



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA

ROGÉRIO DANIELETTO TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO UTILIZANDO CEPAS FÚNGICAS**

SÃO MATEUS
2015

ROGÉRIO DANIELETTO TEIXEIRA

PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO UTILIZANDO CEPAS FÚNGICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia, na área de concentração Petróleo, Gás e Energias Renováveis.

Orientador: Prof^a. D.SC. Laura Marina Pinotti.

SÃO MATEUS
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Divisão de Biblioteca Setorial do CEUNES - BC, ES, Brasil)

T266p Teixeira, Rogério Danieletto, 1970-
Produção de lipases por fermentação em estado sólido
utilizando cepas fúngicas / Rogério Danieletto Teixeira. – 2015.
75 f. : il.

Orientador: Laura Marina Pinotti
Dissertação (Mestrado em Energia) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Lipases. 2. Biodiesel. I. Pinotti, Laura Marina. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário
Norte do Espírito Santo. III. Título.

CDU: 620.9

ROGÉRIO DANIELETTO TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
UTILIZANDO CEPAS FÚNGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia do CEUNES, Departamento de Engenharias e Tecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia na área de concentração Petróleo, Gás e Energias Renováveis.

Aprovada em 09 de outubro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. D.Sc. Laura Marina Pinotti
DECOM/CEUNES/UFES
Orientadora

Profa. PhD. Ana Beatriz Neves Brito
DECOM/CEUNES/UFES

Profa. D.Sc. Gisele de Lorena Diniz Chaves
DECOM/CEUNES/UFES

Prof^o. D.Sc. Celson Rodrigues
CT/UFES

A Luísa, Lívia e Lília, razão da minha vida.

A Rômulo e Vanda, que me deram a vida.

AGRADECIMENTOS

À professora Laura Marina Pinotti, por sua orientação e, principalmente, por ter acreditado em mim apesar dos momentos de dificuldades que enfrentei.

Aos colegas de laboratório, Marina, Juliano, Henrique e Rômulo pela amizade, pelo agradável ambiente de trabalho e pelas colaborações.

À colega de Mestrado, Sâmela, por toda força e colaboração.

A todos os meus familiares pelo carinho, estímulo e apoio.

À minha esposa, Lília, por toda a força nos momentos de dificuldades.

A todos os professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Energia.

RESUMO

Lipases são enzimas que catalisam reações de grande interesse industrial, podendo ser usadas na síntese do biodiesel, que é um combustível alternativo e biodegradável produzido a partir de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gordura animal. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de lipases utilizando fungos *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp.* por fermentação em estado sólido (FES). Neste trabalho, a fermentação para a produção das lipases utilizou como substrato o bagaço de cana. Inicialmente, foram realizados ensaios preliminares com o intuito de testar a melhor granulometria do bagaço (0,6 a 1,18 mm ou 0,6 a 2,0 mm), a utilização ou não de uma solução nutritiva e o pré-tratamento químico (peróxido ou ácido-básico) que deveria ser empregado a fim de melhorar a disponibilidade de fonte de carbono para os fungos. Após os ensaios preliminares, buscou-se a otimização das condições de cultivo, sendo estudadas as temperaturas de 28°C, 33°C e 38°C, os teores de umidade de 60%, 70% e 80% e as concentrações do indutor óleo de oliva de 5%, 7,5% e 10% de acordo com o planejamento experimental 3³, com 2 pontos centrais, totalizando 29 experimentos. A máxima atividade lipásica (0,470 UI/g) para o *Penicillium sp.* foi obtida nas condições de 33°C, 80% de umidade e 10% do indutor, idênticas condições para atividade lipásica máxima para o *Rhizomucor sp.* (0,583 UI/g). Para o *Penicillium sp.* apenas a Temperatura (Q) e Umidade (L) foram significativas a 95% de confiança, entretanto, para o *Rhizomucor sp.*, a Umidade (L), a Umidade (Q) e o indutor (L) foram significativos a 95% de confiança. Após a liofilização do extrato enzimático, foi realizada a transesterificação com uma gordura proveniente da caixa de gordura de uma grande empresa da Grande Vitória, previamente tratada, obtendo-se rendimento de 56,72% para o extrato bruto do fermentado de *Penicillium sp.* e 59,47% para o extrato bruto do fermentado de *Rhizomucor sp.*

Palavras-chave: lipases, fermentação em estado sólido, biodiesel.

ABSTRACT

Lipases are enzymes that catalyze reactions of great industrial interest, it can be used in biodiesel synthesis, which is an alternative and biodegradable fuel produced from renewable sources such as vegetable oils and animal fats. The main objective of this work was to study the lipase production using fungi *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp* for solid-state fermentation (SSF). In this work, fermentation for the production of lipases used as a substrate sugar cane bagasse. Firstly, preliminary experiments were performed in order to test the best particle size bagasse (0,6 to 1,18 or 0,6 mm to 2,0 mm), the use or absence of a nutritive solution or chemical pretreatment (peroxide or acid-basic) that should be used in order to improve the availability of the carbon source for microorganisms. After preliminary tests , we sought to optimizing cultivation conditions being studied temperatures of 28°C , 33°C and 38°C , humidity levels of 60%, 70 % and 80 % and those in olive oil inducer concentrations of 5 % 7.5 % to 10 % according to the experimental planning 3³, with central points, totalling 29 trials. The maximum lipase activity (0,470 IU/g) for *Penicillium sp* was obtained under the conditions of 33 ° C, 80% humidity and 10 % of the inductor , the same conditions for maximum lipase activity to *Rhizomucor sp* (0.583 IU/g). To the *Penicillium sp.*, the Temperature (Q) and Humidity (L) were significant to 95% of confidence, otherwise, to the *Rhizomucor sp*, the Humidity (L), the Humidity (Q) and the inductor (L) were significant to 95% of confidence. After lyophilisation of the enzyme extract , transesterification was performed from fat with a fat case of a large company of Vitória, obtaining 56.72 % yield for the crude extract of the fermentation of *Penicillium sp.* and 59.47 % for the crude extract of fermented *Rhizomucor sp.*

Keywords: lipase, solid-state fermentation, biodiesel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de uma α/β hidrolase. setas azuis= folhas- β (1-8), cilindros vermelhos= α -hélices (A-F). círculos laranjas= posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica	20
Figura 2: reação de transesterificação	31
Figura 3: Produção de biodiesel por transesterificação.....	31
Figura 4: Fluxograma do processo de produção de lipases no estado sólido até a obtenção do biodiesel.....	34
Figura 5: Esquema de diluição para contagem de esporos em câmara de Neubauer	37
Figura 6: Bagaço de cana peneirado (a) e Tratado com ácido-base (b).	38
Figura 7: Refluxo para determinação da lignina de Klason	39
Figura 8: Filtração em gaze do extrato bruto.....	43
Figura 9: Microreator de mistura acoplado ao agitador magnético.....	44
Figura 10: Acompanhamento da viabilidade celular para o <i>Penicillium</i> sp	50
Figura 11: Acompanhamento da viabilidade celular para o <i>Rhizomucor</i> sp	50
Figura 12: Curva de crescimento do <i>Penicillium</i> sp.....	52
Figura 13: Curva de crescimento do <i>Rhizomucor</i> sp.....	52
Figura 14: Fermentação em Estado sólido do <i>Penicillium</i> sp e <i>Rhizomucor</i> sp.	55
Figura 15: Diagrama de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis da produção enzimática do <i>Penicillium</i> sp com 95% de confiança	59
Figura 16: Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais da	

<i>produção enzimática do Penicillium sp. obtidos pelo planejamento experimental 3³.....</i>	<i>60</i>
Figura 17: <i>Superfície de resposta para a produção enzimática do Penicillium sp.....</i>	<i>60</i>
Figura 18: <i>Diagrama de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis da produção enzimática do Rhizomucor sp com 95% de confiança</i>	<i>62</i>
Figura 19: <i>Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais da produção enzimática do Rhizomucor sp. obtidos pelo planejamento experimental 3³.....</i>	<i>63</i>
Figura 20: <i>Superfície de resposta para a produção enzimática do Penicillium sp.....</i>	<i>64</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Usos das lipases nas indústrias.....	21
Tabela 2: Principais fungos envolvidos na produção de lipases por FES.....	24
Tabela 3: Características de alguns óleos vegetais e comparação com óleo diesel	30
Tabela 4: Variáveis de cultivo e níveis de estudo utilizados na produção enzimática	41
Tabela 5: Parâmetros de cultivo utilizados na produção enzimática	42
Tabela 6: Resultados obtidos para preservação do <i>Penicillium sp</i> e <i>Rhizomucor sp</i>	49
Tabela 7: Resultados da caracterização do bagaço de cana	53
Tabela 8: Resultados das atividades enzimáticas (UI/g) relativas ao estudo de granulometria, do uso de solução nutritiva e do pré- tratamento do bagaço de cana.....	54
Tabela 9: Valores de atividades enzimáticas relativas à produção de lipases utilizando o <i>Penicillium sp</i> e o <i>Rhizomucor sp</i> em diferentes condições de cultivo.	56
Tabela 10: Coeficientes de regressão para a produção enzimática do <i>Penicillium sp</i>	58
Tabela 11: Análise da variância (ANOVA) para a produção enzimática do <i>Penicillium sp</i>	59
Tabela 12: Coeficientes de regressão para a produção enzimática do <i>Rizhomucor sp</i>	61

Tabela 13: Análise da variância (ANOVA) para a produção enzimática do <i>Rhizomucor sp.</i>	62
Tabela 14: Análise dos teores de ácidos graxos e acidez da gordura utilizada na produção do biodiesel	65
Tabela 15: Resultados da transesterificação enzimática da gordura utilizando extratos liofilizados.....	65

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AGL – Ácidos graxos livres

ANOVA – Análise de variância

BXX – Mistura de diesel e biodiesel onde XX é a porcentagem de biodiesel

CNPE – Conselho Nacional de Política Energética

DEA – Departamento de engenharia ambiental

DISA – Destilaria Itaúnas S/A

E.C – Enzyme commission

FES – Fermentação em Estado Sólido

FS – Fermentação submersa

IAf - Índice de acidez após a transesterificação

IAo - Índice de acidez antes da transesterificação

LABSAN – Laboratório de saneamento

OCDE – Organização para cooperação e desenvolvimento econômico

PDA – Potato dextrose agar

PNPB – Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel

U/g – Unidade de atividade enzimática por grama

UI/gss – Unidade internacional de atividade por grama de substrato seco

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 LIPASES	19
3.2 PRODUÇÃO DE LIPASES.....	21
3.2.1 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	22
3.2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	22
3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE LIPASES.....	25
3.4 PRODUÇÃO DO BIODIESEL	28
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
4. METODOLOGIA	34
4.1 OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	35
4.1.1 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS EM BAIXAS TEMPERATURAS.....	35
4.1.1.1 ACOMPANHAMENTO DA VIABILIDADE DOS FUNGOS MANTIDOS EM ULTRAFREEZER	36
4.2 OBTENÇÃO DO INÓCULO.....	36
4.2.1 ESPORULAÇÃO DOS FUNGOS.....	36
4.3 OBTENÇÃO DO SUBSTRATO	37
4.3.1 TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	37
4.3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ...	38
4.4 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	40

4.4.1 EXTRAÇÃO DA ENZIMA	43
4.4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	43
4.4.3 LIOFILIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO	44
4.5 PRODUÇÃO DO BIODIESEL	44
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 VIABILIDADE DE CONSERVAÇÃO DOS FUNGOS	49
5.2 ACOMPANHAMENTO DA ESPORULAÇÃO DOS FUNGOS	51
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO	52
5.4 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	54
5.4.1 ENSAIOS PRELIMINARES	54
5.4.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	55
5.4.2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DO <i>Penicillium sp</i>	58
5.4.2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DO <i>Rhizomucor sp</i>	61
5.5 PRODUÇÃO DO BIODIESEL	64
6. CONCLUSÕES	67
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 Introdução

O crescimento econômico e tecnológico são os principais responsáveis pela demanda de energia no mundo. Projeções da Agência Internacional de Energia indicam que a demanda mundial de energia irá aumentar em 30% até 2035, tendo como base o cenário das novas políticas de desenvolvimento, liderados pelas China, a Índia e o Oriente Médio (IEA, 2012).

Dentre todas as fontes energéticas, as de origem fóssil são as que apresentam maior impacto negativo para o meio ambiente e a qualidade de vida do Homem. O petróleo e seus derivados, desde o processo de produção até ao consumo final, liberam gases tóxicos que prejudicam os ecossistemas e a biodiversidade, bem como a saúde do Homem. Segundo Ramos et al. (2011), a ONU considera o uso dessas fontes o principal responsável pelo aumento dos gases de efeito estufa na atmosfera. Especialistas acreditam que essas emissões podem provocar mudanças profundas no clima do planeta (SOARES; OLIVEIRA, 2002). Atualmente, cerca de 80,6% da matriz energética dos países membros da OCDE é formada por combustíveis fósseis. No Brasil, a proporção não passa de 59,2% (MME, 2015).

Diante desse quadro, vem se intensificando em nível mundial uma busca por fontes renováveis de energia que possam ser ambientalmente seguras e comercialmente competitivas. Dentre essas fontes, o biodiesel surge como uma interessante possibilidade por se tratar de um combustível limpo e renovável quando comparado ao óleo diesel. A substituição do óleo diesel pelo biodiesel resulta em reduções significativas nas emissões de monóxido de carbono (CO) (PINTO et al., 2005). Em 2014, o biodiesel representou cerca de 1% matriz energética brasileira, um aumento de 17,2% em relação ao ano de 2013 (MME, 2015).

O biodiesel é um combustível alternativo e biodegradável produzido a partir de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gordura animal (KRAWCZYK, 1996). É formado por uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos obtidos a partir de uma reação de transesterificação, na qual óleos e gorduras reagem com álcoois de cadeia curta, sendo convertidos em biodiesel e glicerol (DABDOUB; BRONZEL, 2009).

Para a produção do biodiesel, no entanto, é necessário a utilização de um catalisador, que pode ser ácido, básico ou enzimático. Dentre estes, o processo catalítico alcalino é o mais utilizado (MA; HANNA, 1999). Contudo, apesar de consagrada, a catálise alcalina para produção do biodiesel apresenta alguns problemas, tais como a necessidade de utilização de óleos vegetais refinados, dificuldades com relação à recuperação do glicerol, formação de sabões e pigmentos, etc. (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). Assim, é crescente o interesse nos últimos anos pelos processos enzimáticos (JAEGER; REETZ, 1998). Especialmente na síntese de biodiesel, o uso de enzimas isoladas ou purificadas proporciona uma alta eficiência catalítica e seletividade, podendo ser usadas em condições reacionais brandas de temperatura e pressão, gerando uma menor demanda de energia e evitando desgaste dos equipamentos (BRITO, 2012). Além disso, o glicerol pode ser recuperado mais facilmente e o processo de purificação dos ésteres alquílicos é mais simples (BAJAJ et al., 2010).

O uso de lipases como catalisadores enzimáticos na síntese de biodiesel é uma alternativa bastante interessante do ponto de vista ambiental e da qualidade do produto formado. A utilização de lipases viabiliza o uso de matérias-primas com baixo valor agregado (elevado teor de ácidos graxos livres). Assim, a substituição de catalisadores químicos por lipases pode diminuir os problemas relacionados ao uso de catalisadores alcalinos e contribuir para mitigar os danos causados pelos combustíveis fósseis (DAMASO et al., 2008). Essas enzimas são capazes de catalisar reações de transesterificação em meio orgânico com baixo teor de água e são produzidas principalmente por microrganismos.

Os fungos têm sido reportados como excelentes produtores de lipases, uma vez que podem produzi-las extracelularmente, facilitando a sua extração (BRITO, 2012). Apesar de suas vantagens, o uso de lipases pela indústria ainda esbarra no seu custo. Assim, vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de se encontrar novos microrganismos produtores e aprimorar a forma de produção (CASTRO et al., 2004).

Uma das alternativas para a redução dos custos na produção de lipases por fungos é a utilização da fermentação em estado sólido (FES). A FES envolve o uso de

substratos ou suportes para crescimento de microrganismos na ausência de água livre. É um processo que requer menor energia quando comparado à fermentação submersa (FS) e pode ser vantajoso para países que possuem grande oferta de resíduos sólidos.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a produção de lipases pelos fungos *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp*, por fermentação em estado sólido (FES) e otimizar parâmetros do processo, bem como, avaliar o potencial dos extratos enzimáticos brutos obtidos na transesterificação de triglicerídeos residuais de uma indústria de alimentos localizada no estado do Espírito Santo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produzir lipases fúngicas para sua utilização na obtenção sustentável de biodiesel a partir de resíduos oleosos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial de produção de lipases pelos fungos *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp.* encontrados no esgotamento sanitário da grande Vitória-ES;
- ✓ Otimizar parâmetros de produção de lipases por *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp* utilizando a fermentação em estado sólido, tendo o bagaço de cana-de-açúcar como substrato e óleo de oliva como indutor.
- ✓ Avaliar o potencial dos extratos enzimáticos brutos na transesterificação de triglicerídeos residuais de uma indústria alimentícia do ES.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Lipases

As lipases constituem um dos mais importantes grupos de biocatalisadores com aplicações biotecnológicas. São enzimas versáteis de grande utilização industrial, classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3). Elas são capazes de catalisar uma série de reações envolvendo óleos e gorduras. Em meio aquoso, catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis a glicerol e ácidos graxos. Porém, em ambientes aquo-restritos, catalisam reações de síntese, como esterificação, interesterificação e transesterificação, utilizadas na produção de combustíveis, cosméticos, drogas e herbicidas (UEDA et al, 2002; RIBEIRO et al, 2011; ELLAIAH et. al, 2004). Geralmente, não necessitam de cofatores, ou seja, pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas necessárias para a sua função catalítica. Além disso, as lipases podem atuar numa ampla faixa de pH e são relativamente estáveis a altas temperaturas. Essas enzimas possuem especificidade, ou seja, atuam para produzir algo específico; regioseletividade, rompendo ou criando uma ligação em uma determinada direção em detrimento das outras; quimioseletividade, quando um grupo funcional reage sem afetar os demais grupos e enantioseletividade, favorecendo a formação de um enantiômero ou diastereômero específico (PANDEY et al., 1999).

As lipases atuam na interface lipídio-água e possuem uma estrutura de α/β - hidrolase, constituídas por α -hélices e folhas β e um sítio ativo formado por Ser-His-Asp/Glu (Figura 1) (BORNSCHEUER, 2002). Este sítio ativo, em grande parte das lipases, fica coberto por uma “tampa” ou “lid”, responsável pela ativação interfacial que, na ausência da interface óleo/água, fica inacessível ao substrato. Quando o substrato se liga à superfície, a “tampa” se abre, mudando da forma fechada para a aberta, expondo o sítio ativo e ao mesmo tempo expondo uma grande superfície hidrofóbica que facilita a ligação com a interface. Contudo, a presença dessa estrutura em forma de “tampa” não está necessariamente ligada a uma ativação interfacial (CASTRO et al, 2004).

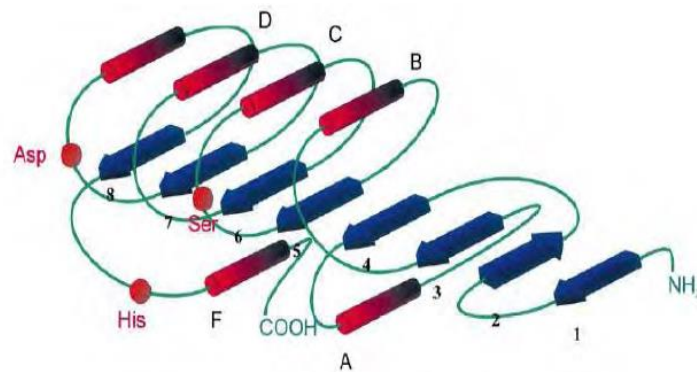


Figura 1: Representação esquemática de uma α/β hidrolase. setas azuis= folhas- β (1-8), cilindros vermelhos= α -hélices (A-F). círculos laranjas= posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica..

Fonte: (BORNSCHEUER, 2002).

As lipases podem ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas. As lipases microbianas são mais frequentemente utilizadas devido à grande variedade de atividade catalítica, facilidade de obtenção e rápido crescimento (VILLENEUVE et al., 2000). Dentre os microrganismos, os fungos são os mais valorizados porque produzem enzimas extracelularmente, o que facilita a sua recuperação e também porque a grande maioria não é nociva à saúde humana (FERNANDES, 2007). Os gêneros de microrganismos mais citados são o *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Yarrowia* e *Candida* (PANDEY et al., 2001). Contudo, a busca por novas linhagens que possuam potencial de produzir enzimas continua sendo o foco de inúmeras pesquisas.

Devido a sua grande versatilidade, as lipases têm sido empregadas em inúmeras atividades industriais, desde aditivos em detergentes até síntese de compostos orgânicos. Essa versatilidade se deve ao fato de atuarem em uma ampla faixa de pH e à estabilidade em altas temperaturas e solventes orgânicos. Podem ser utilizadas em diversos tipos de substratos e possuem capacidade quimio-regio e enantiosseletivas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Embora muitos processos industriais ocorram em altas temperaturas, tem se estudado o uso de lipases em condições que requerem baixas temperaturas e economizam energia (YADAV et al., 2011). Um dos campos importantes de aplicação das lipases tem sido a síntese de

biodiesel, principalmente quando os substratos são óleos ou gorduras residuais (PARK; SATO; KOJIMA, 2006). A Tabela 1 mostra algumas aplicações das lipases.

Tabela 1: Usos das lipases nas indústrias

Indústria	Aplicação
Laticínios	Hidrólise de gorduras de leite
Panificação	Aumento do aroma e da vida de prateleira
Cervejaria	Aceleração da fermentação em função dos lipídios
Carne	Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura
Farmacêutica	Digestão de óleos e gorduras em alimentos
Médica	Determinação de triglicerídeos no sangue
Papel	Tratamento de polpas de celulose
Tratamento de resíduos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas

Fonte: Maldonado, 2006

3.2 Produção de lipases

Existem basicamente dois tipos de fermentação para a produção de lipases microbianas: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). Em ambos os casos, a composição do meio e as condições de produção têm um papel central na otimização do processo de produção. Na FS, o microrganismo cresce num meio de cultura líquido contendo nutrientes solúveis. Na FES, o crescimento ocorre num material úmido, porém sem a presença de água livre, com teores de umidade não superiores a 70% (CASTILHO et al, 2000).

3.2.1 Fermentação submersa

Em sua maior parte, as lipases microbianas são produzidas por fermentação submersa (FS). Nessa forma de fermentação, os nutrientes solúveis estão homogeneamente distribuídos, com grande eficiência de transferência de nutrientes (CASTILHO et al., 2000). Para tanto, são utilizados meios de cultura com fontes complexas contendo aminoácidos, levedura, peptona e óleo. A recuperação das enzimas costuma ser feita por filtração simples ou centrifugação (LIMA et al., 2003). Apesar de ser largamente utilizada, essa forma de produção enzimática necessita de uma quantidade maior de energia, além de gerar grandes volumes de efluentes (NAGY et al., 2006). Diante deste contexto, daremos nesse trabalho maior ênfase a produção de lipases utilizando a fermentação em estado sólido (FES).

3.2.2 Fermentação em estado sólido

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é um eficiente método de produção de enzimas que utiliza substratos insolúveis com baixa capacidade de absorver água para crescimento de microrganismos (PANDEY et al., 2001). Os substratos sólidos usados para cultivo reúnem condições que permitem o crescimento e o metabolismo de microrganismos, atuando tanto como suporte fisiológico quanto fonte de nutrientes (SHRESTA et al., 2009). Este crescimento pode acontecer sobre a superfície do material ou entre os fragmentos do substrato, consumindo-os e liberando metabólitos (MITCHELL et al., 2006). O substrato que oferece essas características pode ser considerado como ideal. Contudo, em muitos casos, os nutrientes podem estar em quantidades abaixo do necessário ou até ausentes. Nestes casos, é comum se fazer uma suplementação nutritiva (PANDEY et al., 1999).

Os substratos utilizados para a produção de lipases podem servir apenas como suporte, como por exemplo, o poliuretano e as resinas poliméricas. Entretanto, os suportes que mais têm sido estudados para a FES são os resíduos agroindustriais, no qual são aproveitadas as palhas e os bagaços. A FES oferece inúmeras

oportunidades para o aproveitamento desses resíduos agroindustriais, agregando valor e dando uma destinação mais adequada, contribuindo assim para diminuir possíveis problemas ambientais. Os processos fermentativos que utilizam esses materiais requerem menor quantidade de energia, além de ajudar a diminuir o volume de resíduos, tornando-se uma solução ambientalmente correta para a disposição desses materiais no ambiente (PANDEY, 2003).

As técnicas de cultivo de microrganismos tiveram início com a FES. Entretanto, durante e após o período da Segunda Guerra Mundial, esta técnica foi ignorada em virtude do incentivo dado para a produção de penicilina via Fermentação Submersa (FS). A FES voltou a ser mais utilizada apenas nos anos 70 com a produção de ração animal enriquecida com proteínas. Deste período em diante, as pesquisas envolvendo o FES ganharam força novamente, principalmente a partir dos anos 90 (PANDEY, 2003). Segundo Mitchell et al.,(2006), algumas das vantagens desta forma de cultivo em relação a FS são a simplicidade, o menor custo e economia de equipamentos e energia.

Para um desenvolvimento adequado da FES vários aspectos devem ser considerados, tais como: a escolha adequada do microrganismo, do substrato e a otimização dos parâmetros do processo. Além desses, são importantes também as escolhas dos métodos de isolamento e da purificação do produto final. Dentre esses fatores, a escolha do microrganismo é de fundamental importância para a obtenção de bons resultados. Os microrganismos que mais têm sido utilizados na FES são os fungos, uma vez que conseguem se desenvolver nesses ambientes com baixa umidade (COUTO; SANROMÁN, 2005). Segundo XU et al. (2002), os fungos filamentosos são os melhores devido à capacidade de utilizar substratos variáveis e possuir crescimento vigoroso com a colonização. Muito embora sejam mais adequados do que as bactérias para FES, as bactérias também podem ser manipuladas com sucesso neste tipo de cultivo (PANDEY, 2003). Fernandes (2007) estudou a produção de lipases por uma cepa bacteriana (*Burkholderia cepacia*) utilizando farelo de trigo, farelo de sementes de girassol, torta de milho e casca de milho, obtendo bons resultados apesar desse sistema ser muito pouco utilizado para

o cultivo de bactérias. A Tabela 2 mostra os principais fungos estudados para a produção de lipases por FES.

Tabela 2: Principais fungos envolvidos na produção de lipases por FES

Microrganismo	Substrato	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	torta de óleo de coco	Ramachandran et al., 2004.
<i>Aspergillus niger</i>	torta de gergelim farelo de trigo farelo de trigo	Kamini et al., 1998. Mahadik et al., 2002. Nagy et al., 2006
<i>Monascus fuliginosus</i>	bagaço de cana	Liu et al, 1995
<i>Neurospora sp TT-241</i>	farelo de trigo	Lin et al., 1996
<i>Penicillium camembertii</i>	Bagaço-de-cana	Rivera-Minõz et al., 1991.
<i>Penicillium candidum</i>	Bagaço-de-cana	Rivera-Minõz et al., 1991.
<i>Mucor miehei</i>	Bagaço-de-cana	Rivera-Minõz et al., 1991.
<i>Penicillium restrictum</i>	torta de babaçu	Castilho et al., 2000. Palma et al., 2000. Gombert et al., 1999.
<i>Penicillium simplicissimum</i>	torta de soja	Di Luccio et al., 2004.
<i>Rhizopus oligosporus</i>	torta de amêndoa	Ul-Haq et al., 2002.
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Bagaço-de-cana	Rodriguez et al., 2006. Diaz et al., 2006.
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	Bagaço-de-cana	Cordova et al., 1998.
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Bagaço-de-cana	Cordova et al., 1998.

Fonte: Fernandes (2007)

Outro aspecto importante da FES é a escolha do substrato. Geralmente, são materiais insolúveis que podem fornecer nutrientes, além de servirem como suporte para o crescimento celular. Dentre esses materiais podemos citar os resíduos agroindustriais e os suportes inertes, tal como o poliuretano enriquecido com uma solução nutritiva (PANDEY, 2003). Diversos trabalhos, entretanto, têm sido feitos utilizando resíduos agroindustriais, tais como a torta de babaçu, farelo de trigo, bagaço de cana, farelo de soja, casca de arroz, casca de milho, etc. (FERNANDES, 2007).

A seleção dos parâmetros do processo e a sua otimização é outra questão de suma importância. Esses parâmetros podem ser físico-químicos ou bioquímicos, tais como tamanho das partículas, umidade, temperatura, pH, concentração do indutor, pré-tratamento do substrato, agitação e aeração, suplementação nutritiva e quantidade do inoculo (PANDEY, 2003). Neste trabalho foram selecionados como parâmetros para estudo a temperatura, a umidade e o indutor, uma vez que têm sido os mais citados na literatura quando se trata da produção de lipases. A influência desses fatores é apresentada na próxima seção.

3.3 Fatores que influenciam na produção de lipases

A produção de lipases é influenciada por inúmeros fatores, conforme mencionado acima. Um dos mais importantes fatores, principalmente quando se trata da produção usando fungos filamentosos, é a temperatura. Os processos fermentativos em estado sólido são geralmente exotérmicos, com grandes quantidades de calor liberadas que são diretamente proporcionais à atividade metabólica dos microrganismos. Grande parte dos substratos possui baixa condutividade térmica, assim, a temperatura acaba sendo um fator crítico, porque podem ocorrer gradientes de temperaturas no meio produtivo, podendo gerar até a desnaturação dos produtos formados (PINTO, 2005). Assim, o controle da temperatura deve estar relacionado à capacidade do sistema em promover aeração do meio (PANDEY, 2003).

No início do processo de fermentação, a temperatura e a concentração de oxigênio são homogêneas, porém, com o decorrer do processo, em virtude da

heterogeneidade por causa da compactação e do encolhimento do meio, os gases e o calor tendem a se acumular, gerando gradientes que podem interferir no controle da temperatura e da umidade. Essas alterações nas condições de fermentação podem afetar o resultado final do processo (VARGAS et al., 2008). A porosidade do meio é um fator que está diretamente relacionado com a difusão de gases entre as partículas que compõem o substrato. Assim, o aumento da porosidade pode contribuir para a melhoria das condições de produção (RAHARDJO et al., 2005).

A temperatura tem se mostrado um fator crucial para a produção de lipases, uma vez que pequenas diferenças de temperatura podem provocar queda do rendimento. Culturas do gênero *Penicillium* têm sido incubadas em temperaturas que variam de 25 a 30°C (LIMA et al, 2003). Shafei e Allam (2010) utilizaram o *P. chrysogenum* para a produção de lipases a 30°C obtendo bons resultados. Por outro lado, WOLSKI et al. (2009), trabalhando com *Penicillium simplicissimum*, obtiveram melhor produção com temperatura variando de 32 a 42 °C. Segundo Coradi (2012), as lipases fúngicas tem sua temperatura ótima variando entre 35 e 45°C.

Outro fator de suma importância no processo fermentativo é o teor de umidade do substrato. A água é responsável pela difusão dos solutos, gases e metabólitos e tem influência sobre a atividade microbiana. Nesse sentido, a atividade da água (a_w) do substrato é um parâmetro fundamental para transferência de massa de água e solutos através das células microbianas (PANDEY, 2003).

A atividade da água (a_w) define a quantidade de água disponível para o microrganismo, aquela que não está ligada ao substrato. Segundo Mitchell et al. (2000), a atividade da água (a_w) para substratos sólidos pode ser entendida pela relação entre a pressão de vapor da água sobre o substrato em um sistema fechado e a pressão de vapor da água pura na mesma temperatura. Quando o teor de umidade é alto, tem-se uma diminuição da porosidade, o que resulta em baixa difusão de oxigênio, aumentando o risco de contaminação e reduzindo as trocas gasosas. Por outro lado, baixos níveis de umidade podem levar a um menor crescimento dos microrganismos (LONSANE et al., 1985). Segundo Pandey (2003), o teor de umidade inicial pode variar de 18 a 85% baseado na capacidade de

absorção do substrato. A adição de água ou solução nutritiva pode ser uma maneira de se alcançar a umidade desejada (PARAJE, 2008).

O teor de umidade inicial do substrato deve ser alto, uma vez que haverá uma perda durante o processo ocasionada pelo calor gerado pelo metabolismo dos microrganismos. Sun e Xu (2008) obtiveram valores de atividade máxima na produção de lipase a partir do fungo *Rhizopus chinensis* utilizando uma mistura de farelo de trigo e farinha de trigo (2:3) com umidade de 70%. Ferrarezi (2011) obteve os melhores resultados quando utilizou uma solução nutritiva que conferiu uma umidade relativa de 70% ao bagaço de cana-de-açúcar para a produção de lipases pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. Já Coradi (2012) conseguiu o melhor resultado produzindo lipase de *F. oxysporum* em torta de crambe (oleaginosa) com 60% de umidade. Silva et al. (2011) produziram lipase a partir do fungo *Penicillium brevicompactum* utilizando como substrato o farelo de mamona e a torta de babaçu em diferentes níveis de umidade. Concluíram que a produção de lipase é fortemente influenciada pela umidade. Os melhores resultados ocorreram com 70% de umidade, seguido por 80% e 56% respectivamente. Utilizando bagaço de cana como substrato, Rodriguez et al (2006), obtiveram bons resultados com 75% de umidade para produção de lipase fúngica.

A utilização de indutores como fonte de energia e carbono é necessária para a maioria dos microrganismos produtores de lipases. Esses indutores podem ser um triglicerídeo, um éster ou um ácido graxo adicionado em concentrações reduzidas como única fonte de carbono. Os ácidos graxos presentes nos óleos usados como indutores são principalmente o oleico e o linoleico. Um dos indutores mais frequentemente utilizado é o azeite de oliva (CASTILHO et al., 2000). No azeite de oliva esses ácidos estão presentes na proporção de 28% e 3%, respectivamente. Lima et al (2003) estudaram a produção de lipase de *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx IOC 4212 utilizando diferentes óleos como indutores e concluíram que os melhores resultados ocorreram quando a concentração de ácido oleico era maior (28%).

Vários pesquisadores têm estudado o uso de indutores para produção de lipases, tanto na FS quanto na FES e tem concluído que são importantes o tipo de indutor e

a sua concentração (LIMA et al, 2003). Ferrarezi (2011) cultivou o fungo *T. indicaseudaticae* N31 por FS e obteve aumento na produção de lipases com a concentração de óleo de soja variando de 1 a 3%. Contudo, observou que houve uma redução na atividade lipolítica quando a concentração variou de 5 a 10%. Apesar de utilizado como indutor, ele pode ser tóxico para algumas linhagens (CIHANGIR, SARYKAYA, 2004), ou inibitória (GHOSH et al.; 1996).

Estudando a produção de lipase de *P. aurantiogriseum*, Lima et al (2003) variaram a concentração de azeite de oliva entre 0,5 a 2,0% e concluíram que isso influenciou fortemente a produção de lipases, porém, entre 1,5 e 2,0% perceberam um decréscimo na produção. Segundo os autores, isso se deve às limitações na transferência de oxigênio, o que afeta o metabolismo dos microrganismos e, conseqüentemente, a produção de lipase. Entretanto, Rodriguez et. al. (2006) cultivou *Rh. Homothallicus* em meio sólido (FES) e não observou esse fator quando a concentração era de 4%.

3.4 Produção do biodiesel

A preocupação com o meio ambiente no que diz respeito à preservação dos recursos naturais tem sido comum nas últimas décadas, principalmente no que diz respeito ao uso dos recursos energéticos de origem fóssil. Atualmente, cerca de 40% do consumo de energia no mundo provém de fontes não renováveis (petróleo, carvão e gás natural) (MOURA, 2012). Além da preocupação com os problemas ambientais relacionados à utilização desses recursos, existe uma preocupação com o fato desses recursos não serem renováveis e que de alguma forma terão de ser substituídos a fim de se manter o suprimento energético mundial.

Nesse sentido, existe uma busca por recursos renováveis que atendam aos interesses ambientais e também sejam competitivos em termos de mercado. O biodiesel é uma dessas alternativas, uma vez que se trata de um combustível renovável com características semelhantes ao diesel de petróleo com menor emissão de poluentes, principalmente os derivados do enxofre. Pode ser usado puro

ou numa mistura com o diesel de petróleo denominada BXX, onde XX representa o percentual de biodiesel.

Com o objetivo de implementar a produção e o uso sustentável do biodiesel, o Governo Federal criou em dezembro de 2004 o Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel (PNPB). O Programa enfoca a inclusão social e o desenvolvimento regional por meio da geração de emprego e renda da agricultura familiar. Para tanto, o governo introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira por meio da Lei 11.097/05, tornando a adição obrigatória de 2% (B02) e posteriores aumentos previstos pelo programa. Por meio da Resolução Número 2 de 2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) o biodiesel comercializado em todo o país passou a ser 4% (B04) e a meta de 5% que deveria vigorar em 2013 foi antecipada para 2010 pela Resolução Número 6 de 2009. Em 2014 esse percentual foi aumentado para 6% (B06), devendo chegar a 7% (B07) em 1º de novembro de 2015 (MOURA, 2012).

A principal matéria prima para a produção do biodiesel são os óleos vegetais ou gorduras *in natura* ou residuais. Os óleos vegetais são compostos basicamente de ésteres de ácidos graxos e glicerol (COSTA NETO et al., 2000). Apesar de possuírem grande poder calorífico, seu uso direto no motor é dificultado pela maior viscosidade e densidade em relação ao óleo diesel. Essas características podem comprometer o motor, uma vez que a combustão incompleta forma depósitos de carbono, causando entupimento dos bicos injetores e dos filtros, diminuindo a sua eficiência (RINALDI et al, 2007). A Tabela 3 mostra a comparação de algumas características físicas de alguns tipos de óleos vegetais e o óleo diesel de petróleo.

Tabela 3 - Características de alguns óleos vegetais e comparação com o óleo diesel

Características	Tipo de óleo					Óleo diesel*
	Mamona	Babaçu	Dendê	Soja	Pequi	
Poder calorífico (kcal/Kg)	8913	9049	8946	9421	9330	10950
Ponto de névoa (°C)	10	26	31	13	26	0
Índice de cetano	Nd	38	38-40	36-39	38	40
Densidade a 25°C.	0,9578	0,9153	0,9118	nd	0,9102	0,8497
Viscosidade a 37,8°C(cSt [†])	285	30,3	36,8	36,8	47,0	2,0-4,3
Destilação a 90%(°C)	Nd	349	359	370	Nd	338
Teor de cinzas (%)	Nd	0,03	0,01	nd	0,01	0,014
Cor (ASTM)	1,0	0,5	1,0	nd	2,0	2,0
Resíduo de carbono Conradson sobre 10% do resíduo seco (%)	Nd	0,28	0,54	0,54	Nd	0,35

* cSt=centistokes: 1 stokes = 100 centistokes
 Fonte: COSTA NETO et al., 2000

No sentido de contornar esses problemas, o óleo pode ser submetido a uma reação de transesterificação para obtenção do biodiesel, que é um produto com características próximas ao óleo diesel (Figura 2). De acordo com a “*National Biodiesel Board*” dos Estados Unidos, o biodiesel é formado por uma mistura de mono alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa obtido de óleo vegetal ou gordura animal por um processo de transesterificação. Nesta reação, um triglicerídeo reage com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador ácido, básico ou enzimático (COSTA NETO et al., 2000).

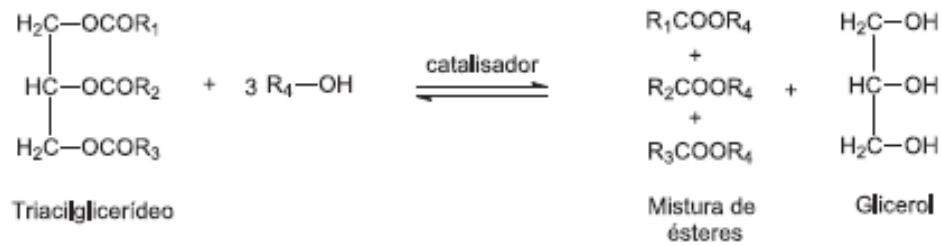


Figura 2: Reação de transesterificação
 Fonte: (GERIS et al., 2007)

Inicialmente, o óleo é extraído por meio da prensagem e misturado a um álcool de cadeia curta, geralmente etanol no Brasil. A reação acontece mediante a ação de catalisadores, obtém-se uma mistura de ésteres alquílicos (biodiesel), gerando como subproduto o glicerol (Figura 3). Esta fase glicerídica contém apenas 50% de glicerol, além do álcool excedente, a maior parte do catalisador e os sabões formados no processo.

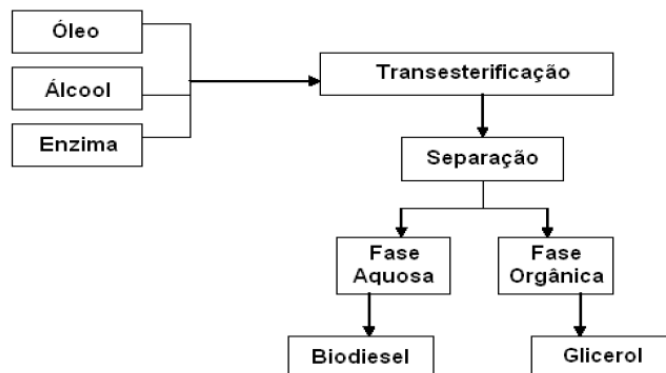


Figura 3: Produção de biodiesel por transesterificação
 Fonte: Ranganathan et al, 2008

Os catalisadores mais utilizados são os alcalinos, porque possuem maior eficiência e menor custo. Entretanto, apesar do baixo custo, esses catalisadores são muito agressivos para os equipamentos e podem gerar reações secundárias de saponificação. Além disso, apresentam algumas desvantagens como a não recuperação e reutilização do catalisador, difícil recuperação do glicerol, um grande gasto energético (AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007). Assim sendo, a substituição do

catalisador químico por enzimas pode diminuir estes problemas, justificando o desenvolvimento de pesquisas utilizando lipases como catalisadores enzimáticos.

Em outro sentido, a utilização da catálise enzimática é importante quando se objetiva aproveitar os óleos e gorduras residuais, uma vez que pode evitar os problemas citados acima quando se utiliza catalisadores químicos. O uso de óleo residual como matéria-prima para obter biodiesel têm atraído a atenção de vários produtores de biodiesel em nível internacional, devido ao seu potencial de oferta, baixo custo de aquisição e elevado potencial energético (DIB, 2010). Os resultados dos testes de produção de biodiesel por meio do óleo residual indicam rendimentos entre 80 – 97% em média (WANG, 2013).

Rodrigues (2009) obteve excelente rendimento (100%) na produção de biodiesel utilizando óleo de soja e a enzima Lipozyme TL IM. Mesmo rendimento obtiveram Da Rós et al. (2010) na transesterificação do óleo de babaçu. Gamba (2009), utilizando a lipase *Pseudomonas cepacia* PSC-I, obteve rendimento de 90% na transesterificação de óleos vegetais. Utilizando uma lipase comercial imobilizada (LIPOZYME IM) na transesterificação de óleo de mamona, Oliveira et al (2004) obtiveram rendimentos variando de 55,40 % a 100% em diversas condições experimentais para os tempos de 6 a 8 horas de reação. Utilizando óleos de polpa e de amêndoa de dendê, os mesmos autores conseguiram rendimentos que variaram entre 52,30 e 77,45%, mostrando que a composição química do óleo influi diretamente na atividade da lipase.

3.5 Considerações finais

Por meio da revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, pôde-se perceber a grande utilidade das lipases nos diferentes tipos de indústria, especialmente na produção de biodiesel. Entretanto, o custo tem sido um fator restritivo ao seu uso de forma mais ampla pelos diversos setores industriais, ensejando assim a busca por nossos microrganismos produtores e processos mais eficientes.

A produção de lipases depende do tipo de microrganismo usado na fermentação, do tipo de fermentação e de diversas variáveis de processo tais como temperatura, umidade e concentração do indutor

Apesar da fermentação submersa ser a mais utilizada para a produção de lipases, a fermentação em estado sólido apresenta algumas vantagens, tais como simplicidade do processo e economia de energia, além de possibilitar o aproveitamento de resíduos agroindustriais como substrato para a produção enzimática. No sentido de aperfeiçoar a técnica de produção por fermentação em estado sólido, o estudo das condições de produção se torna importante instrumento para a otimização do processo. Assim, o estudo sistemático desses processos e das condições mais apropriadas proporcionam maior conhecimento visando o aumento da produção e a redução do custo, gerando benefícios econômicos e ambientais.

4. Metodologia

A produção de lipases por fermentação no estado sólido utilizando cepas fúngicas seguiu a metodologia descrita na Figura 4.

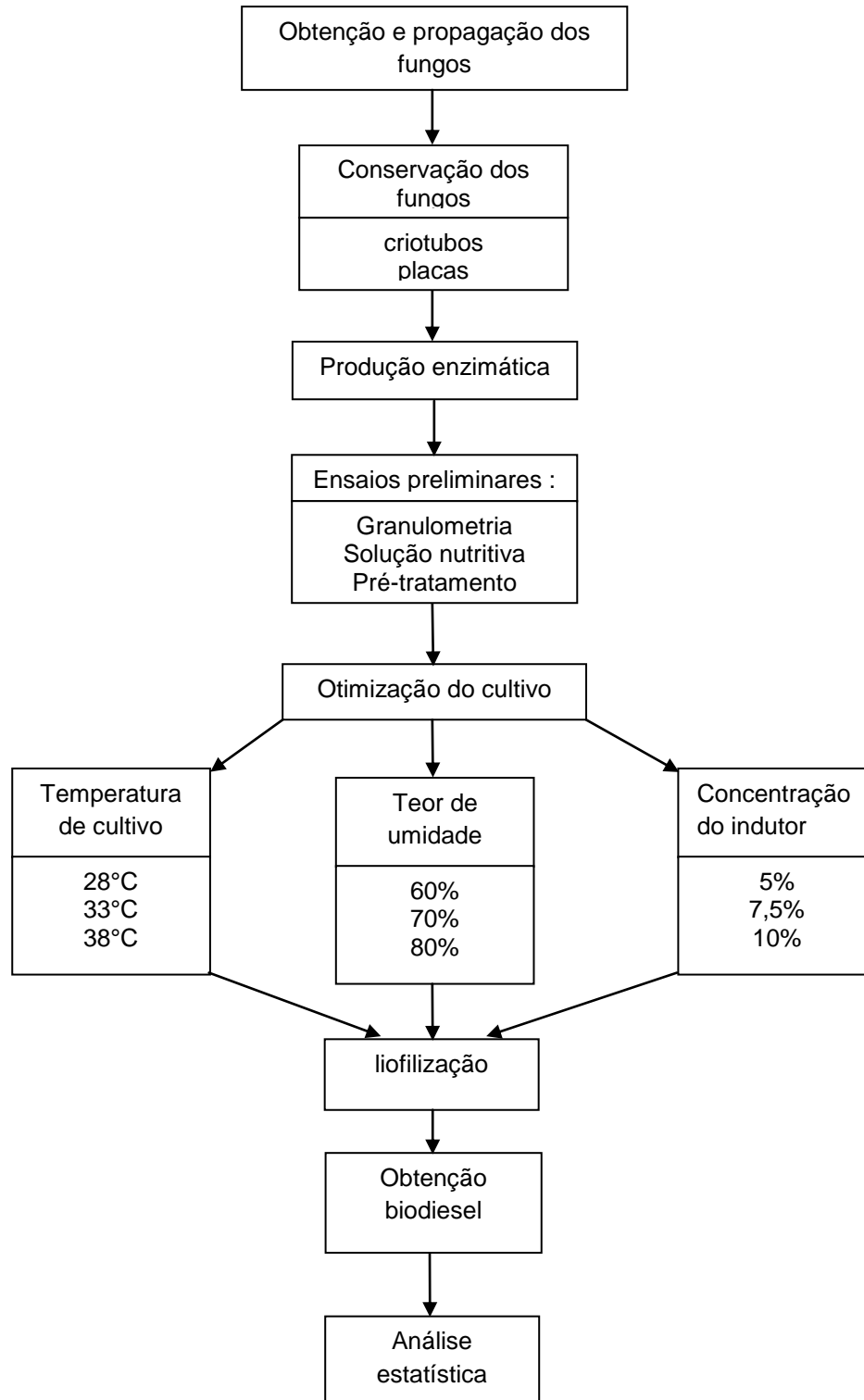


Figura 4.: Fluxograma do processo de produção de lipases no estado sólido até a obtenção do biodiesel.

4.1 Obtenção e conservação dos microrganismos

As cepas fúngicas (*Penicillium sp.* e o *Rhizomucor sp.*) foram isoladas pelo grupo de pesquisa LABSAN/DEA/UFES e os microrganismos foram mantidos em ágar-slant e congelados em solução de glicerol 20% em ultrafreezer a -86°C conforme procedimento descrito abaixo.

4.1.1 Conservação dos microrganismos em baixas temperaturas

Neste trabalho, uma das formas escolhidas para se armazenar os microrganismos foi o congelamento a baixas temperaturas por se mostrar um método mais vantajoso em relação aos demais no que diz respeito à preservação de culturas por longos períodos. Para tanto, fez-se uma suspensão dos microrganismos com uma solução crioprotetora. Essa suspensão foi acondicionada em criotubos e mantida em ultrafreezer a -86°C.

As cepas fúngicas foram repicadas em placas de petri contendo o meio PDA 3,9% e mantidas em estufa por 5 dias a 28°C. Após 5 dias, foi feita a raspagem com 10 mL de uma solução de glicerol 20% (m/V) e as suspensões de esporos de todas as placas foram transferidas para um béquer previamente esterilizado. Uma alíquota da suspensão foi retirada para a contagem de esporos na câmara de Neubauer e, finalmente, em cada criotubo de 1,8 mL foi colocado 1 mL dessa suspensão de esporos. Em seguida, os criotubos foram deixados na geladeira por 40 min. Posteriormente, foram transferidos para o congelador por mais 40 min e, por fim, colocados definitivamente no ultrafreezer a -86°C.

4.1.1.1 Acompanhamento da viabilidade dos fungos mantidos em ultrafreezer

A viabilidade celular foi acompanhada pela esporulação dos fungos utilizando o método de contagem de esporos em câmara de Neubauer. Essa contagem foi realizada antes dos microrganismos serem congelados, após 24 h do congelamento e por 3 vezes num intervalo de 6 meses. A suspensão de esporos contida num criotubo (1 mL) era transferida para um erlenmeyer contendo 99 mL de água destilada previamente esterilizado. Assim, a suspensão ficava com a concentração 10^{-2} . Com uma pipeta estéril, removia-se 1 mL da amostra diluída e transferia-se para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada. Este tubo ficava com a concentração 10^{-3} . A partir do tubo de ensaio com concentração 10^{-3} era retirada uma alíquota de 10 μ L para contagem de esporos em câmara de Neubauer.

4.2 Obtenção do inóculo

Os microrganismos foram cultivados em placas de petri contendo o meio PDA 3,9% (m/V) em estufa a 28°C e o recolhimento dos esporos foi feito com Tween 80 0,1% (V/V) em tampão pH 8. Nessa etapa, foi estudada a cinética de crescimento dos microrganismos.

4.2.1 Esporulação dos fungos

Para determinar o tempo de crescimento, deve-se cultivar o microrganismo em um meio nutriente e após um tempo de incubação, contar o número de células. Neste caso, foram feitas 7 placas contendo o meio sólido PDA 3,9% (m/V) e, em seguida, mantidas em estufa a 28°C por um período de 7 dias. Para se verificar o crescimento celular, a cada 24 h uma das placas era retirada da estufa para contagem de esporos em câmara de Neubauer. A Figura 5 mostra todo o procedimento para diluição dos esporos a fim de se realizar a contagem.



Figura 5: Esquema de diluição para contagem de esporos em câmara de Neubauer

4.3 Obtenção do substrato

Neste caso, o substrato utilizado foi o bagaço de cana-de-açúcar cedido pela DISA (Destilaria Itaúnas S/A). Inicialmente, o bagaço foi seco e guardado no freezer até a sua utilização. Antes de se realizar a fermentação em estado sólido, fez-se um estudo preliminar a fim de verificar qual o melhor método de pré-tratamento deveria ser utilizado. Tal procedimento visa melhorar a disponibilidade de carbono por meio da deslignificação do material. A seguir estão descritas as metodologias utilizadas nos ensaios de pré-tratamento.

4.3.1 Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Nesta etapa, foram estudados dois métodos químicos de pré-tratamento: *peróxido de hidrogênio* e *ácido-básico*. Tais métodos foram escolhidos por apresentarem bons resultados na deslignificação do bagaço conforme reportado em alguns trabalhos. O método do peróxido seguiu uma metodologia adaptada de Nunes et al. (2011). Para tanto, o bagaço peneirado (0,6 – 2,0 mm) foi tratado com uma solução de peróxido de hidrogênio 7,3% (v/v) e o pH ajustado com hidróxido de sódio 5 mol/L até atingir pH 11,5. O sistema foi mantido sob agitação por 1 hora a 25°C. Em seguida, o bagaço foi lavado em torno de 12 vezes e levado à estufa para secar à temperatura de 45°C por 48 h.

O método de tratamento ácido-básico utilizado foi adaptado de Carli et al (2011). Segundo esse método, o material lignocelulósico é submetido a um ácido seguido de uma base eliminando grande parte da lignina e da hemicelulose (Figura 6, a e b).

Em um béquer contendo cerca de 20 g do bagaço previamente seco e peneirado foram adicionados 200 mL de uma solução de ácido sulfúrico 1% (m/V). O material ficou sob agitação por 40 min a 102°C. Em seguida, o material foi filtrado e lavado com água quente, aproximadamente 60°C, até pH neutro. Na seqüência, adicionou-se 200 mL de uma solução de NaOH 7% e manteve-se sob agitação por mais 40 min. Por fim, o material foi filtrado e lavado com água quente até pH neutro, sendo que a última lavagem foi realizada com tampão citrato (pH 4,8).

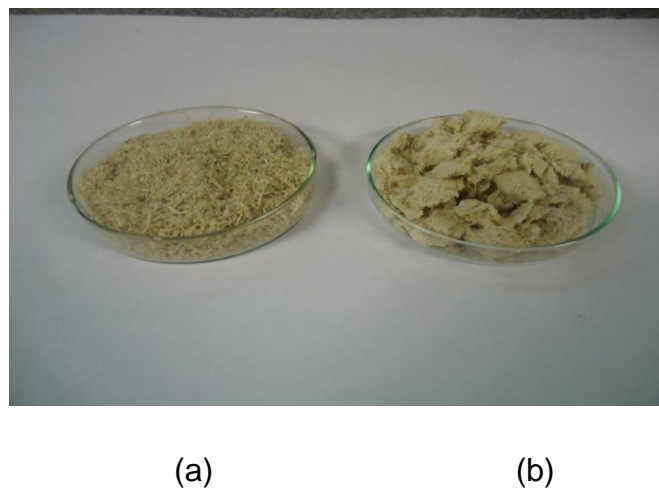


Figura 6: Bagaço de cana peneirado (a) e Tratado com ácido-base (b).

4.3.2 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

Após passar pelo processo de pré-tratamento, fez-se a caracterização do bagaço para a determinação dos materiais lignocelulósicos presentes nas amostras de bagaço *in natura* e nas que foram tratadas conforme item 4.3.1. Neste ensaio seguiu-se a metodologia adaptada de Moraes et al. (2010). Para tanto, foi adicionado 1,0 g da amostra (bagaço *in natura*, tratado com ácido-base e tratado com peróxido) em um balão e 30 mL de ácido sulfúrico (72%) lentamente. A amostra foi mantida

sob agitação por 2 horas em um banho à temperatura de 25°C. Logo após, foram adicionados 560 mL de água destilada ao balão e, em seguida, o sistema foi mantido sob refluxo a uma temperatura de 100°C, para que não ocorresse perda de água (evaporação) durante 4 horas (Figura 7). Depois foi realizada a filtração em funil de placa porosa, previamente tarado, e lavado com 500 mL de água destilada quente (aproximadamente 60°C). O material foi colocado em estufa na temperatura de 105°C, durante 12 horas, e pesado para a quantificação do resíduo insolúvel (lignina).



Figura 7: Refluxo para determinação da lignina de Klason

Para a obtenção da holocelulose, colocou-se em um balão 5 g da amostra e adicionou-se 100 mL de água destilada. O balão foi então colocado em banho-maria a 75°C, adicionado 2,0 mL de ácido acético e 3 g de clorito de sódio, respectivamente. A cada 1 hora essa etapa de adição foi repetida, totalizando 4 repetições. Em seguida a mistura foi resfriada a 10°C em banho de gelo para então ser filtrada em funil de placa porosa, previamente tarado, e lavada com água destilada a 5°C até que o resíduo apresentasse coloração esbranquiçada. O funil com o resíduo foi seco em estufa a 105°C por 6 horas, resfriado em dessecador e pesado para quantificar o rendimento da holocelulose. Em seguida, foram

adicionados 3 g de holocelulose e 100 mL de solução de KOH (5%) em erlenmeyer em uma atmosfera inerte através da injeção de gás nitrogênio durante os 5 minutos iniciais para evitar a oxidação da celulose. O erlenmeyer foi vedado e mantido sob agitação durante 2 horas. A mistura foi filtrada em funil de placa porosa, lavada com 50 mL de solução de KOH (5%) e 100 mL de água destilada. O filtrado foi recolhido em um erlenmeyer de 1L e precipitado com solução de partes iguais de ácido acético e etanol (400 mL). Após três dias de precipitação, a solução foi filtrada e obteve-se a hemicelulose.

Para obtenção da celulose B, o resíduo fibroso retido no funil foi transferido novamente para o erlenmeyer de 250 mL. O mesmo procedimento para a hemicelulose A foi repetido, no entanto, nessa etapa foi utilizada solução de KOH (24%). Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil foram utilizados 25 mL de solução de KOH (24%), 50 mL de água destilada, 25 mL de ácido acético (10%) e 100 mL de água destilada, respectivamente. O filtrado recolhido em erlenmeyer de 1L foi precipitado com uma solução de partes iguais de ácido acético e etanol. Após três dias de precipitação a solução foi filtrada e obteve-se a hemicelulose B. Já o resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. Em seguida, foi lavado com 50 mL de acetona, seco a 105°C e pesado. Esse resíduo era a celulose.

4.4 Produção enzimática

Para a produção de lipases, escolheu-se a técnica de fermentação em estado sólido (FES). A produção aconteceu em erlenmeyers de 250 mL, devidamente tampados, contendo cerca de 10 g do substrato. Os frascos foram autoclavados a 1,0 atm e 121°C por 15 minutos e, após resfriados, a umidade do substrato foi ajustada e inoculada uma suspensão de esporos na concentração 10^8 . Em seguida, os frascos foram mantidos em estufa por 120 h.

Ensaio Preliminares: Os primeiros testes de produção enzimática, denominados de ensaios preliminares, foram realizados com o intuito de selecionar algumas variáveis do processo (granulometria do bagaço, adição de solução salina e tratamento do bagaço), para, em seguida, otimizar as variáveis de maior influência no processo produtivo (temperatura, umidade e concentração do indutor).

Esses ensaios foram realizados com bagaços de cana seco e peneirados com duas diferentes granulometrias, entre 0,6 e 1,18 mm e entre 0,6 e 2,0 mm, umidificado com solução salina ou somente com tampão fosfato pH 7, e também testou-se a influência do bagaço estar *in natura* ou tratado com solução ácido base.

Utilizou-se uma solução salina proposta por Mandels e Reese (1957). Essa solução era composta por: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4 g/L), Uréia (0,3 g/L), KH_2PO_4 (2,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g/L), CaCl_2 (0,3 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 ppm), ZnCl_2 (0,8 ppm), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5 ppm) e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 ppm).

Ensaio de Otimização: Após a realização dos ensaios preliminares, buscou-se a otimização das condições de cultivo. Para isso, foram estudadas a temperatura, o teor de umidade e a concentração do indutor óleo de oliva de acordo com o planejamento experimental 3^3 demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: Variáveis de cultivo e níveis de estudo utilizados na produção enzimática

Níveis Variáveis	-1	0	+1
Temperatura de cultivo	28	33	38
Teor de umidade	60	70	80
Concentração do indutor	5	7,5	10

A Tabela 5 mostra o planejamento experimental dos parâmetros de cultivo para os fungos estudados.

Tabela 5: Parâmetros de cultivo utilizados na produção enzimática

Ensaio	Temperatura de cultivo (°C)	Teor de umidade (%)	Concentração do indutor (%)
1	28	60	5
2	28	70	5
3	28	80	5
4	28	60	7,5
5	28	70	7,5
6	28	80	7,5
7	28	60	10
8	28	70	10
9	28	80	10
10	33	60	5
11	33	70	5
12	33	80	5
13	33	60	7,5
14	33	70	7,5
15	33	80	7,5
16	33	60	10
17	33	70	10
18	33	80	10
19	38	60	5
20	38	70	5
21	38	80	5
22	38	60	7,5
23	38	70	7,5
24	38	80	7,5
25	38	60	10
26	38	70	10
27	38	80	10
28	33	70	7,5*
29	33	70	7,5*

* Dois pontos centrais

4.4.1 Extração da enzima

A enzima foi extraída do material fermentado com 100 mL de solução aquosa de NaCl 2 % (m/v). A mistura de sólido fermentado e a solução extratora foram colocadas em agitador orbital durante 1 h, a 200 rpm e 29°C. A mistura foi filtrada em gaze e o sólido prensado manualmente para extração do líquido, que contém a lipase (Figura 8). O extrato resultante foi centrifugado por 30 min. a 6.000 g. O sobrenadante assim obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática.



Figura 8: Filtração em gaze do extrato bruto

4.4.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade lipásica dos extratos brutos extraídos na etapa anterior foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Silva (2007). Segundo o autor, a mesma pode ser quantificada pela hidrólise do parnitrofenilbutirado (pNPB) em propano-2-ol a 25°C com adição dos extratos. Para esta reação, um volume de 29 mL de tampão fosfato 100 mM pH 8,0, foi adicionado a 1,0mL de solução de pNPB 15 mM em propano-2-ol num reator encamisado, provido de agitação, sendo a reação iniciada pela adição dos extratos (Figura 9). A variação da absorbância a um comprimento de onda de 410 nm em espectrofotômetro foi monitorado por 9 minutos, retirando-se, para isso, aproximadamente 2 mL, a cada 1,5 minutos. Uma unidade de atividade

(U/g) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de pNP por minuto.



Figura 9: Microreator de mistura acoplado ao agitador magnético

4.4.3. Liofilização do extrato bruto

Os extratos enzimáticos brutos obtidos na etapa anterior foram desidratados utilizando a técnica de liofilização. Este processo ocorre por meio da sublimação da água congelada a baixa pressão e temperatura. Para tanto, os extratos que apresentaram maior atividade lipolítica foram distribuídos em camadas de 1 cm de espessura em bandejas e mantidos a -80°C por 24h (PERSSON et al., 2002). Em seguida, as bandejas foram levadas a um liofilizador para remoção da água livre. Logo após, fez-se a determinação da atividade enzimática e as amostras secas foram guardadas em frascos de vidro e mantidas sob refrigeração a 4°C .

4.5 Produção do biodiesel

Obtenção e tratamento da gordura: Para a realização da reação de transesterificação, usou-se uma quantidade de gordura proveniente da caixa de gordura de uma grande empresa de alimentos da região da grande Vitória. Essa gordura passou por um tratamento prévio para remover água e impurezas. Para

tanto, adicionou-se em um béquer 20 g de gordura bruta, 0,5 mL de ácido clorídrico e 100 mL de hexano. O sistema foi mantido sob agitação e aquecimento por alguns minutos até a completa dissolução da gordura. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 500 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sistema possuía 3 fases: água, sujeira sedimentada e gordura dissolvida no hexano. A fase orgânica formada por hexano e a gordura foi retirada com auxílio de uma pipeta e colocada num evaporador rotatório a 50°C até a evaporação total do hexano, restando, no final, apenas a gordura tratada.

Transesterificação enzimática: Colocou-se cerca de 10 g da gordura tratada, conforme procedimento descrito acima, em um erlenmeyer de 250 mL juntamente com 20 mL de hexano e 4,1 mL de etanol (razão molar 1:6, gordura:álcool). Em seguida, adicionou-se cerca de 1 g do extrato lipolítico liofilizado conforme citado no item 4.4.3. O erlenmeyer contendo a mistura reacional foi colocada num shaker e deixado sob agitação de 150 rpm por 24 horas à temperatura de 50°C. Após a reação, os residuais enzimáticos foram retiradas por meio de filtração e o hexano por meio de um evaporador rotatório. Em seguida, o meio contendo ésteres etílicos de ácidos graxos foi lavado com 20 mL de água destilada e centrifugado. A conversão do processo foi calculada acompanhando a redução do índice de acidez de acordo com a Equação 1 (Costa Filho, 2008):

Equação 1:

$$R(\%) = \left(\frac{IAo - I Af}{IAo} \right) \times 100$$

Onde:

R= Rendimento (%)

IAo = Índice de acidez antes da transesterificação

I Af = Índice de acidez após a transesterificação

Determinação dos ácidos graxos e índice de acidez: Para essa determinação, seguiu-se a norma NBR 11115 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Em um erlenmeyer de 250 mL pesou-se cerca de 5 g da amostra. Em seguida, adicionou-se 100 mL de etanol p.a. Posteriormente, gotejou-se 6 gotas de solução de fenolftaleína 0,1% e titulou-se com uma solução de KOH etanólico 0,1N até que ocorresse a viragem do indicador.

O índice de acidez foi calculado de acordo com a Equação 2.

Equação 2.

$$IA \left(\frac{mgKOH}{g} \right) = \frac{V \times N \times 56,11}{m}$$

Onde:

IA = Índice de acidez

V= Volume de KOH gasto na titulação

N = Concentração Normal do KOH

m = Massa da amostra

A porcentagem de ácidos graxos livres (AGL) foi calculada de acordo com a Equação 3.

Equação 3:

$$AG (\%) = \frac{V \times N \times 28,2}{M}$$

Onde:

AG = Ácidos graxos

V= Volume de KOH gasto na titulação

N = Concentração Normal do KOH

M = Massa da amostra

4.6 Análises estatísticas

Para verificar a relação entre as condições de cultivo (temperatura, umidade e indutor) e a produção enzimática, foram realizadas análises estatísticas utilizando o software STATISTICA 7.0.

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada considerando o erro puro. Para dizer se a variável é significativa ou não, foram utilizados os parâmetros estatísticos t e p. O nível de confiança para essas análises foi de 95,0%, o que corresponde a um valor de $p < 0,05$.

Um modelo considerado estatisticamente significativo deve ter um valor de F calculado maior do que o tabelado para que possa ser usado para fins preditivos. Por outro lado, o teste F calculado para se verificar a falta de ajuste do modelo deve apresentar um valor menor do que o valor tabelado. A partir do momento que essas condições forem satisfeitas, o modelo é considerado bom (RABELO, 2010)

4.7 Considerações finais

A metodologia para a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) utilizando duas cepas fúngicas (*Penicillium sp* e *Rhizomucor sp*) passou inicialmente pelo estudo sobre a melhor forma de preservação das cepas que foram obtidas do esgotamento sanitário da região da Grande Vitória. Em seguida, foi realizado um

estudo cinético para se verificar o melhor momento para se obter o inóculo para a fermentação.

A fermentação utilizou como substrato o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido-base e uma solução nutritiva. Seguindo um planejamento experimental 3^3 , foram estudadas a temperatura, a umidade e a concentração do indutor. Os resultados obtidos encontram-se no capítulo seguinte.

5. Resultados e Discussão

5.1 Viabilidade de conservação dos fungos

A análise da conservação dos fungos *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp*. mantidos em ultrafreezer a -86°C foi acompanhada pela contagem do número de esporos em câmara de Neubauer antes do armazenamento (no tempo zero), após 24 h e por três vezes num período de 120 dias. Os resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados obtidos para ensaios de conservação do *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp*

Tempo (dias)	Número de esporos (esporos/mL)	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Rhizomucor sp</i>
0	$4,40 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$
1	$1,90 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$
40	$1,80 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
80	$1,75 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
120	$1,40 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$

A utilização da criopreservação como método de manutenção de microrganismos gera um interesse por parte dos pesquisadores, uma vez que consegue relacionar uma alta taxa de sobrevivência aliada à praticidade de recuperação das células. As Figuras 10 e 11 trazem o acompanhamento da viabilidade celular através da esporulação dos fungos *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp*, respectivamente.

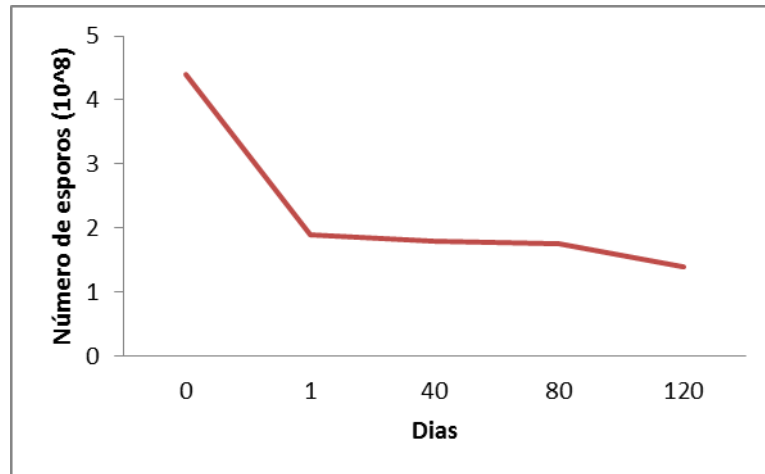


Figura 10: Acompanhamento da viabilidade celular para o *Penicillium sp*

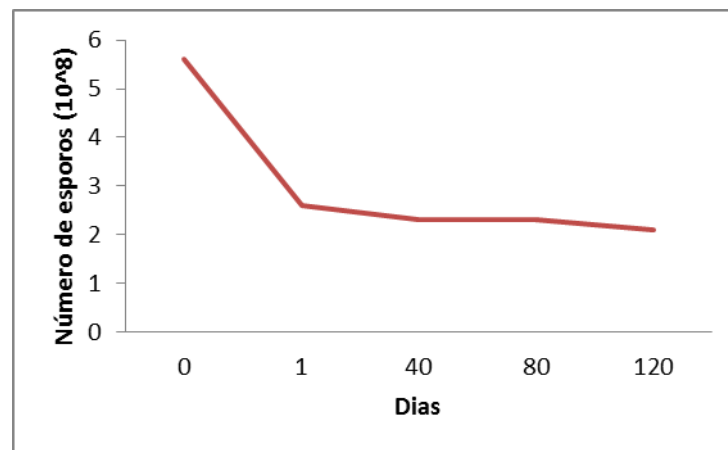


Figura 11: Acompanhamento da viabilidade celular para o *Rhizomucor sp*

Pode-se perceber pelas Figuras 10 e 11, que as células tiveram capacidade de suportar as baixas temperaturas. O momento crítico ocorreu durante o congelamento, quando as células atravessam duas faixas intermediárias de temperatura (+ 19°C a + 8°C e -15°C a - 60°C). Segundo Mazur (1984) e Oliveira (2007), o resfriamento até a temperatura ambiente (20°C) não causa danos. Porém, entre + 19°C e + 8°C o material pode ser severamente lesado. Se o processo não for bem conduzido, pode ocorrer um choque térmico que pode levar a danos irreversíveis à membrana plasmática, ocasionando perda de íons e moléculas intracelulares e consequente redução do metabolismo. Entre -6°C e -15°C, a água no meio começa a cristalizar, enquanto a membrana plasmática impede formação de

cristais de gelo intracelular, ou seja, a água dentro da célula permanece descongelada . Quando o material alcança a temperatura crítica de -60°C , as células ficam relativamente inertes (WATSON, 2000)

Grande parte dos danos causados às células durante o processo de congelamento e descongelamento se deve ao comportamento da água em baixas temperaturas. Ao congelar, a água se expande e na fusão pode recristalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo, capazes de produzir danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos (CASTRO et al., 2011). Para se evitar esses efeitos danosos, são utilizadas substâncias crioprotetoras que atuam nas células por meio de suas propriedades coligativas, levando à redução do ponto crioscópico. Neste trabalho, foi utilizada como crioprotetora uma solução de glicerol 20% (v/v). Cavalcanti (2010) utilizou um processo semelhante para fungos filamentosos, acondicionando os microrganismos em tubos de polipropileno contendo solução de glicerol 10 % e preservando em nitrogênio líquido. O autor concluiu que a preservação dos fungos filamentosos em nitrogênio líquido resultou em elevados índices de viabilidade.

5.2 Acompanhamento da esporulação dos fungos

Para o estudo do efeito do inóculo na produção da enzima, foi inicialmente feita a cinética de crescimento dos microrganismos em meio de ágar-slant. Amostras foram retiradas do meio em determinados intervalos de tempo e foi realizada a contagem de esporos em câmara de Neubauer. Os resultados podem ser observados nas Figuras 12 e 13.

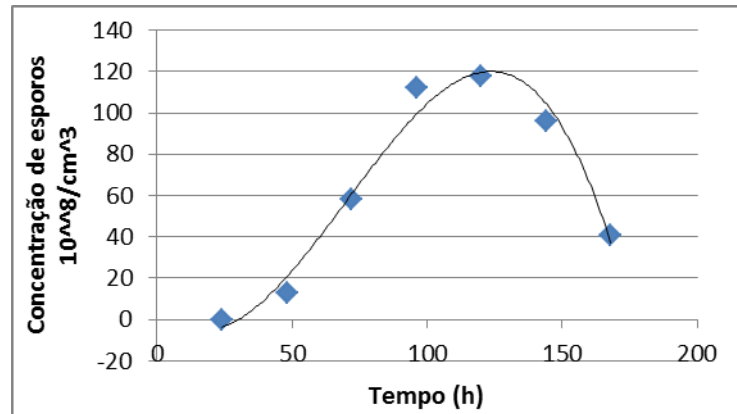


Figura (12): Curva de crescimento do *Penicillium sp.*

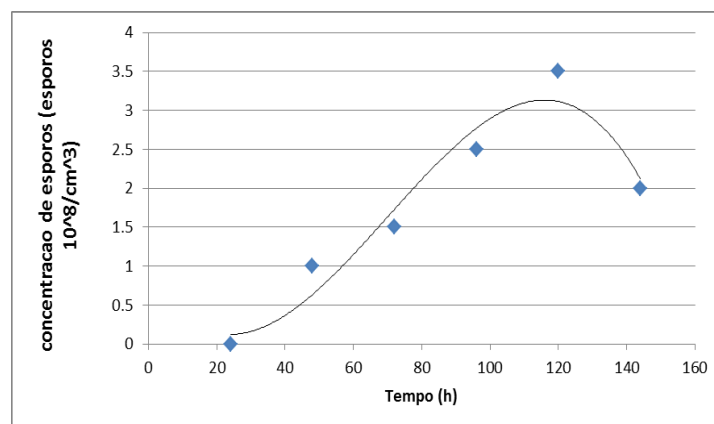


Figura (13): Curva de crescimento do *Rhizomucor sp.*

Observou-se que o crescimento máximo obtido para o *Rhizomucor sp* e para o *Penicillium sp.* ocorreu em torno das 120 h de cultivo, sendo, portanto, selecionado esse tempo para realizar os inoculos nas fermentações.

5.3. Caracterização do substrato

Neste trabalho, o substrato utilizado foi o bagaço de cana cedido pela DISA (Destilaria Itaúnas S/A). Inicialmente, o bagaço foi submetido a um estudo preliminar para se identificar qual melhor método químico deveria ser utilizado no pré-tratamento. Tal procedimento visa melhorar a disponibilidade de celulose para os microrganismos. Para tanto, os métodos testados foram o ácido-base e o peróxido. Em seguida, a fim de se verificar qual dos procedimentos proporcionaria o melhor

rendimento de celulose, fez-se a caracterização do material pré-tratado. Os resultados com os percentuais de celulose, hemicelulose e lignina encontram-se na Tabela 7 .

Tabela 7: Resultados da caracterização do bagaço de cana

Frações	ácido/base (%)	Peróxido (%)	<i>in natura</i> (%)
Lignina	8,1	14,5	22,8
Celulose	62,6	36,5	29,7
hemi A	13,6	27,7	25,2
hemi B	9,6	15,6	13,5
TOTAL	93,9	94,3	91,2

A partir dos dados da Tabela 7 é possível observar que os resultados obtidos nos processos utilizados para o pré-tratamento melhoraram a disponibilidade de celulose em ambos os métodos quando comparado com o bagaço sem tratamento, sendo que a maior porcentagem de celulose disponível (62,6%) foi obtida utilizando-se o pré-tratamento feito com ácido e base. A metodologia de pré-tratamento ácido-base do bagaço de cana utilizada neste trabalho foi adaptada de Carli et al (2011). Os autores obtiveram uma porcentagem de celulose de 75,2%, 13,1% de hemicelulose e 12,4% de lignina. A diferença se deve ao fato que na metodologia proposta por Carli et al. (2011), o processo ocorre em sistema fechado com a temperatura alcançando 120°C, enquanto neste trabalho a temperatura do sistema aberto não ultrapassou 102°C.

Esse pré-tratamento é importante porque o bagaço de cana é um material lignocelulósico resistente ao ataque de microrganismos e/ou enzimas em função das suas características morfológicas, formada basicamente por um compósito de microfibras de celulose envolvidas numa matriz amorfa de polioses e lignina, que atuam como uma barreira e impedem o acesso dos microrganismos (FENGEL; WEGENER, 1989). Segundo Wood e Saddler (1988), os tratamentos químicos em

meio básico extraem as polioses e a lignina, separando da celulose; e os tratamentos em meio ácido hidrolisam e solubilizam dos polissacarídeos.

5.4 Produção enzimática

5.4.1. Ensaio preliminares

Antes de se realizar a produção enzimática, foram feitos testes preliminares com o objetivo de se investigar a influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar, o uso de uma solução nutritiva e do pré-tratamento do bagaço. Os resultados podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados das atividades enzimáticas (UI/g) relativas ao estudo de granulometria, do uso de solução nutritiva e do pré- tratamento do bagaço de cana

Microrganismo	Bagaço <i>in natura</i>				Bagaço tratado com ácido-base	
	Granulometria (0,6 – 1,18 mm)		Granulometria (0,6 – 2,00 mm)		Tampão fosfato pH 7	Solução nutritiva
	Tampão fosfato pH 7	Solução nutritiva	Tampão fosfato pH 7	Solução nutritiva		
<i>Penicillium sp.</i>	0,021	0,345	0,019	0,337	0,028	0,379
<i>Rhizomucor sp.</i>	0,039	0,397	0,027	0,365	0,017	0,488

Como pode ser observado na Tabela 8, os diferentes tipos de granulometria do bagaço de cana *in natura* pouco influenciaram a produção enzimática. Diferentemente, o uso de uma solução nutritiva mostrou-se bastante efetiva no

aumento da produção enzimática. Sendo assim, escolheu-se trabalhar com o intervalo de granulometria entre 0,6 e 2,0 mm de modo a aproveitar melhor o bagaço e utilizar uma solução nutritiva.

5.4.2. Otimização da produção enzimática

Após os ensaios preliminares, foi realizada a produção enzimática utilizando o bagaço de cana moído, peneirado até granulometria entre 0,6 e 2,0mm de diâmetro e pré-tratado com ácido-base conforme procedimento apresentado no item 4.3.1. Foram estudadas a temperatura de cultivo (28, 33 e 38°C), o teor de umidade (60, 70 e 80%) e a concentração do indutor (5, 7,5 e 10%) para o tempo de cultivo de 120 horas para os microrganismos *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp.* (Figura 14).



Figura 14: Fermentação em Estado sólido do *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp.*

Para a realização desses experimentos, foi utilizado um planejamento fatorial do tipo 3^3 , com 2 pontos centrais, totalizando 29 experimentos. Os resultados obtidos para os microrganismos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de atividades enzimáticas relativas à produção de lipases utilizando o *Penicillium sp* e o *Rhizomucor sp* em diferentes condições de cultivo (continua)

Ensaio	Temperatura de cultivo (°C)	Teor de umidade (%)	Concentração do indutor (%)	Atividade enzimática	
				UI/gss*	
				<i>Penicillium sp</i>	<i>Rhizomucor sp</i>
1	28	60	5	0,142	0,219
2	28	70	5	0,156	0,240
3	28	80	5	0,211	0,333
4	28	60	7,5	0,144	0,227
5	28	70	7,5	0,167	0,260
6	28	80	7,5	0,243	0,345
7	28	60	10	0,189	0,289
8	28	70	10	0,199	0,298
9	28	80	10	0,301	0,412
10	33	60	5	0,144	0,222
11	33	70	5	0,166	0,257
12	33	80	5	0,234	0,320
13	33	60	7,5	0,168	0,238
14	33	70	7,5	0,186	0,259
15	33	80	7,5	0,366	0,502
16	33	60	10	0,179	0,256
17	33	70	10	0,234	0,295
18	33	80	10	0,470	0,583

Tabela 9: Valores de atividades enzimáticas relativas à produção de lipases utilizando o *Penicillium sp* e o *Rhizomucor sp* em diferentes condições de cultivo (conclusão)

Ensaio	Temperatura de cultivo (°C)	Teor de umidade (%)	Concentração do indutor (%)	Atividade enzimática	
				UI/g _{ss} *	
				<i>Penicillium sp</i>	<i>Rhizomucor sp</i>
19	38	60	5	0,154	0,224
20	38	70	5	0,172	0,267
21	38	80	5	0,342	0,335
22	38	60	7,5	0,135	0,247
23	38	70	7,5	0,187	0,301
24	38	80	7,5	0,198	0,321
25	38	60	10	0,135	0,239
26	38	70	10	0,177	0,288
27	38	80	10	0,187	0,335
28	33	70	7,5	0,170	0,267
29	33	70	7,5	0,188	0,271

* gss: grama de substrato seco

Como pode ser observado na tabela 9, a máxima produção obtida (0,470 UI/g_{ss}) para o *Penicillium sp* foi realizada nas condições de 33°C, 80% de umidade e 10% do indutor. O mesmo comportamento pode ser observado ao se analisar a produção do *Rhizomucor sp*, cuja atividade máxima (0,583 UI/g_{ss}) também foi obtida nessas condições.

5.4.2.1 Análise estatística da produção enzimática do *Penicillium sp.*

A análise dos efeitos principais e das interações das variáveis para produção enzimática utilizando o bagaço de cana pré-tratado e o *Penicillium sp.* pode ser vista na Tabela 10.

Tabela 10: Coeficientes de regressão para a produção enzimática do *Penicillium sp.*

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(19)	p
Média	0,205534	0,009372	21,93009	*0,000000
Temperatura (°C) (L)**	-0,003611	0,023538	-0,30683	0,762313
Temperatura (°C) (Q)***	0,021717	0,019365	2,24296	*0,037019
Umidade (%) (L)	0,064556	0,023538	5,48511	*0,000027
Umidade (%) (Q)	-0,020199	0,019365	-2,08615	0,050684
Indutor (%) (L)	0,019444	0,023538	1,65214	0,114936
Indutor (%) (Q)	-0,007699	0,019365	-0,79516	0,436339
1*2	0,001917	0,028829	0,13297	0,895616
1*3	-0,029083	0,028829	-2,01767	0,057974
2*3	0,009000	0,028829	0,62438	0,539804

* Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

** (L) Linear

*** (Q) Quadrática

Pode-se perceber ao analisar a Tabela 10 que apenas a Temperatura (Q) e Umidade (L) foram significativas a 95% de confiança. Para os demais fatores e interações, o p valor foi maior que 0,05. Assim, estes efeitos e interações foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais. Todos os efeitos podem ser observados na Figura 15.

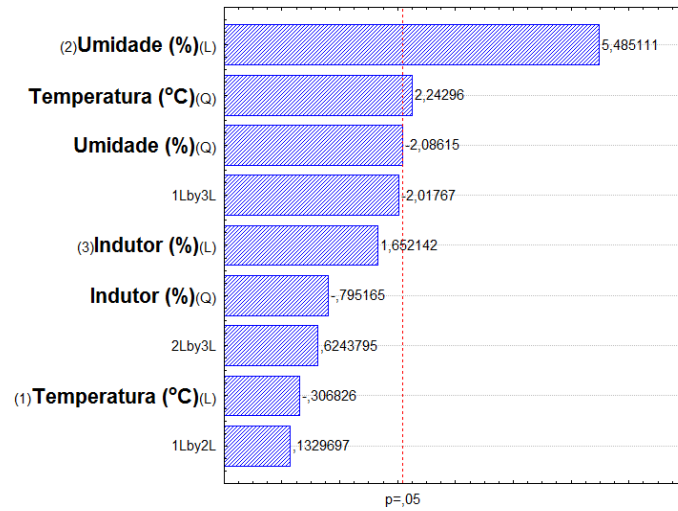


Figura 15: Diagrama de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis da produção enzimática do *Penicillium sp* com 95% de confiança

A análise da variância (ANOVA) com os fatores significativos é mostrada na Tabela 11.

Tabela 11: Análise da variância (ANOVA) da produção enzimática do *Penicillium sp*.

Fator	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	Teste p
Temperatura (Q)	0,009182	1	0,009182	3,01967	0,094093
Umidade (L)	0,075014	1	0,075014	24,67003	0,000037
Erro	0,079058	26	0,003041		
Total	0,163253	28			

R= 0,70982

A Figura 16 apresenta uma comparação entre os valores observados experimentalmente e aqueles preditos pelo modelo. Observa-se que os valores estão um pouco dispersos em torno da reta representativa. Isto deve ao baixo coeficiente de regressão.

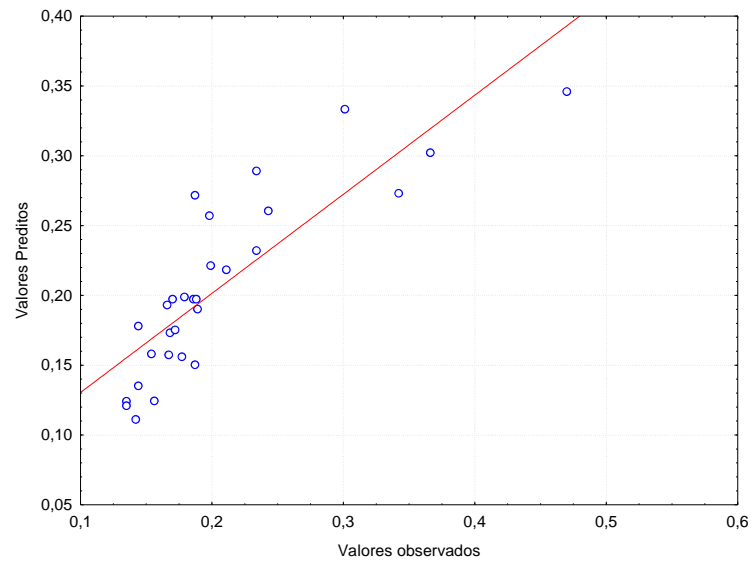


Figura 16: Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais da produção enzimática do *Penicillium sp.* obtidos pelo planejamento experimental 3^3 .

Com base nos valores de regressão estatisticamente significativos observados na tabela 10, a produção enzimática do *Penicillium sp.* pode ser estimada pela Equação 4.

Equação 4: Produção Enzimática (UI/gss)= $0,205534 + 0,021717T^2 + 0,064556U$

A superfície de resposta considerando apenas os efeitos significativos são apresentados na Figura 17.

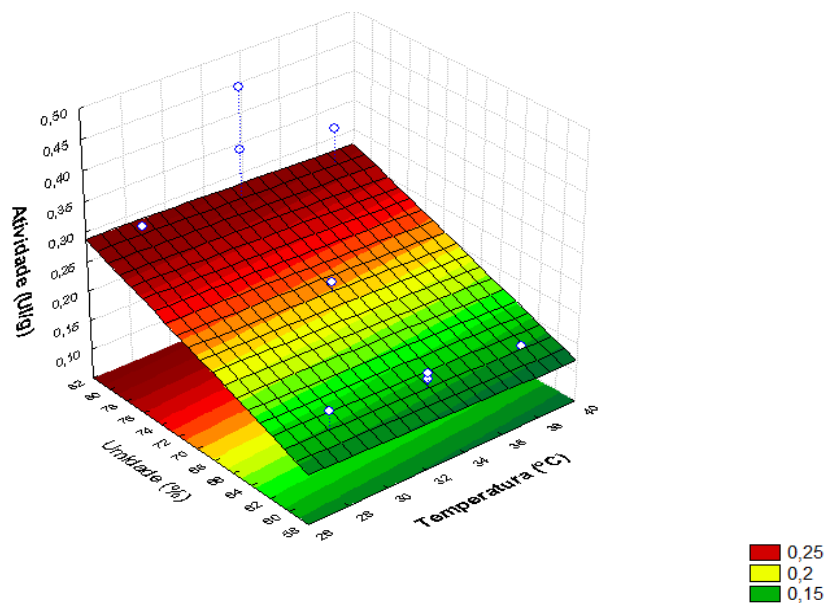


Figura 17: Superfície de resposta para a produção enzimática do *Penicillium sp.*

Pode-se observar na Figura 17 que a produção enzimática aumenta com o aumento da temperatura e umidade.

5.4.2.2 Análise estatística da produção enzimática do *Rhizomucor sp.*

A análise dos efeitos principais e das interações das variáveis para produção enzimática utilizando o bagaço de cana pré-tratado e o *Rizhomucor sp.* pode ser vista na Tabela 12.

Tabela 12: Coeficientes de regressão da produção enzimática do *Rizhomucor sp.*

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(19)	p
Média	0,298992	0,009198	32,50674	*0,000000
Temperatura (°C) (L)**	-0,003667	0,023100	-0,31745	0,754362
Temperatura (°C) (Q)***	0,016821	0,019005	1,77021	0,092737
Umidade (%) (L)	0,073611	0,023100	6,37312	*0,000004
Umidade (%) (Q)	-0,022096	0,019005	2,32527	*0,031286
Indutor (%) (L)	0,032111	0,023100	2,78012	*0,011929
Indutor (%) (Q)	-0,002512	0,019005	0,26438	0,794336
1*2	-0,006167	0,028292	0,43593	0,667802
1*3	-0,014250	0,028292	1,00734	0,326427
2*3	0,018583	0,028292	1,31367	0,204599

* Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

** (L) Linear

*** (Q) Quadrática

Pode-se perceber ao analisar a Tabela 12 que a Umidade (L), a Umidade (Q) e o indutor (L) foram significativos a 95% de confiança. Todos os efeitos podem ser observados na Figura 18

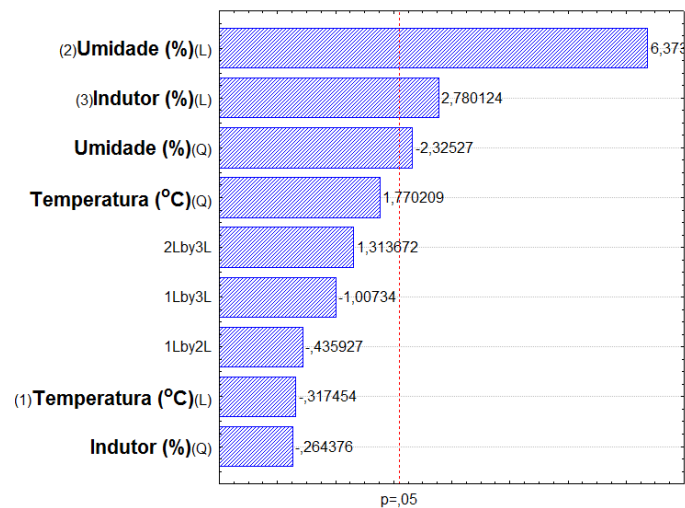


Figura 18: Diagrama de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis da produção enzimática do *Rhizomucor sp* com 95% de confiança

As variáveis, temperatura (L), temperatura (Q), indutor (Q) e as interações temperatura/umidade, temperatura/indutor e umidade/indutor apresentaram valor $p > 0,05$, sendo assim considerados erros aleatórios experimentais e, portanto, não significativos. A análise da variância (ANOVA) é mostrada na Tabela 13.

Tabela 13: Análise da variância (ANOVA) da produção enzimática do *Rhizomucor sp*.

Fator	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	Teste p
Umidade L +Q	0,108857	2	0,054428	22,51243	0,000003
Indutor (L)	0,018560	1	0,018560	7,67679	0,010399
Erro	0,060443	25	0,002418		
Total	0,187860	28			

R = 0,75713

A Figura 19 apresenta uma comparação entre os valores observados experimentalmente e aqueles preditos pelo modelo. Observa-se que os valores estão um pouco dispersos em torno da reta representativa em virtude do baixo coeficiente de regressão.

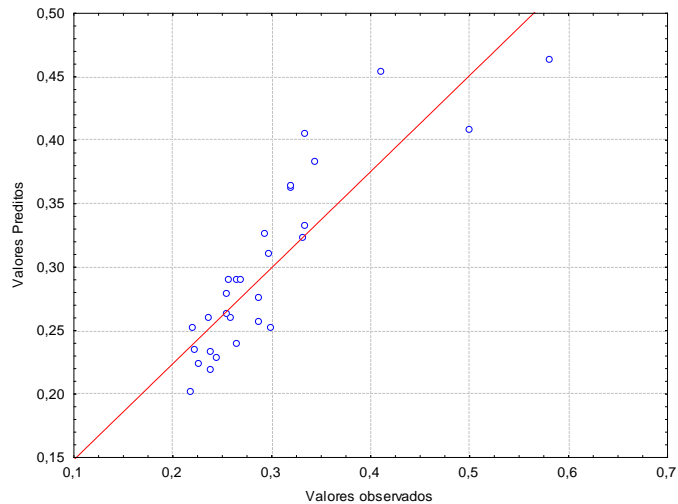


Figura 19: Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais da produção enzimática do *Rhizomucor sp.* obtidos pelo planejamento experimental 3³.

Com base nos valores de regressão estatisticamente significativos observados na tabela 12, a produção enzimática do *Rhizomucor sp* pode ser estimada pela Equação 3.

$$\text{Equação 5: Produção Enzimática (UI/gss)} = 0,298992 + 0,073611U - 0,022096U^2 + 0,032111U$$

A superfície de resposta considerando apenas os efeitos significativos são apresentados na Figura 20.

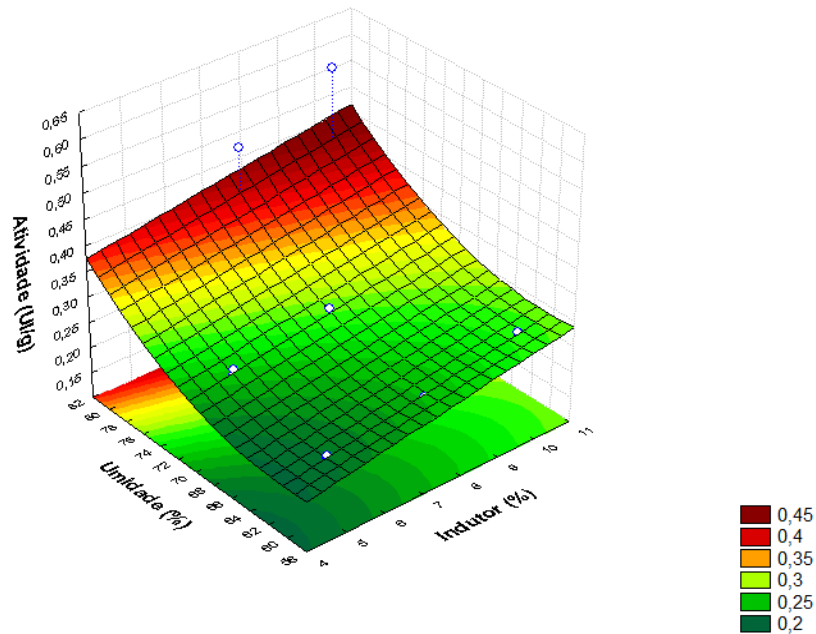


Figura 20: Superfície de resposta para a produção enzimática do *Rhizomucor sp.*

Pode-se observar ao analisar a Figura 20 que a maior produção enzimática ocorre quando são utilizados valores de indutor e umidade mais elevados.

5.5 Produção do biodiesel

Para a produção do biodiesel, os extratos dos microrganismos que apresentaram maior atividade enzimática foram liofilizados e utilizados na reação de transesterificação. Na reação, utilizou-se uma gordura proveniente da caixa de uma grande empresa da região da Grande Vitória. Antes da reação, determinou-se o Teor de ácidos graxos livres e de acidez da gordura e atividade lipásica do extrato bruto. Os resultados estão na Tabela 14.

Tabela 14. Teores de ácidos graxos e acidez da gordura utilizada na produção do biodiesel

Análise	
Teor de Ácidos Graxos Livres (%)	36,66
Acidez (mg KOH/g)	72,94

Os resultados da reação de transesterificação para a produção do biodiesel encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados da transesterificação enzimática da gordura utilizando extratos liofilizados

Rendimento (%)	
<i>Rhizomucor sp</i>	<i>Penicillium sp</i>
59,47	56,72

Como pode ser observado na Tabela 15, o rendimento do extrato do *Rhizomucor sp* (59,47%) foi ligeiramente superior ao do *Penicillium sp* (56,72%). Trabalhos encontrados na literatura apresentam bons rendimentos na produção do biodiesel utilizando a rota enzimática. Rodrigues (2009) conseguiu 100% de conversão na transesterificação de óleos vegetais utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosa*. Utilizando a lipase de *Pseudomonas cepacia* PSC-I, Gamba (2009) obteve 90% de conversão na transesterificação de óleos vegetais. Lima (2013) produziu biodiesel a partir de lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-sílica e obteve rendimento de 100%. Segundo Lima (2013), na literatura são reportados trabalhos que obtiveram rendimento variando de 87% a 100% na produção de biodiesel tendo como fonte de triglicerídeos o óleo de soja.

Essa diferença observada quando se utilizou lipases comerciais para a produção do biodiesel se deve ao fato de que essas enzimas são purificadas, enquanto que o extrato liofilizado utilizado neste trabalho continha várias impurezas, como por exemplo, o cloreto de sódio utilizado na solução extratora.

6. CONCLUSÕES

Os fungos *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp*. foram capazes de produzir lipases por Fermentação em Estado Sólido (FES) tendo como substrato o bagaço de cana-de-açúcar e como indutor o óleo de oliva, variável conforme os parâmetros experimentais utilizados.

O *Penicillium sp* apresentou a maior atividade lipásica (0,470 UI/g_{ss}) nas condições de 33°C, 80% de umidade e 10% do indutor, sendo que a análise estatística indicou que apenas a temperatura e a umidade influenciaram significativamente os resultados.

O *Rhizomucor sp* apresentou a maior atividade lipásica (0,583 UI/g_{ss}) também nas condições de 33°C, 80% de umidade e 10% do indutor, porém, com contribuição significativa apenas da umidade e do indutor.

O bagaço de cana-de-açúcar mostrou-se viável como substrato para a fermentação em estado sólido visando a produção de lipases extracelulares pelos fungos estudados principalmente quando pré-tratado e umedecido com uma solução nutritiva.

As lipases produzidas mostraram-se eficientes na produção do biodiesel. O melhor rendimento foi obtido com o extrato bruto do *Rhizomucor sp* (59,47%) para utilização no processo de catálise enzimática para produção de biodiesel, a partir da matéria prima utilizada.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Como foi possível produzir lipases a partir das cepas fúngicas, sugere-se como propostas de trabalhos futuros:

- Produzir lipases utilizando *Penicillium sp* e *Rhizomucor sp*. utilizando outros substratos e indutores, isoladamente ou combinados com o bagaço de cana-de-açúcar;
- Estudar a utilização de outra combinação de nutrientes na solução nutritiva para a otimização da produção enzimática.
- Variar parâmetros relacionados às condições de incubação na condução do processo de fermentação em estado sólido.
- Isolar, selecionar e avaliar outros fungos filamentosos em relação ao potencial de produção de lipase em fermentação em estado sólido.

8. Referências Bibliográficas

AL-ZURAIR, S.; LING, F.W.; JUN, L.S. Proposed Kinetic Mechanism of Production of Biodiesel from Palm Oil Using Lipase. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 951-960, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 11115: Insumos - Substâncias graxas - Determinação do índice de acidez, 2014.

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, p. 9-14. 2010.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, p. 73-81, 2002.

BRITO, R. R. de. Isolamento de fungos produtores de lipases catalisadoras de reações de transesterificação para produção de biodiesel. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia aplicada) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

CARLI, C. M. de; CRUZ, A. J. G.; SILVA, R. G. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com alta carga de sólidos para produção do bioetanol. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caixas do Sul, RS, 24 a 27 de julho de 2011.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA, G. G. Jr.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentation. *Biochem. Eng. J.* 4, p. 239-247, 2000.

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

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares:

características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 39, n.2, p. 1-18, 2011.

CAVALCANTI, S. D. B. Aplicação de metodologia de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *spergillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 193-197, 2004.

CORADI, G. V. Produção de lipase por *Fusarium oxysporum* em Fermentação em Estado Sólido e sua aplicação em reações de síntese de ésteres de biodiesel. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

COSTA FILHO, E. H. C. Estudo da produção enzimática de biodiesel utilizando óleo residual e etanol. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

COSTA NETO, P. R., ROSSI, L. F., ZAGONEL, G. F., RAMOS, L. P. The utilization of used frying oil for the production of biodiesel. *Química Nova*, 23(4), 531-537, 2000.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *J. Food Eng.*, v. 22 (3), p. 211-219, 2005.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.: Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 776-792, 2009.

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

DA RÓS, P. C. M; SILVA, G. A. M; MENDES, A. A; SANTOS, J. C; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5508-5516, 2010.

DIB, F.H. Produção de biodiesel a partir de óleo residual reciclado e realização de testes comparativos com outros tipos de biodiesel e proporções de mistura em um Moto-Gerador. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" - Faculdade De Engenharia De Ilha Solteira, São Paulo.

ELLIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; THAER TALED, A.; ADINARAYANA, K . Production of lipase by immobilized cells of aspergillus niger. *Process Biochemistry*, v. 39, 525-528, 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood – Chemistry, ultrastructure and reactions*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1989.

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

FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

FERRAREZI, A. L. Seleção de fungos termofílicos para a produção de lipase e aplicação na produção de biodiesel. 2011. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

GAMBA, M. Produção de Biodiesel através de catálise enzimática em líquido iônico. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

GERIS,R.; SANTOS, N. A. C. dos; AMARAL, B. A.; MAIA, I. de SOUZA; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M.: Biodiesel de soja: Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 5, 1369-1373, 2007.

GHOSH, P. K., SAXENA, R. K., GUPTA, R., YADAV, R. P., DAVIDSON, S. Microbial lipases: production and applications. *Science progress*,79 (2), 119-158, 1996.

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

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. World Energy Outlook 2012.Sumário – Portuguese Translation. França. 2012. p7. Disponível em: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/Portuguese.pdf>. Acesso em: 11 de novembro 2014.>

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

KRAWCZYK, T., Biodiesel: Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *INFORM 7*, 1996, p. 801-829.

LIMA, L. N. de. Síntese enzimática de ésteres catalisada por lipases imobilizadas em diferentes suportes. 2013. 152 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol Biotechnol*, v. 41(2):105–10, 2003.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 7, 258-265, 1985.

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

MALDONADO, R.R. Produção, purificação e caracterização da lipase *Geotrichum candidum* obtida a partir de meio industriais. 2006. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de engenharia de alimentos, Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Federal de Campinas, Campinas, SP.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in *trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol.* Feb; 73(2): 269–278, 1957.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, Baltimore, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.

MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA. Resenha Energética Brasileira. Resultados de 2014. Junho de 2015, Brasília, DF.

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

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. de F.; MARCONCINI, J. M. Procedimentos para análise lignocelulósica. EMBRAPA, Campina Grande, PB, 54p., 2010.

MOURA, A. S. de (Org.). A política Nacional de Biodiesel e o desenvolvimento sustentável no nordeste do Brasil. Curitiba, CRV, 284p., 2012

NAGY, V.; TOKE, E. R.; KEONG, L. C.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; OMAR, I. C.; SZAKÁCS, G.; POPPE, L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 39, p. 141-148, 2006.

NUNES, J. M. N.; CARVALHO, P. I. N. de; PINHEIRO, I. R. Estudo da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio. XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Caxias do Sul, RS, 24 a 27 julho de 2011.

OLIVEIRA, C. H. Avaliação das características do espermatozoide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; FACCIO, C.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 24 (2): 178-182, 2004.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R. NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of enzymes. *Current Science*, v. 77, no. 1, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SINGH-NEE NIGAM, P. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals in applications. New Delhi: Asiatech, 221 p, 2001

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 81-84, 2003.

PARAJE, M. G.; CORREA, S. G.; RENNA, M. S.; THEUMER, M.; SOTOMAYOR, C. E. Candida albicans-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Can. J. Microbiol.* , v. 54, p. 647-659, 2008

PARK, E.Y., SATO, M., KOJIMA, S. Fatty acid methyl ester production using lipase immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 889–896, 2006.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; PATRICK ADLERCREUTZ P. Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 31, p. 833–841, 2002.

PINTO, A. C. GUARIEIRO, L. L. N; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. de P. ANDRADE, J. B. de. Biodiesel: An Overview. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 16, no. 6B, 1313-1330, 2005.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

RAHARDJO, Y. S. P.; JOLINK, F.; HAEMERS, S.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Significance of bed porosity, bran and specific surface area in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae*. *Biomolecular Engineering*. v. 22, n. 4, p. 133-139, 2005.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R. da.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de produção de biodiesel. *Rev. Virtual Quim.*, 2011, 3 (5), 385-405.

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

RIBEIRO, B. D. et al. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production Enzyme Research Volume 2011, Article ID 615803, 16 pages doi:10.4061/2011/615803.

RINALDI, R., GARCIA, C., MARCINIUK, L. L., ROSSI, A. V., SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. *Química Nova*, 30 (5), 1374, 2007.

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, p.2264-2269, 2006.

RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. 2009.171 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

SHAFEI, M.S.; ALLAM, R. F. Production and immobilization of partially purified lipase from *Penicillium chrysogenum*. *Malays. J. Microbiol.* 6, 196, 2010.

SHRESTHA, P.; KHANAL, S. K., POMETTO III, A. L., VAN LEEUWEN, J. Enzyme production by wood-rot and soft-rot fungi cultivated on corn fiber followed by simultaneous saccharification and fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 4156-4161, 2009.

SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.de; LUCCIO, M. D.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, V.; TREICHER, H. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess Biosyst Eng.*, v. 34, p. 145-152, 2011.

SILVA, J.A. Preparação de Biocatalisadores Utilizando Lipase de *Cândida antractica* Tipo B Imobilizada para Síntese de Ésteres de Vitamina A. 2007. 80 f Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, UFC, Ceará.

SOARES, C. P. B.; OLIVEIRA, M. L. R. Equações para estimar a quantidade de carbono na parte aérea de árvores de eucalipto em Viçosa, Minas Gerais. *Viçosa, MG.* 2002, v.26, n. 5, p. 533-539.

SUN, X. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 219-224, 2008.

UEDA, M. TAKAHASHI, S.; WASHIDA, M.; SHIRAGA, S.; TANAKA, A. Expression of *Rhizopus oryzae* lipase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 17:113–24, 2002

VARGAS, G. D. L. P. et al. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 83, n. 1, p. 47-54, 2008

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

WANG, L. Life Cycle Assessment of Biodiesel Production from Waste Cooking Oil in Western Australia. In: 3rd International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences (ICCEES'2013) January 4-5, 2013 Bali (Indonesia). Disponível em: <http://psrcentre.org/images/extraimages/113003.pdf>. Acessado em Maio 2013.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, London, [online], v.60/61, p.481-492, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844218>. Acessado em 30 de julho de 2015.

WOLSKI, E.; MENUSI, E., REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; TREICHEL, H. Partial Characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. *LWT – Food Science and Technology*, v. 42, p. 1557-1560, 2009.

WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. *Methods Enzymol.*, 160, 3-11, 1988.

YADAV, K. N. S.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V.; Gokhale, D. V. . Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 10663-10670, 2011.

XU, Y.; WANG, D.; MU, X. Q.; ZHAO, G. A.; Zhang, K. C. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 18, p. 29-37, 2002.