o F18); os tratamentos envolvendo o consórcio de F2 com F18 e, finalmente, a quantificação da biomassa fúngica desenvolvida nos substratos, pelo teor de ergosterol avaliado por HPLC, permitiram, através das análises do SRAE, resultados promissores, quanto ao potencial e tipos de atividade lipolítica desenvolvidos. Em função dos mesmos, observou-se a viabilidade de utilização da biodegradação aeróbia de resíduos oleosos do saneamento por fungos produtores de lipases, avaliada por respirometria, funcionando como indicadora de atividade lipolítica e, portanto, contribuindo para a seleção dos mesmos, em acordo com os objetivos propostos neste trabalho.

A superioridade de valores obtidos para as variáveis experimentais, testadas através do SRAE, em relação aos tratamentos em que foram somados os inoculantes F2 e F18 (OS F2 F18 e ECG-RU F2 F18), reforçam nossas afirmações e os resultados anteriormente obtidos, quanto ao potencial e tipo de atividade lipolítica de ambos,

pois indicou, aparentemente, uma complementação entre a atividade lipolítica extracelular de F2 com a intracelular de F18, que superou, inclusive, o efeito da atividade enzimática extracelular conferido pela presença da lipase comercial acrescida aos substratos que também receberam inoculantes fungicos, ou que, de outra forma, permitiram o seu desenvolvimento, em outros tratamentos do SRAE.

Tabela 15 - Comparação de médias (teste de Tuckey) da produção acumulada de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>: mg.0,1kg<sup>-1</sup>), biomassa fúngica (BM: mg. g<sup>-1</sup>), e conteúdo de óleos e graxas (O&G: g.kg<sup>-1</sup>), em três tempos de avaliação da biodegradação aeróbia de óleo de soja (OS) e da espuma de caixa de gordura do RU-UFES (ECG-RU), no SRAE

Tratamento	CO <sub>2</sub> (mg.0,1kg <sup>-1</sup> )			O&G (g.kg <sup>-1</sup> )			BM * (mg.g <sup>-1</sup> )		
	10 d	20 d	30 d	10 d	20 d	30 d	10 d	20 d	30 d
OS	78,2 e	275,4 f	346,0 f	58,0 e	45,0 c	41,0 f	0,57 d	2,14 g	2,70 e
OS L	377,9 d	541,7 c	613,0 c	33,0 c	18,0 a	14,7 b	7,19 b	8,86 c	10,24 b
OS F2	381,4 d	448,1 e	492,0 e	35,0 cd	31,0 b	31,0 e	4,05 c	5,40 f	6,18 c
OS L F2	399,7 c	499,0 d	567,4 d	23,0 b	19,7 a	19,5 c	7,04 b	8,20 d	9,91 b
OS F18	380,8 d	440,8 e	492,3 e	36,7 d	29,7 b	28,3 d	4,37 c	5,92 e	6,14 c
OS L F18	481,9 b	611,0 b	701,2 b	18,0 a	14,0 a	13,7 b	10,02 a	12,46 b	13,30 a
OS F2 F18	523,1 a	648,7 a	740,0 a	17,3 a	13,0 a	10,0 a	10,56 a	12,91 a	13,63 a
ECG-RU	215,5 g	329,7g	362,4 g	59,3 f	46,7c	41,7 f	1,83 d	2,38f	2,81 f
ECG-RU L	479,8 d	642,4c	704,8 c	29,0 c	15,3a	14,0 bc	8,56 b	9,92c	11,55 c
ECG-RU F2	353,9 f	408,2f	446,7 f	35,0 d	30,7b	30,0 e	4,51 c	4,31e	4,70 e
ECG-RU L F2	501,3 c	598,3d	665,8 d	22,3 b	17,7a	16,7 c	8,48 b	9,04d	11,03 d
ECG-RU F18	374,7 e	426,9e	466,0 e	38,7 e	27,3b	26,3 d	4,57 c	4,71e	5,14 e
ECG-RU L F18	626,2 b	760,6b	806,2 b	19,0 ab	13,0a	11,7 ab	12,52 a	13,22b	14,52 b
ECG-RU F2 F18	659,1 a	807,4a	864,0 a	17,3 a	13,0a	10,0 a	12,86 a	14,12a	15,27 a

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey (p=0,05).

\*Conversão a partir das concentrações médias (n=3) de ergosterol por grama de biomassa fúngica seca (mg. g<sup>-1</sup>), para F2: 1,28 (10 dias), 1,57 (20 dias) e 1,49 (30 dias) e, para F18: 1,55 (10 dias), 1,52 (20 dias) e 1,54 (30 dias).

Assim como para os resultados experimentais no SRAN, os valores médios (n=3) obtidos para as variáveis avaliadas e, de acordo como os tratamentos no SRAE, para as três datas de coleta das amostras (10, 20 e 30 dias), estatisticamente avaliadas e comparadas pelo teste de Tukey (p=0,05), encontram-se na Tabela 15.

De forma semelhante também são apresentadas na Tabela 16, as correlações e análises de regressão linear correspondentes, entre produção acumulada de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>: mg.0,1kg<sup>-1</sup>), biomassa fúngica (BM: mg.g<sup>-1</sup>) e conteúdo de óleos e graxas (O&G: g.kg<sup>-1</sup>), da biodegradação aeróbia de óleo de soja (1) e espuma de caixa de gordura do RU-UFES (2), no SRAE.

Tabela 16 - Correlações e regressão lineares correspondentes, entre a produção acumulada de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>: mg.0,1kg<sup>-1</sup>), a biomassa fúngica (BM: mg.g<sup>-1</sup>) e o conteúdo de óleos e graxas (O&G: g.kg<sup>-1</sup>), em três tempos de avaliação da biodegradação aeróbia de OS (1) e ECG-RU (2), no SRAE

Correlação	Regressão Linear/Tempo (dias)		
	10	20	30
<b>BM X CO<sub>2</sub></b> <b>(1)</b>	y = 0,0223x - 2,1276 R <sup>2</sup> = 0,8076 Valor - p = 3,1E-08	y = 0,0305x - 7,1502 R <sup>2</sup> = 0,9583 Valor p = 1,416E-14	y = 0,0295x - -7,7934 R <sup>2</sup> = 0,9744 Valor p = 1,3E-16
<b>O&amp;G X CO<sub>2</sub></b> <b>(1)</b>	y = -0,0943x + 67,0261 R <sup>2</sup> = 0,9061 Valor p = 3,3E-11	y = -0,0904x + 69,068 R <sup>2</sup> = 0,9108 Valor p = 2,002E-11	y = -0,0804x + 68,016 R <sup>2</sup> = 0,9409 Valor p = 3,9E-13
<b>O&amp;G X BM</b> <b>(1)</b>	y = -3,777x + 54,21 R <sup>2</sup> = 0,8956 Valor p = 9E-11	y = -2,8466x + 47,0834 R <sup>2</sup> = 0,8823 Valor p = 2,827E-10	y = -2,6957x + 43,5366 R <sup>2</sup> = 0,9457 Valor p = 1,8E-13
<b>F X BM</b> <b>(1)</b>	y = 34,3099x - 10,4527 R <sup>2</sup> = 0,8478 Valor p = 3,3E-09	y = 48,4598x - 18,084 R <sup>2</sup> = 0,8814 Valor p = 3,053E-10	y = 50,6131x - 41,4243 R <sup>2</sup> = 0,9475 Valor p = 1,3E-13
<b>BM X CO<sub>2</sub></b> <b>(2)</b>	y = 0,02651x - 4,5385 R <sup>2</sup> = 0,9817 Valor - p = 5,6E-18	y = 0,0247x - 5,8245 R <sup>2</sup> = 0,9962 Valor p = 1,581E-24	y = 0,0259x - 6,7213 R <sup>2</sup> = 0,9947 Valor p = 4,3E-23
<b>O&amp;G X CO<sub>2</sub></b> <b>(2)</b>	y = -0,0887x + 72,2207 R <sup>2</sup> = 0,8973 Valor p = 7,7E-11	y = -0,0616x + 58,3736 R <sup>2</sup> = 0,8212 Valor p = 1,558E-08	y = -0,0576x + 57,0316 R <sup>2</sup> = 0,9079 Valor p = 2,7E-11
<b>O&amp;G X BM</b> <b>(2)</b>	y = -3,2031x + 55,9413 R <sup>2</sup> = 0,8374 Valor p = 6,3E-09	y = -2,4709x + 43,7649 R <sup>2</sup> = 0,8141 Valor p = 2,263E-08	y = -2,2143x + 42,0513 R <sup>2</sup> = 0,9078 Valor p = 2,8E-11
<b>F X BM</b> <b>(2)</b>	y = 24,6689x + 67,188 R <sup>2</sup> = 0,7484 Valor p = 4,2E-07	y = 42,1536x + 48,5315 R <sup>2</sup> = 0,9240 Valor p = 4,349E-12	y = 42,8532x + 108,4243 R <sup>2</sup> = 0,9601 Valor p = 9,3E-15
<b>BM X CO<sub>2</sub></b> <b>(1)(2)</b>	y = 0,0239x - 3,0501 R <sup>2</sup> = 0,8983 Valor - p = 1,85E-21	y = 0,0253x - 5,2979 R <sup>2</sup> = 0,9278 Valor p = 1,93E-24	y = 0,0266x - 6,633 R <sup>2</sup> = 0,9695 Valor p = 6E-32
<b>O&amp;G X CO<sub>2</sub></b> <b>(1)(2)</b>	y = -0,0839x + 66,534 R <sup>2</sup> = 0,828 Valor p = 7,07E-17	y = -0,0673x + 59,597 R <sup>2</sup> = 0,8016 Valor p = 1,25E-15	y = -0,064x + 59,822 R <sup>2</sup> = 0,8888 Valor p = 1,1E-20
<b>O&amp;G X BM</b> <b>(1)(2)</b>	y = -3,324x + 54,617 R <sup>2</sup> = 0,8304 Valor p = 5,33E-17	y = -2,6295x + 45,211 R <sup>2</sup> = 0,8421 Valor p = 1,27E-17	y = -2,4046x + 43,886 R <sup>2</sup> = 0,9174 Valor p = 2,84E-23
<b>F X BM</b> <b>(1)(2)</b>	y = 28,984x + 28,585 R <sup>2</sup> = 0,7891 Valor p = 4,24E-15	y = 44,861x + 18,431 R <sup>2</sup> = 0,8972 Valor p = 2,3E-21	y = 45,889x + 81,736 R <sup>2</sup> = 0,9477 Valor p = 3,03E-27

De forma geral foram fortes os valores correlacionais positivos e negativos observados, expressos pelo coeficiente de regressão ( $R^2$ ), assim como significativas as diferenças expressas pelos modelos de regressão linear, para o nível de probabilidade adotado ( $p=0,05$ ), de acordo com os valores-p, obtidos, para os tratamentos analisados por cada substrato oleoso, quanto para a análise dos valores integrados dos mesmos.

Nota-se, na Tabela 16, que os resultados das correlações entre os valores obtidos para biomassa fúngica (BM), via quantificação do ergosterol através de HPLC, e aqueles obtidos por contagem de UFC, foram positivos e fortes, o que valida este último procedimento no caso do SRAN, no qual a população fúngica foi, somente, numericamente quantificada por contagem de colônias. Correlações positivas semelhantes foram obtidas por Montgomery et al. (2000) e Castro et.al. (2001).

Os resultados ora obtidos confirmam os anteriores, acerca do potencial de produção de lipases e ou atividade lipolítica dos isolados fúngicos F2 (*Penicillium* sp.) e F18 (*Rhizomucor* sp.), e a viabilidade da biodegradação aeróbia de óleos e graxas residuais do saneamento, quantificada por respirometria, como indicadora confiável da atividade lipolítica de fungos, conforme verificado anteriormente para bactérias por Lima Jr. (2009), quando se quantifica, concomitantemente, a remoção de óleos e graxas do resíduo e a produção de biomassa pelo fungo. No caso desta última, sua determinação a partir da quantificação do ergosterol produzido pela biomassa, via HPLC, corroborou para a uma melhor consistência dos resultados, e reiterou a utilidade do método para a quantificação de biomassa fúngica desenvolvida em solo ou substratos sólidos, como observado por Montgomery et al. (2000).

A combinação lipases de duas ou mais fontes microbianas tem sido sugerida no sentido de reduzir custos e otimizar o processo de transesterificação, como no caso de lipases de *Candida antarctica* e *Thermomyces lanuginosa* (LI et al., 2008) e, de *Rhizopus oryzae* e *Candida rugosa* (LEE, FOGLIA e CHANG, 2002). Em função dos resultados obtidos na presente pesquisa e destes relatos, é razoável aventar a possibilidade de, em pesquisas futuras, avaliar-se o consórcio de células integrais dos isolados fúngicos F2 (*Penicillium* sp.) e F18 (*Rhizomucor* sp.), combinando desta forma as atividades lipolíticas de ambos em um mesmo biorreator, em escala piloto.

É importante observar, com base em vários trabalhos de pesquisa (ANTCSAK et al., 2009; DABDOUB, BRONZEL e RAMPIN, 2009; FJERBAEK, CHRISTENSEN e

NORDDAHL, 2009; LEUNG et al., 2010; BISEN et al., 2010; GHALY et al., 2010) que para transesterificar, como pretende nosso grupo de pesquisadores (Laboratório de Saneamento, UFES), óleos e graxas obtidos a partir de resíduos oleosos do saneamento ambiental é necessário realizar uma série de estudos, além daqueles para a obtenção do biocatalisador em si. Pesquisas que resultem na melhoria da velocidade de reação, reduzindo o tempo de transesterificação e fornecendo os produtos em rendimentos mais altos, com transformações mais eficientes, de forma a possibilitar aplicações em escala real e competitivas, conforme Dabdoub, Bronzel e Rampin (2009) e Fukuda, Kondo e Tamalampudi (2009).

## 6 CONCLUSÕES

- Os meios de cultura MB MMOS<sub>R</sub> permitiram a detecção das atividades lipolíticas extra e intracelulares dos isolados fúngicos avaliados, de forma simples, rápida e eficiente. A utilização conjunta evitou escapes no processo de isolamento a partir das amostras ambientais eleitas como fontes microbianas lipolíticas, em função da prevalência das atividades lipolíticas extra e intracelulares manifestadas.
- A atividade lipolítica específica avaliada a partir de processos de fermentação em estado líquido (FEL) e sólido (FES), utilizando como fonte exclusiva de carbono o óleo de soja comercial (10% no substrato), foi um bom parâmetro para a atividade lipolítica extracelular dos isolados fúngicos avaliados, permitindo satisfatória seleção.
- A atividade biossurfactante detectada para os isolados F2 (*Penicillium* sp.) e F18 (*Rhizomucor* sp.), simultaneamente à atividade lipolítica, pareceu contribuir com a capacidade lipolítica de ambos, mas de forma mais significativa em relação ao F18. No FES observou-se para estes isolados fúngicos progressivo e elevado percentual de remoção (consumo) de óleos e graxas (óleo de soja) ao longo de 120 h, cuja correlação estatística, considerado o F18, foi alta e positiva em relação à produção de biomassa e, ausente em relação à atividade lipolítica específica.
- Os resultados afirmaram a biodegradação aeróbia de óleos e graxas residuais do saneamento, analisada através de respirometria, como indicadora da atividade lipolítica de fungos filamentosos, nas condições de condução do experimento, com as simultâneas quantificações do conteúdo de óleos e graxas e da produção de biomassa fúngica, estatisticamente avaliadas.
- O isolado fúngico F2 superou todos os demais avaliados quanto a atividade lipolítica específica (extracelular) diretamente quantificada, o mesmo ocorrendo em relação ao isolado F18 quanto à atividade lipolítica intracelular, indiretamente deduzida pelo potencial apresentado para a remoção (consumo) de óleos e graxas. Tanto no FES, quanto nos SRA, o elevado potencial para remoção de óleos e graxas destes isolados os credencia à avaliação em futuras pesquisas, como biocatalisadores lipolíticos para hidrólise e, possivelmente, transesterificação biocatalítica de óleos e graxas (OGR) do saneamento ambiental.

## 7 TRABALHOS FUTUROS

Em linhas gerais, três fatores apresentam potencial para reduzir significativamente o tempo de reação e os custos, e para aumentar o rendimento do processo reacional com a utilização de biocatalisador lipolítico fúngico de célula integral: a) as características do fungo, b) as condições de cultivo e imobilização do fungo e; c) o modelo do reator e as condições reacionais; de acordo com os propósitos do nosso grupo de pesquisadores. Assim considerando e, diante dos resultados obtidos com o presente trabalho, resta-nos a sugestão de pontos que entendemos importantes e norteadores de futuras pesquisas dentro desta linha de trabalho:

- Produção de lipases por F2 (*Penicillium* sp.) e F18 (*Rhizomucor* sp.) em processo de fermentação em estado sólido (FEL), em biorreator piloto;
- Estudos para a imobilização de F2 e F18, incluindo suportes para a mesma, de forma a contemplar a eficiência, o tempo de obtenção e o custo.
- Estudos de resíduos agro-industriais e domésticos, como substratos a serem utilizados no FEL, visando a minimização dos custos de produção de lipases;
- Purificação e estudo das características bioquímicas das lipases contidas no sólido fermentado no FEL;
- Estudos do tipo morfológico da estrutura fúngica a ser utilizada (célula suspensa, micélio em pellet, micélio) como inóculo, visando o incremento da produção de lipases em menor tempo de reação;
- Avaliação, em um mesmo biorreator, da eficiência do consórcio dos isolados fúngicos F2 e F18.

## 8 REFERÊNCIAS

ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n.7, p. 968-975, 2002.

ABIOVE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ÓLEOS VEGETAIS. São Paulo. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br>>. Acesso em: 05 fev. 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT), NBR.14283. Resíduos em solos – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999.

ACUNA-ARGUELES, M.E.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 808-814, 1995.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1347-1361, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução nº 42. Disponível em: <<http://www.158icr://www.anp.org.br>>. Acesso em: 13 jan. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GAS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis/Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Rio de Janeiro: ANP, 2010.

AKOH, C.C; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995-9005, 2007.

AL-ARAJI, L.; RAHMAN, R.N.A.R.A.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. Microbial surfactant. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 99-105, 2007.

ALBERTON, D. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios**. Curitiba: UFPR, 2009. (Tese de Doutorado em Bioquímica).

ALBERTON, D.; MITCHELL, D.A.; CORDOVA, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 28-35, 2010.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. New York: New York, 1994.

ALFORD, J.A.; PIERCE, D.A.; SUGGS, F.G. Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides. **Journal of Lipid Research**, v. 5, p. 390-394, 1964.

AMARAL, P.F.F. **Produção de lipases de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico**. Rio de Janeiro: 2007. (Tese de Doutorado em Ciências).

AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. Disponível em: <<http://www.landesbioscience.com/curiechapter4154>>. Acesso em: 27 abr. 2010.

ANDRETTA, L.I.; DAMSCHI JUNIOR; ONOFRE, S.B. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases de águas residuárias de laticínios. **Biology and Health Journal**, v.1, n.1, p. 77-84, 2007.

ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

AQUINO, S.F.; SILVA, S.Q.; CHERNICHARO, C.A.L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química (DQO) aplicado à análise de efluentes anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 2, n. 4, p. 295-304, 2006.

ARPIGNY, J.L.; JAEGER, K. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343, p. 177-183, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 14238: **Resíduos em solos – determinação da biodegradação pelo método respirométrico**. Rio de Janeiro, 1999.

ATKINSON, B.; BLACK, G. M.; LEWIS, P. J. S.; PINCHES, A. Biological particles of given size, shape, and density for use in biological reactors. **Biotechnology Bioengineering**, v. 21, n. 2, p. 193-200, 1979.

AZBAR, N.; YONAR, T. Comparative evaluation of a laboratory and full-scale treatment alternatives for the vegetable oil refining industry wastewater (VORW). **Process Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 869-875, 2004.

AZEREDO, L.A.I.; GOMES, P.M.; SANT'ANNA Jr., G.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 361-365, 2007.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P.N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2010.

BALAJI, V.; EBENEZER, P. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 7, p. 1-8, 2008.

BAN, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, n. 1, p. 39-43, 2001.

BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 157-165, 2002.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1995.

BARNET, H.C.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. New York: Burgess Publishing, 1986.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast, characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

BARON, A. M.; INEZ, M.; SARQUIS, M.; BAILGORI, 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.

BARON, A.M. **Preparação e caracterização de lípases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Curitiba: UFPR, 2008. (Tese de Doutorado em Química).

BARROS, A. A. C.; WUST, E.; MEIER, H. F. Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 255-262, 2008.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and methods for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v.100, n.1, p. 68-70, 1965.

BATISTA, S. B. **Bactérias de ambientes contaminados com petróleo ou derivados produtoras de surfactantes e emulsificantes**. Viçosa: UFV, 2002. (Dissertação Mestrado em Microbiologia Agrícola).

BECKER, P.; KOSTER, D.; POPOV, M. N.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN G.; MARKL, H. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. **Water Research**, v. 33, n. 3, p. 653-660, 1999.

BELO, M.O.M. **Degradação hidrolítica dos concentrados obtidos pelo processo de flotação de efluente da indústria láctea**. Recife: UCP, 2009. (Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais).

BERNARDES, O.L.; BEVILAQUA, J.V.; LEAL, M.C.M.R.; FREIRE, D.M.G.; LANGONE, M.A.P. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, n. 1-12, p. 105-114, 2007.

BERTO, P.; COMMÉNIL, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. **FEMS Microbiology Letters**, v.180, p. 183-189, 1999.

BISEN, P.S.; SANODIYA, B.S.; THAKUR, G.S.; BAGHEL, R.K.; PRASAD, G.B.K.S. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1019-1030, 2010.

BORGES, N.B. **Caracterização e pré-tratamento de lodo de fossas e de tanques sépticos**. São Carlos: EESC-USP, 2009. (Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Saneamento).

BORJA, R.; BANKS, C.J.; GARRIDO, A. Kinetics of black-oliver waste water treatment by the activated sludge system. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 7, p. 587-593, 1994.

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, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BUENO, T. **Obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja**. Lorena: Faculdade de Engenharia Química, 2005. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química).

BUENO, S.M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. São José do Rio Preto: UNESP, 2008. (Tese de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos).

CÂMARA, G.M.S. Biodiesel Brasil – Estado Atual da Arte. 2006. Disponível em: <[http://www.cib.org.br/pdf/biodiesel\\_brasil.pdf](http://www.cib.org.br/pdf/biodiesel_brasil.pdf)>. Acesso em: 27 jan. 2010.

CAMARGO-DE-MORAIS, M.M; RAMOS, S.A.F.; PIMENTEL, M.C.B.; MORAIS Jr., M.A.; LIMA FILHO, J.L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 191-194, 2003.

CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, G.A.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 19, p. 1591-1595, 2001.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2195–2210, 2006.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520-529, 1998.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262–266, 2004.

CAMPO, P.; ZHAO, Y; SUIDAN, M.T.; VENOSA, A.D.; SORIAL, G.A. Biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil triacylglycerols under aerobic conditions. **Chemosphere**, v. 68, n. 11, p. 2054–2062, 2007.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v. 44, n. 6, p. 1429-1436, 2001.

CANAKCI, M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 183-190, 2007.

CANAKCI, M.; ÖZSEZEN, N. Evaluating waste cooking oils as alternative diesel fuel. **Journal of Science**, v. 18, n.1, p. 81-91, 2005.

CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V., VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 2-3, p. 145-154, 2001 a.

CARDENAS, F.; ALVARES, E.; CASTRO-ALVAREZ, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W; SINISTERRA, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, n. 4-6, p. 111-123, 2001 b.

CARLI, I.C. **Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lipases imobilizadas em suporte sólido**. Blumenau: FURB, 2006. (Dissertação de Mestrado em Química).

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

CASSINI, S.T.A; RODRIGUES, C.; LIMA JR.; A.F.; TSUKAMOTO, J.; CHAGAS, R.C. Isolamento, seleção e caracterização de microrganismos lipolíticos visando sua utilização em processos de geração de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 3, 2009, Brasília. **Anais...**Brasília: RBTB/MCT, pp. 533-534, 2009 a.

CASSINI, S.T.A; RODRIGUES, C.; LIMA JR.; A.F.; TSUKAMOTO, J.; GONÇALVES, R.F. Seleção de microrganismos com potencial para a geração de biodiesel através da atividade lipolítica específica em meio de cultura líquido. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 3, 2009, Brasília. **Anais...**Brasília: RBTB/MCT, pp. 597-598, 2009 b.

CASSINI, S.T.A; RODRIGUES, C.; LIMA JR.; A.F.; TSUKAMOTO, J.; GONÇALVES, R.F. Avaliação da biodegradabilidade aeróbia de resíduos oleosos do saneamento para a geração de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 3, 2009, Brasília. **Anais...**Brasília: RBTB/MCT, pp. 411-412, 2009 c.

CASSINI, S.T.A; RODRIGUES, C.; LIMA JR.; ANTUNES, P.W.P; PINOTTI, L.M.; CHAGAS, R.C.; GONÇALVES, R.F. Atividade lipolítica e produção de biossurfactante em fungos visando hidrólise e transesterificação biocatalítica de Óleos e Graxas Residuais (OGR). In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 4, e CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS e BIODIESEL, 7, 2010, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: RBTB/MCT, vol. 1, pp. 397-398, 2010 a.

CASSINI, S.T.A; RODRIGUES, C.; LIMA JR.; ANTUNES, P.W.P; PINOTTI, L.M.; CHAGAS, R.C.; GONÇALVES, R.F. Biodegradação aeróbia de óleo de soja e espuma de caixa de gordura como indicadores de atividade lipolítica em isolados de fungos filamentosos. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 4, e CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS e BIODIESEL, 7, 2010, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: RBTB/MCT, vol. 3, pp. 1239-1240, 2010 b.

CASTIGLIONE, G.L. **Modelagem e simulação da produção de biossurfactante e lipase por fermentação em estado sólido**. Rio Grande: 2006. (Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).

CASTIGLIONI, G.L.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 292-295, 2009.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA JR.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

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

CASTRO, M.F.P.M.; BRAGAGNOLO, N.; LEITÃO, M.F.F.; MOLINA, C.V.; ALVES, A.B. Determinação de ergosterol, por CLAE, em milho em grãos com diferentes níveis de contaminação fúngica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, p. 49-55, 2001.

CASSIDY, D. P.; HUDAK, A. J. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 84, n. 2-3, p. 253-264, 2001.

CAVALCANTI, E.D.C; GUTARRA, M.L.E.G.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANNA JÚNIOR, G.L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. spe, p.79-84, 2005.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Reatores Anaeróbios**, v. 5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/UFMG, 1997.

CHHETRI, A.B.; WATTS, K.C.; ISLAM, M.R. Waste cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production. **Energies**, v.1, p. 3-18, 2008.

CHO, H-Y.; BANCERZ, R.; GINALSKA, G.; LEONOWICZ, A.; CHO, N-S; OHGA, S. Culture conditions of psychrotrophic fungus, *Penicillium chrysogenum* and its lipase characteristics. **Journal of the Faculty of Agriculture**, v. 52, n. 2, p. 281-286, 2007.

CHRISTAKOPOULOS, P.; TZIA, C.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p.194-197,1992.

CHRISTOFF, P. **Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial. Estudo de caso: Guaratuba, litoral paranaense**. Curitiba: LATEC/IEC, 2006. (Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento e Tecnologia).

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 915-929, 2002.

COCA, J.; DUSTET, J.C. Expression and characterization of lipase produced by *Mucor griseocyanus*. **Biotecnologia Aplicada**, v. 23, p. 224-228, 2006.

COELHO, M.A.A. **Aproveitamento de resíduo de pó de fumo e sebo bovino para produção de lípase de *Aspergillus 166* USP 898 por fermentação em fase sólida**. Santa Cruz do Sul: UNISC, 2009. (Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental).

COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v.13, p. 85-103, 2003.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Belo Horizonte: UFMG, 2006. (Tese de Doutorado).

CONAMA 357 – Conselho Nacional de Meio Ambiente, Legislação Ambiental Federal, Resolução nº 357, 2005. Disponível em: <<http://www.166ic.mma.gov.br/conama/>>. Acesso em: 12 jul. 2008.

COSTA, A.G.; FERREIRA, A.F.; VAN HAANDEL, A. Monitoramento da atividade bacteriana de um sistema de lodos ativados bardenpho por meio da respirometria. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 17-23, 2007.

COSTA NETO, P.R. **Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja**. Florianópolis: UFSC, 2002. (Tese de Doutorado em Química).

COSTA NETO, P.R.; ROSSI, L.F.S.; ZAGONEL, G.F.; RAMOS, L.P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L.; RAMPIN, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DALLA-VECCHIA, R. **Imobilização de lípases em materiais poliméricos: aplicações na síntese de ésteres**. Florianópolis: UFSC, 2004. (Tese de doutorado em Química).

DALSENTER, F.D.H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido**. Curitiba: UFPR, 2005. (Tese de Doutorado em Ciências-Bioquímica).

DAMASCENO, F.R.C.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Impact of the addition of an enzyme pool on an activated sludge system treating dairy wastewater under fat shock loads. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 730-738, 2008.

DAMASO, M.C.T.; PASSIANOTO, M.A.; FREITAS, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LAGO, R.C.A; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 676-681, 2008.

D' ANNIBALE, A.; BROZZOLI, V.; CROGNALE, S.; GALLO, A.M.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Optimisation by response surface methodology of fungal lipase production on olive mill wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 9, p. 1586-1593, 2006.

DARTORA, D.F.; HENDGESI, D.H.; SANAGALETTI, N.; CADORIN, T.L.; ALENCAR, S.M.; ONOFRE, S.B. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipases a partir do soro de queijo. Disponível em: <[http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos\\_completos/t165.doc](http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t165.doc)>. Acesso em: 22 abr. 2009.

DE MARIA, P.D.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; ALCANTARA, A.R. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p.180-196, 2006.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms:new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 6, p. 641-646, 2004.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DIYOROV, J.K.; LUSTA, K.A.; TSIOMENKO, A.B.; KULAEV, I.S. Molecular forms of lipases and their localization in the fungus *Rhizopus microsporus* by immune-electron microscopy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 367-373, 1994.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p.1274-1278, 2008.

DOMÍNGUEZ, A.; DEIVE, F.J.; SANROMÁN, M.A.; LONGO, M.A. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 11, p. 1166-1170, 2003.

DOMSCH, K.H., GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**, v.1. London, UK: Academic Press. 1980.

DORS, G. **Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas**. Florianópolis: UFSC, 2006. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química).

DUFRECHE, S.; HERNANDEZ, R.; FRENCH, T.; SPARKS, D.; ZAPPI, M., ALLEY, E. Extraction of lipids from municipal wastewater plant microorganisms for production of biodiesel. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 2, p. 181–187, 2007.

DURLI, E. **Tratamento de efluentes de industria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11**. Curitiba: UFPR, 2007. (Dissertação de Mestrado em Química Orgânica).

DUTRA, J.C.V. **Produção de lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14 através de fermentação em estado sólido para síntese de biodiesel**. Rio de Janeiro: UERJ/IQ, 2007. (Tese de Mestrado em Engenharia Química).

DUTRA, J.C.V.; TERZI, S.C.; BEVILAQUA, J.V.; DAMASO, M.C.T.; COURI, S.; LANGONE, M.A.P.; SENNA, L.F. Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, n.1, p. 63-75, 2008.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wasterwater**. 19<sup>a</sup> ed. Whashington: APHA/AWWA/WEF, 1995.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A.T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 525–528, 2004.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes** Kew: Survey Commonhealth Mycological Institute, 1976.

ELLIS, D.H. Zygomycetes. In: TOPLEY & WILSON'S (org.) **Microbiology and microbial infections**. 9ª ed. London: Edward Arnold London, 1997, pp. 247-277.

EL-MASRY, M.H.; EL- BESTAWY, E.; EL-ADL, N.I. Bioremediation of vegetable oil and grease from polluted wastewater using a sand biofilm system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n. 6, p. 551-557, 2004.

ENWEREMADU, C.C.; MBARAWA, M.M. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, n. 9, p. 2205-2224, 2009.

FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. Erechim: URI, 2004. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos).

FALONY, G.; ARMAS, J.C.; MENDOZA, J.C.D.; HERNÁNDEZ, J.L.M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 235-240, 2006.

FEITOSA, J.; PIMENTEL, I.C.; BEUX, M.R.; DALKE, C.R.; PASTRO, F.Z.; TALAMINI, A. Isolamento de microrganismos degradadores de compostos lipídicos de origem vegetal em amostras de águas da barragem do Rio Passaúna-Araucária, PR. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 41-48, 2003.

FELIZARDO, P.; CORREIA, M.J.N.; RAPOSO, I.; MENDES, J.F.; BERKEMEIER, R.; BORDADO, J.M. Production of biodiesel from waste frying oils. **Waste Management**, v. 26, n. 5, p. 487-494, 2006.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Curitiba: UFPR, 2007. (Tese de Doutorado em Química).

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, n. 1, p. 8-13, 2007.

FERRAREZO, E.M. **Isolamento e seleção de microrganismos produtores de emulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão**. Campinas: UNICAMP, 1998. (Tese de Mestrado em Ciências de Alimentos).

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja - taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

FIEBIG, R.; SCHULZE, D.; CHUNG, J.C.; LEE, S. T. Biodegradation of biphenyls (PCBs) in the presence of a bioemulsifier produced on sunflower oil. **Biodegradation**, v. 8, n. 2, p. 67-75, 1997.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 208-217, 1992.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p 2091-2099, 2008.

FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BON, E.P.S; SANT'ANNA JR.; G.L. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n.1, p. 6-12, 1997.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

FUKUDA, H.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NODA, H. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. **Trends Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 668-673, 2008.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 2-12, 2009.

GALLERT, C; WINTER, J. Bacterial metabolism in wastewater treatment systems. In: JÖRDENING, H; WINTER, J. (edt.) **Environmental biotechnology. Concepts and applications**, 2005.

GHALY, A.E.; DAVE, D.; BROOKS, M.S.; BUDGE, S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 54-76, 2010.

GANDHI, N.N. Application of lipases. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 621-634, 1997.

GOLDBECK, R. **Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres**. Campinas: UNICAMP, 2008. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos).

GOMES, L.F.S. **Potencial de produção de biodiesel a partir do óleo de frango nas cooperativas do oeste do Paraná**. Cascavel: UNIOESTE, 2005. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola).

GOMES, P.M.; FREIRE, D.M.G. Processo de produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Disponível em: <<http://www.gctbio.com.br/documentos/artigos/processo-de-producao.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2010.

GONÇALVES, F.A.G. **Produção de lipase extracelular por levedura em cultivo submerso**. Belo Horizonte: UFMG, 2007. (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos).

GOUVEIA, E.R.; LIMA, D.P.A.; DUARTE, M.S.; SOUZA LIMA, G.M.; ARAÚJO, J.M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 39-45, 2003.

GRAMPONE, M. A. Propriedades dos óleos vegetais modificados por hidrogenação, interesterificação e fracionamento. **Óleos & Grãos**, v. 15, p. 5-9, 1993.

GUEHI, T.S.; DINGKUHN, M.; CROS, E.; FOURNY, G.; RATOMAHENINA, R.; MOULIN, G.; VIDAL, A.C. Identification and lipase-producing abilities of moulds isolated from Ivorian Raw Cocoa Beans. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 6, p.838-843, 2007.

GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A.K.; PARMAR, V.S.; SAXENA, R.K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 251-262, 2005.

GUNASEKARAN, V.; DAS, D. Lipase fermentation: progress and prospects. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 477-445, 2005.

GUPTA, R.; GUPTA, N; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L. **Lipid biochemistry: an introduction**. 4 ed. London: Chapman e Hall, 1996.

GUTARRA, M.L.E.; LIMA, T.M.L.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. Influence of inoculums conditions on lipase production by *Penicillium simplicissimum* in solid-state fermentation. Disponível em: <[http://www.ic.enpromer2005.eq.ufrj.br/nukleo/pdfs0910\\_trabalho\\_empromer\\_2005](http://www.ic.enpromer2005.eq.ufrj.br/nukleo/pdfs0910_trabalho_empromer_2005)>. Acesso em: 17 set. 2010.

HABA, E.; BRESCO, O.; FERRER, C.; MARQUES, A.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Isolation of lipase-screening bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, p. 40-44, 2000 a.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 379-387, 2000 b.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. I. Lipases from yeasts (Review). **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 2, p. 159-167, 1991.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 3, p. 273-278, 2007.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 328–333. 2006.

HANKIN, L. AND ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009.

HASKINS, R. H. Biochemistry of the Ustilaginales: I. Preliminary cultural studies of *Ustilago zaeae*. **Canadian Journal of Research**, v. 28, p. 213–223, 1950.

HASKINS, R. H.; THORN, J. A.; BOOTHROYD, B. Biochemistry of the Ustilaginales: XI. Metabolic products of *Ustilago zaeae* in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 749–756, 1955.

HAWKSWORTH, D.L.; SUTTON, B.C; AINSWORTH, G.C. **Dictionary of the fungi**, 7 ed. England: Commonwealth Mycological Institute, 1983.

HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 9, p. 637-642, 1988.

HEWALD, S.; JOSEPHS, K.; BOLKER. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3033–3040, 2005.

HOCEVAR L. Biocombustível de óleos e gorduras residuais, a realidade do sonho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2, 2005, Varginha. **Anais...**Lavras: UFLA, 2005.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

HOU, C. T.; JOHNSTON, T.M. Screening of lipase activities with cultures from the Agricultural Research Service Culture Collection. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 11, p.1088-1097, 1992.

IFTIKHAR, T.; HUSSAIN, A. Effects of nutrients on the extracellular lipase production by mutant strain of *Rhizopus oligosporus* T<sup>UV</sup>-31. **Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 15-20, 2002.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; AFZAL, M.; HAQ, I.; RAJOKA, M.I. Maximization of intracellular lipase production in a lipase-overproducing mutant derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: a kinetic study. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 402-412, 2008.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ZIA, M.A.; ul HAQ, I. Production of extracellular lipases by *Rhizopus oligosporus* in a stirred fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1124-1132, 2010.

IONITA, A.; MOSCOVICI, M.; POPA, C.; VAMANU, A.; POPA, O.; DINU, L. Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potencial and determination of some biochemical properties of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, n. 1-4, p.147-151, 1997.

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 530-535, 2002.

JACOBUCCI, D.F.C.; ORIANI, M.R.G.; DURRANT, L.R. Reducing COD level on oily effluent by utilizing biosurfactant-producing bacteria. **Brasilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 1037-1042, 2009.

JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K-E., DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology** 53, pp. 315-351, 1999.

JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Review**, v. 151, n.1, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K-E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JATTA, B.; GUNASEKARAN, M.; MOHAN, N. Influence of cultural conditions on lipase production in *Candida albicans*. **Asian Journal of Biotechnology**, v.1, n. 3, p. 118-123, 2009.

JAYAPRAKASH, A.; EBENEZER, P. Investigation on extracellular lipase production by *Aspergillus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*. **Indian Journal of Science and Technology**, v..3, n. 2, p. 113-117, 2010.

JESUS, M.F.C.P.; BRANCO, R.N.; SANT'ANNA JR., G.L.; FREIRE, D.M.G.; SILVA JR, J.G. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p.113-118, 1999.

JETTE, J.F.; ZIOMEK, E. Determination of lipase activity a rhodamine-triglyceride-agarose assay. **Analytical Biochemistry**, v. 219, n. 2, p. 256-260, 1994.

JIN, G.; BIERMA, T.J. Whole-cell biocatalysts for producing biodiesel from waste greases. **ISTC Reports**, Illinois, march 2010. Disponível em: <[http://www.istc.illinois.edu/info/library\\_docs/RR/RR-117.pdf](http://www.istc.illinois.edu/info/library_docs/RR/RR-117.pdf)>. Acesso em: 08 nov. 2010.

JORDÃO, E.P.; PESSOA, C.A.; **Tratamento de esgotos domésticos**, 4 ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Impact of enzymatic pré-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily waste waters. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 21, p. 1797-1802, 2002.

KAIEDA, M.; T. SAMUKAWA, T; MATSUMOTO, K.; BAN, A.; KONDO, Y.; SHIMADA, H.; NODA, F.; NOMOTO, K.; OHTSUKA, E.; IZUMOTO; FUKUDA, H. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 627-631, 1999.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 1, p. 12-15, 2001.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactant and their importance. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.

KARLESKIND, A. **Oils and Fats: Manual**, v. 2. Paris: Lavoisier Publishing, 1996.

KASHMIRI, M.A.; ADNAN, A.; BUT, B.W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 878-882, 2006.

KATSIVELA, E.; KLEPPE, F.; LANG, S.; WAGNER, F. *Ustilago maydis* lipase I. Hydrolysis and ester-synthesis activities of crude enzyme preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, n. 8, p. 739-746, 1995.

KHEANG, L.S.; MAY, C.Y.; FOON, C.S.; NGAN, M.A. Recovery and conversion of palm olein-derived used frying oil to methyl esters for biodiesel. **Journal of Oil Palm Research**, v. 18, p. 247-252, 2006.

KIRAN, G.S; HEMA, T.A.; GANDHIMATHI, R, SELVIN, J.; THOMAS, T. A.; RAVJI, T.R.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256, 2009.

KITAMOTO, D.; AKIBA, S.; HIOKI, C.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. **Agriculture Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 31-36. 1990.

KITAMOTO, D.; ISODA, H. ; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 187-201, 2002.

KO, W.H.; WANG, I.T.; ANN, P.J. A simple method or detection of lipolytic microorganisms in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 597-599, 2005.

KÖHLER, J.; WÜNSCH, B. The allosteric modulation of lipases and its possible biological relevance. Disponível em: <<http://www.tbiomed.com/content/4/1/34>>. Acesso em: 30 nov. 2010.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 295-304, 2001.

KOUKER, G.; JAEGER, K-H. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **American Society for Microbiology**, v. 53, n.1, p. 211-213, 1987.

KUNIMOTO, M.; KANENIWA, M.; KAMINISHI, Y. Inhibition of intracellular lipase production by organic acids in mycelia of *Aspergillus oryzae*. **Journal of National Fisheries University**, v. 46, n. 2, p. 85-93, 1997.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 2, p.149-156, 2001.

KURZ, M.; EDER, C.; ISERT, D.; LI, Z.; PAULUS, E. F.; SCHIELL M.; TOTI, L.; VERTESY, L.; WINK, J.; SEIBERT, G. Ustilipids, acylated beta-D-mannopyranosyl D-erythritols from *Ustilago maydis* and *Geotrichum candidum*. **Journal of Antibiotics**, v. 56, n. 2, p. 91-101, 2003.

LA ROVERE, E.L.; SOARES, J.B.; OLIVEIRA, L.B.; LAURIA, T. Sustainable expansion of electricity sector: sustainability indicators as an instrument to support decision making. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 422-429, 2010.

LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.M.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR.; G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

LEAL, M.C.M.R.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C.; SANT'ANNA Jr, G.L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1173-1178, 2006.

LEE, K. T.; FOGLIA, T. A.; CHANG, K.S. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 79, n. 2, p. 191-195, 2002.

LEFEBVRE, X.; PAUL, E.; MAURET, P.; BAPTISTE, P.; CAPDEVILLE, B. Kinetic characterization of saponified domestic lipid residues aerobic biodegradation. **Water Research**, v. 32, n. 10, p. 3031-3038, 1998.

LEUNG, D.Y.C.; WU, W.; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

LI, W.; DU, W.; LIU, D. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1481-1485, 2007.

LI, W.; DU, W.; LIU, D.; YAO, Y. Study on factors influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and tert-butanol system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 111-115, 2008.

LIMA JUNIOR, A.F. **Biodegradação e atividade lipolítica em resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental**. Vitória-ES: UFES, 2009. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental).

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004.

LOCK, L.L. **Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81**. Porto

Alegre: UFRGS, 2007. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente).

LOPES, E. M. **Análise energética e da viabilidade técnica da produção de biodiesel a partir de sebo bovino.** Itajubá: UNIFEI, 2006. (Dissertação de Mestrado em Engenharia da Energia).

LUNA, J.M. **Influência do óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção de biossurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata*.** Recife: UFPE, 2006. (Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas).

LUNA, J.M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**, v. 6, n. 2, p. 209-215, 2008.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.

LUNA-VELASCO, M.A.; ESPARZA-GARCIA, F.; CAÑÍZARES-VILLANUEVA, R.O.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Production and properties of a bioemulsifier produced by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 310-314, 2007.

LUZ, F.F. **Desenvolvimento de um detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras e avaliação de sua viabilidade econômica de produção.** Porto Alegre: UFRGS, 2007. (Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular).

MACAGNAN, M.T. **Biorremediação de resíduos sólidos e produção de lipase de *Penicillium* utilizando fermentação em fase sólida.** Santa Cruz do Sul: UNISC, 2007. (Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental).

MACEDO, G. A.; MACEDO, J.A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biocombustíveis: Ciência & Desenvolvimento**, v. 32, p. 38-46, 2004.

MACRIS, J.B.; KOURENTZI, E.; HATZINIKOLAOU, D.G. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 8, p. 807-812, 1996.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* In solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.39, n. 12, p. 2031–2034, 2004.

MAHENDRAKER, V.; VIRARAGHAVAN, T. Respirometry in environmental engineering. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 30, n. 4, p. 713-734, 1995.

MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JR., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 304-309, 1999.

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A; CAMARGO DE MORAIS, M.M.; MELO, E.H.M.; MORAIS JR., M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 23-27, 2001.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101-121, 2003.

MAKKAR, R.S; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428–434, 2002.

MALDONADO, R.R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Campinas: 2006. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos).

MANEERAT, S.; PHETRONG, K. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. **Songklanakarin Journal Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 781-791, 2007.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Heterogeneous esterification of oil with high amount of free fatty acids. **Fuel**, v. 86, n. 5-6, p. 906-910, 2007.

MARQUES, M.V.; SILVA, C.F.G.; NACIUK, F.F.; FONTOURA, L.A.M. A química, os processos de obtenção e as especificações do biodiesel. **Revista Analytica**, n. 33, p. 72-87, 2008.

MARTINS, V.G.; KALIL, S.J.; COSTA, J.A.V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.

MASSE, L.; MASSE, D.I.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S. Neutral fat hydrolysis and long-chain fatty acid oxidation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 1, p. 43-52, 2002.

MATOS, Z.M.R.; FERNANDES, F.; BERNARDES, R.S. Avaliação da biodegradabilidade do lodo de esgoto por meio da compostagem, utilizando respirometria. CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 28. **Anais...** Cancun, México, 2002.

MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, S.; KAIEDA, M.; UEDA, M.; TANAKA, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 515-520, 2001.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biosurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. Campinas: UNICAMP, 2004. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos).

MEIRA, J.A. **Produção de biosurfactante por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos**. Curitiba: UFPR, 2007. (Dissertação de Mestrado em Química Orgânica).

MELLO, G.S.L.; MORITA, D.M.; MANFREDINI, S.; RIVERA, I.N.G. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.1, n. 1, p. 71-78, 2007.

MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305. 2005.

MENDIOLA, S; ACHUTEGUI, J.J.; SANCHEZ, F.J.; SAN, M.J. Polluting potential wastewater from fish-meal and oil industries. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 1, p. 30-33, 1998.

MENEZES, M.; ASSIS, S.M.P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2004.

MENONCIN, S. **Concentração, imobilização e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido**. Erechim: URI, 2007. (Dissertação de Mestrado em Eng. de Alimentos).

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns componentes recalcitrantes**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004. (Tese de Doutorado em Química).

METCALF; EDDY. **Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse**. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

MILLIOLI, V. S. **Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes n biorremediação de solo contaminada com hidrocarbonetos de petróleo**. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009. (Tese de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA. **Programa de Eficiência Energética em Saneamento Ambiental** (PROCEL SANEAR, 2004). Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/> (23.11.2004 a 11.04.2005)>. Acesso em: 18 set. 2010.

MITTELBAACH, M.; TRITTHART, P. Diesel fuel derived from vegetable oils, III. Emission tests using methyl esters of used frying oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 7, p.1185-1187, 1988.

MONDALA, A.; LIANG, K.; TOGHIANI, H.; HERNANDEZ, R.; FRENCH. Biodiesel production by in situ transesterification of municipal primary and secondary sludges. **Bioresource Technology**, v.100, n. 3, p. 1203-1210, 2009.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n. 2, p. 101-105, 2002.

MONTGOMERY, H. J.; MONREAL, C.M.; YOUNG, J.C.; SEIFERT, K. A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 8-9, p.1207-1217, 2000.

MORENO, F.N. **Tratamento de efluentes de uma indústria de reciclagem de embalagens plásticas de óleos lubrificantes: processo biológico e físico-químico**. Campinas: UNICAMP, 2007. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil).

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. Rio de Janeiro: Varela, 1989.

MUKHERJEE, S.; PALASHPRIYA, D.; RAMKRISHNA, S. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n.11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, n. 1-4, p. 371-380, 2001.

MURAYAMA, T.; FUJIWARA, Y.; NOTO, T. Evaluating waste vegetable oils as a diesel fuel. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers**, v. 214, n. 2, p. 141-148, 2000.

MURIEL, J.M.; BRUQUE, J.M.; OLIAS, J.M.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, A. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 3, p. 235-240, 1996.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. Biotransformação de óleos e gorduras. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 19, n.5, p. 28-31, 2001.

NELSON, D.; COX, M. **Principles of biochemistry**. San Francisco: Freeman, 2005.

NELSON, L. A .; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 8, 1191-1195, 1996.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772 – 776, 2002.

ODA, M.; KAIEDA, M.; HAMA, S.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 45–51, 2005.

OLIVEIRA, L.B. **Potencial de aproveitamento energético de lixo e de biodiesel de insumos residuais**. Rio de Janeiro: COPPE, 2004. (Tese de Doutorado em Engenharia Elétrica).

OLIVEIRA, L. B.; ROSA, L. P. Brazilian waste potential: energy, environmental, social and economic benefits. **Energy Policy**, v.31, n. 14, p.1481–1491, 2003.

OLIVEIRA, L.B.; ARAUJO, M.S.M.; ROSA, L.P.; BARATA, M.; LA ROVERE, E.L. Analysis of the sustainability of using wastes in the brazilian power industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 3, p. 883-890, 2008.

OLIVEIRA, L.G.; MANTOVANI, S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

OMAR, I.C.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 51, p. 2145-2151, 1987.

OTERO, C.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; PÉREZ-GIL, J. Effects of interactions with micellar interfaces on the activity and structure of different lipolytic isoenzymes from *Cândida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 7, p. 695-703, 2005.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAN, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Disponível em: <[http://www.ias.ac.in\\_currsci\\_jul10\\_articles23](http://www.ias.ac.in_currsci_jul10_articles23)>. Acesso em: 03 out. 2010.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; PDLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 287-294, 2002.

PASQUALETTO, A.; BARBOSA, G.N. Aproveitamento do óleo residual de fritura na produção de biodiesel. In: Congresso Interamericano AIDIS, 31, 2008, Santiago, **Anais...**Santiago: AIDIS, 2008. 1 CD-ROM.

PASTORE, G.M. **Produção e caracterização bioquímica de monoacil-glicerol lípase microbiana e aplicação de lípases na hidrólise e esterificação enzimática**. Campinas: UNICAMP, 1992. (Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos).

PAU, H.S.; OMAR, I.C. Selection and optimization of lipase production from *Aspergillus flavus* USM A10 via solid state fermentation (SSF) on rice husks and wood dusts as substrates. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 7, p. 1249-1256, 2004.

PEDROTI, G. I. **Ensaio de Biodegradabilidade Aeróbia de Hidrocarbonetos Derivados do Petróleo em Solo**. Vitória, UFES: 2007. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental).

PELCZAR, J. M. Jr., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PEREIRA, E. B. **Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas**. Florianópolis: UFSC, 2004. (Tese de Doutorado em Engenharia Química).

PEREIRA Jr., N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.: Il. – (Séries em Biotecnologia, v.1).

PEREIRA-MEIRELLES, F.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; SANT'ANNA JR., G.L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 1, p. 71-75, 2000.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.

PETERS, I.I.; NELSON, F.E. Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. **Journal of Bacteriology**, v. 55, n. 5, p. 581-591, 1948.

PIMENTEL, M.C.B. **Produção de lipases por fungos filamentosos: estudos cinéticos e síntese de ésteres**. Campinas: UNICAMP, 1996. (Tese de Doutorado em Química).

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. Erechim: URI, 2006. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos).

PINTO, M.H.; MARTINS, R.G.; COSTA, J.A.V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro: UNESP, 2006. (Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas).

PRATA, J.F.A.; LEMOS, J.L.S.; BARROS, C.A. Produção de tensoativo por *Penicillium coryophilum*. Disponível em: <[http://www.cetem.gov.br/publicacao/seanais\\_XVI\\_jic\\_2008.pdf](http://www.cetem.gov.br/publicacao/seanais_XVI_jic_2008.pdf)>. Acesso em: 22 abr. 2010.

PRAZERES, J.N. **Produção, purificação e caracterização da lipase alcalina de *Fusarium oxysporum***. Campinas: UNICAMP, 2006. (Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos).

PRAZERES, J. N. ; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 505-509, 2006.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Short Communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n.1, p. 133-135, 1997.

PUTHLI, M.S.; RATHOD, V.K.; PANDIT, A.B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 287-294, 2006.

QIN, H.; YAN, X.; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, p. 41-46, 2008.

QUINTELLA, C.M.; TEIXEIRA, L.S.G.; KORN, M.G.A.; COSTA NETO, P.R.; TORRES, E.A.; CASTRO, M.P.; JESUS, C.A.C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

RAHMAN, P.K.S.M.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants-review. **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 360-370, 2008.

RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Biosource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, 2008.

RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 11, p. 938-943, 1992.

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

REGITANO-D'ARCE, M. A. B. A química dos lipídeos: fundamentos para a geração de biodiesel. In: CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. (coord.). **Agronegócio de Plantas Oleaginosas: Matérias-Primas para Biodiesel**. Piracicaba: ESALQ. P. 181-191. 2006.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 2, p. 145-150, 2002.

REFAAT, A.A.; ATTIA, N.K.; SIBAK, H.A.; EL SHELTAWY, S.T.; ELDIWANI, G.I. Production optimization and quality of biodiesel from waste vegetable oil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 75-82, 2008.

RIFAAT, H.M.; EL-MAHALAWY, A.A.; EL-MENOFY, H.A.; DONIA, S.A. Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 5, n. 1, p. 39-53, 2010.

RIGO, E.; RIGONI, R.E.; LODEA, P.; DE OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Comparison of two lipases in the hydrolysis of oil and grease in wastewater of the swine meat industry. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 6, p. 1760-1765, 2008.

RIGO, E. **Aplicação de lipases como auxiliar no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos**. Erechim: URI, 2004. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos).

RIGO, E. **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja**. Florianópolis: UFSC, 2009. (Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos).

ROBLES, A.; LUCAS, R.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; OMAR, N.B.; PÉREZ, R.; GÁLVEZ, A. Characterization of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis paradoxa* CH32). **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 31, n. 4, p. 516-522, 2002.

RODELLA, A. A.; SABOYA, L. V. Calibration for conductimetric of carbon dioxide. **Soil Biology and Biochemistry Journal**, v. 31, p. 2059-2060, 1999.

RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 1-2, p. 1-22, 2010.

RODRIGUES, C.; CASSINI, S.T.A; GONÇALVES, R.F.; TSUKAMOTO, J.; BRITO, E. Isolamento de microrganismos de amostras ambientais visando sua utilização na geração de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 25, 2009, Recife. **Anais...Recife: ABES, 2009 a.** 1 CD-ROM.

RODRIGUES, C.; CASSINI, S.T.A; GONÇALVES, R.F.; TSUKAMOTO, J.; BRITO, E. Seleção de microrganismos lipolíticos visando sua utilização na geração de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 25, 2009, Recife. **Anais...Recife: ABES, 2009 b.** 1 CD-ROM.

RODRIGUES, C.; CASSINI, S.T.A; GONÇALVES, R.F.; TSUKAMOTO, J.; Perovano, T.G. Dosagem da atividade lipolítica de microrganismos de amostras ambientais visando sua utilização na geração de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 25, 2009, Recife. **Anais...Recife: ABES, 2009 c.** 1 CD-ROM.

RODRIGUES, C.; CASSINI, S.T.A; GONÇALVES, R.F.; TSUKAMOTO, J.; BRITO, E. Avaliação da atividade lipolítica de microrganismos através da biodegradação aeróbia de óleos e de resíduos oleosos do saneamento ambiental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 25, 2009, Recife. **Anais...Recife: ABES, 2009 d.** 1 CD-ROM.

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2264-2269, 2006.

ROMERO, C.M.; BAIGORI, M.D.; PERA, L.P. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 861-866, 2007.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

ROSA, D. R. **Tratamento enzimático/biológico de efluentes com alto teor de gordura**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004. (Dissertação de Mestrado).

ROSA, D.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**, v. 23, n. 5, p. 814-823, 2006.

ROSA, D.R. **Avaliação da dinâmica populacional e desempenho de sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes com alto teor de gordura submetidos a pré-tratamento enzimático em biorreatores de biomassa suspensa, granular e imobilizada**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2008. (Tese de Doutorado em Ciências).

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and low-molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

ROVEDA, M. **Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa**. Passo Fundo: UPF, 2007. (Dissertação de Mestrado em Engenharia).

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Avaliação da produção de lípases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

ROWE, L.; HOWARD, G.T. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n.1, p. 33- 40, 2002.

SAAD, E. B. **Etanolise do Óleo de Milho Empregando Catalisadores Alcalinos e Enzimáticos**. Curitiba: UFPR, 2005. (Dissertação de Mestrado em Química).

SAAD, E. B.; DOMINGOS, A. K.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. Variação da qualidade do biodiesel em função da matéria-prima de origem vegetal. In: CÂMARA, G. M. S. & HEIFFIG, L. S. (coord.): **Agronegócio de Plantas Oleaginosas: Matérias-Primas para Biodiesel**. Piracicaba: ESALQ. P. 193 – 225. 2006.

SAIFUDDIN, N.; CHUA, K.H. Biodegradation of lipid-rich wastewater by combination of microwave irradiation and lipase immobilized on chitosan. **Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 315-323, 2006.

SALIHU, A.; ABDULKADIR, I.; ALMUSTAPHA, M.N. An investigation for potential development on biosurfactants. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 5, p. 111-117, 2009.

SAMADI, N.; ABADIAN, N.; AKHAVAN, A.; FAZELI, M.R.; TAHZIBI, A.; JAMALIFAR, H. Biosurfactant production by the strain isolated from contaminated soil. **Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 7, p. 1266-1269, 2007.

SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 390-393, 2007.

SANT'ANNA Jr., G.L. Produção de Enzimas Microbianas. In: BORZANI, W.; SCHIMIDEL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Eds.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher, 2001. p. 351-362.

SEMIONATO, S. **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura**. Vitória: UFES, 2006. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental).

SHARABI, N. E-D; BARTHA, R. Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1201-1205, 1993.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MACRAE, I.C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, n.3, p. 123-137, 1987.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y., Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002.

SHIRAGA, S.; KAWAKAMI, M.; ISHIGURO, M.; UEDA, M. Enhanced reactivity of *Rhizopus oryzae* lipase displayed on yeast cell surfaces in organic solvents: potential as a whole-cell biocatalyst in organic solvent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4335-4338, 2005.

SHUKLA, P.; GUPTA, K. Ecological screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-5. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 2, n. 2, p. 35-42, 2007.

SHUKLA, P.; GARAI, D.; SAFAR, M.; GUPTA, K.; SHRIVASTAVA, S. Process parameters optimization for lipase production by *Rhizopus oryzae* KG-10 under submerged fermentation using response surface methodology. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 2, n. 2, p. 93-103, 2007.

SINGH, S.P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.12, n. 1, p. 200-216, 2010.

SILVA, W.O.B.; MIDIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.

SOBRINHO, H.B.S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica***. Recife: UCP, 2007. (Dissertação de Mestrado em Processos Ambientais).

SOUZA, Maria Aparecida. **Desemulsificação e purificação de resíduos gordurosos provenientes de esgotos domésticos**. Blumenau: FURB, 2003. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental).

STEELE, D.B.; STOWERS, M.D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 89-106, 1991.

SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, A.L.F.; RODRIGUES, J.P.; ALVES, M.B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

SZTAJER, H.; MALISWESKA, I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 12, p. 895-898, 1989.

TABATABAEE, A.; ASSADI, M.M.; NOOHI, A.A.; SAJADIAN, V.A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 2, n. 1, p. 6-12, 2005.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M.R.; HAMAD, S.; NUMATAB, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: a comparative

study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 185-189, 2008.

TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1495-1502, 2004.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628-634, 2010.

TELES, C.R.; MUNARO, C.J.; CASSINI, S.T.A. Modelagem da decomposição aeróbia de lodo de esgoto em solos com diferentes texturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.2, p.197-203, 2009.

TORRES, E.A., CHIRINOS, H.D., SANTOS, D.C., Biodiesel: o combustível para o novo século. **Bahia Análise & Dados**, v. 16, n. 1, p. 89-95, 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VALENTE, A.M.; ALEXANDRE, V.M.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 483-488, 2010.

VALLADÃO, A.B.G. **Pré-hidrólise enzimática aplicada ao tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves**. Rio de Janeiro: 2005. (Dissertação de Mestrado).

VALLADÃO, A.B.G.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n.4, p. 219-225, 2007.

VAN GERPEN, J. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1097-1107, 2005.

VANCE-HARROP, M.; GUSMÃO, N.B.; CAMPOS-TAKAKI. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 120-123, 2003.

VARGAS, G.D.L.P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato.** Erechim: URI, 2004. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos).

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production – current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbial Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 421-430, 2008.

VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MENDEZ, R.; LEMA, J.M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 231-239, 2000.

VIEIRA, A.P.A.; SILVA, M.A.P.; LANGONE, M.A.P. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipases. **Latin American Applied Research**, v. 36, n. 4, p. 283-288, 2006.

VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – lodos ativados. Departamento de Engenharia Sanitaria e Ambiental – UFMG – Belo Horizonte, v. 4, 2ª 192i., p. 87, 1997.

WAKELIN, N.G. ; FORSTER , C.F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 37-43, 1997.

WANG, Y.; OU, S.; LIU, P.; ZHANG, Z. Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process. **Energy Conversion and Management**, v. 48, n. 1, p. 184-188, 2007.

WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, p.1353-1358, 1977.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, n. 7, p. 703-707, 2001.

WILLEY, R. Fats, oils and greases: the minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, n. 2, p. 127-133, 2001.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WOLSKI, E. **Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado.** Erechim: URI, 2008. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos).

WU, J. e JU, L.K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 59, n. 3, p. 191-202, 1998.

WUST, E. **Estudo da Viabilidade Técnico-Científica da Produção de Biodiesel a Partir de Resíduos Gordurosos.** Blumenau: Universidade Regional de Blumenau, 2004. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental).

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A.N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, n. 1-3, p. 262-267, 2007.

YAN, J.; YAN, Y. Optimization for producing cell-bound lipase from *Geotrichum* sp. and synthesis of methyl oleate in microaqueous solvent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 3, p. 431-439, 2008.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLEA, D.P. SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339-347. 2004.

ZAREVÚCKA, M.; KEJIK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEROVÁ, K. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 5, p. 481-486, 2005.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M.A.; McLEAN; D.D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 1-16, 2003 a.

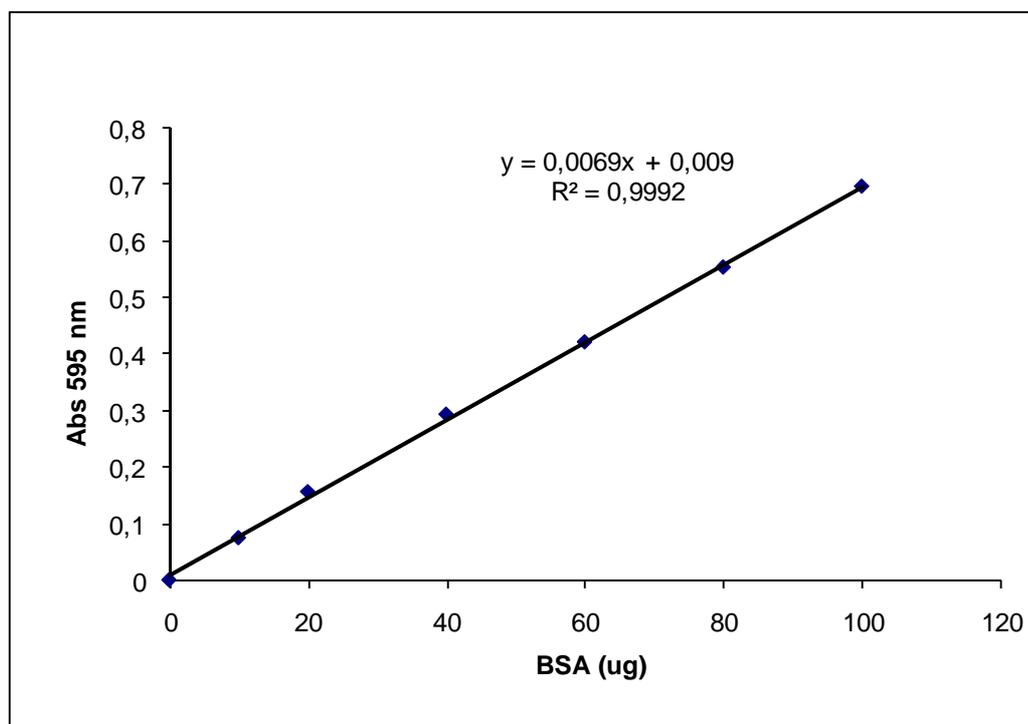
ZHANG, Y.; DUBÉ, M.A.; McLEAN; D.D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 229-240, 2003 b.

ZHENG, S.; KATES, M.; DUBÉ, M.A.; McLEAN, D.D. Acid-catalized production of biodiesel from waste frying oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 3, p. 267-272, 2006.

## ANEXO A - Reagente de Bradford e Curva de Calibração com BSA

O reagente de Bradford foi preparado com 100 mg de Coomassie Blue G250 (Merck, Alemanha) em 50 mL de etanol a 95% (QM, Brasil). Essa solução foi misturada com 100 mL de ácido fosfórico 85% (Vetec, Brasil) e diluída com 1 L de água destilada. O reagente foi então filtrado com papel de filtro Whatman nº1. Para elaborar a curva-padrão foi utilizada a solução estoque de soro de albumina bovina (BSA, Sigma, EUA) numa concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em água destilada esterilizada.

Para a elaboração da curva padrão foram pipetados volumes de 10, 20, 40, 60, 80, e 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão de BSA em tubos de ensaio, completando-se com água destilada até 100  $\mu\text{L}$ . O ensaio foi realizado em triplicata. Em seguida, adicionou-se 5 mL de reagente de Bradford a cada tubo de ensaio e agitados no vórtex mixer (Vision Scientific co., LTD, VS-1300V, Korea). As amostras e o branco (5 mL de reagente de Bradford e 100  $\mu\text{L}$  de água destilada esterilizada) foram medidas a uma absorbância de 595nm, entre 2 min e 1 h após a agitação.



## ANEXO B - Curva padrão para quantificação de ergosterol fúngico através de HPCL

Para a construção da curva padrão (padronização externa), que foi linear, passou pela origem e cobriu a faixa de concentração das amostras, utilizou-se ergosterol (Fluka Analytical, China, pureza mínima de 95%) e 7 pontos de leitura, cujas concentrações foram de 5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . O ergosterol foi diluído em metanol:água (95:5, v/v), e após filtragem em papel de filtro Millex com porosidade de 0,22  $\mu$ , as soluções foram injetadas no cromatógrafo, marca Shimadzu, com sistema binário de solventes, modelo LC – 20 AD/T (SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, Japão), equipado com coluna Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$ , C18, 100 x 2,1 mm (ALLCROM, [www.allcrom.com.br](http://www.allcrom.com.br)), acoplada com HPLC KrudKatcher Ultra Column In-Line Filter, 0,5 $\mu\text{m}$  Porosity x 0,004 in. A fase móvel foi isocrática com metanol/água (95:5, v/v) e a vazão de 0,5  $\text{mL. min}^{-1}$ . O solvente (metanol) foi de grau HPLC, tanto para as extrações como para as análises cromatográficas, e a água com qualidade Milli-Q, sendo que os dois últimos foram filtrados e degaseificados por 15 min. O tempo de corrida durou aproximadamente 7 min e, a identificação e a integração do pico de ergosterol foi feita por comparação de tempos de retenção do padrão e da amostra, utilizando o software LcSolution (SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, Japão), e a pureza verificada através dos espectros de absorvância obtidos no início, ápice e término do pico, cuja leitura ocorreu a 282 nm.

