

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 23/02/2019.

## **Grãos de Destilaria como Fonte Indireta de Lipases: Produção, Caracterização e Aplicação**

**BRUNA CAPOVILLE**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Campus de Botucatu,  
UNESP, para a obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia.**

**Botucatu - SP**

**Fevereiro de 2017**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**

**LABORATÓRIO DE BIOPROCESSOS**

**Grãos de Destilaria como Fonte Indireta de Lipases: Produção,  
Caracterização e Aplicação**

**BRUNA CAPOVILLE**

**Prof<sup>a</sup>. Adj<sup>a</sup>. LUCIANA FRANCISCO FLEURI**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,  
para a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia.**

**Botucatu - SP**

**Fevereiro de 2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Capoville, Bruna.

Grãos de destilaria como fonte indireta de lipases :  
produção, caracterização e aplicação / Bruna Capoville. -  
Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Luciana Francisco Fleuri

Capes: 90400003

1. Resíduos agrícolas. 2. Fermentação. 3. Lipase.  
4. Antioxidantes. 5. Sorgo. 6. Milho. 7. Enzimas de  
fungos.

Palavras-chave: Ação anticarcinogênica; Ação  
antimicrobiana; Atividade antioxidante; DDGS; Fermentação  
em estado sólido; Lipases fúngicas.

## ***AGRADECIMENTOS***

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de incentivo à pesquisa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio financeiro para manutenção e melhoria em equipamentos do laboratório (processo 2015/01753-8);

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e ao Departamento de Química e Bioquímica pelo suporte técnico e estrutural;

Às parcerias com o Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, através da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Ortiz Mayo, e com o Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular – LaBio, através do Prof. Dr. Willian Zambuzzi;

À professora adjunta Luciana Francisco Fleuri pela orientação, apoio e disponibilidade em ajudar, dentro e fora do laboratório;

À minha família, Neide, Claudiné, Laysa e Mel, fontes de luz em momentos de escuridão.

## SUMÁRIO

### Índice Geral

Resumo.....	14
<i>Abstract</i> .....	15
1. Introdução.....	16
2. Objetivos Do Trabalho.....	19
3. Revisão Bibliográfica.....	19
3.1. Fermentação Em Estado Sólido.....	19
3.2. " <i>Distiller's Dried Grains With Solubles</i> " (Grãos Secos De Destilaria Com Solúveis).....	21
3.3. Produção De Lipases Para Aplicação Em Reações De Hidrólise.....	26
3.4. Produção De Lipases Para Aplicação Em Reações De Síntese.....	28
- Esterificação.....	28
- Alcoólise.....	30
3.5. Produtos De Reações Catalisadas Por Lipases.....	32
4. Material E Métodos.....	33
4.1. Triagem De Micro-Organismos Produtores De Lipases.....	33
4.2. Determinação Da Atividade De Lipases.....	34
- Atividade de Hidrólise.....	34
- Atividade de Esterificação.....	35
- Determinação de Proteínas Totais.....	35
4.3. Concentração Enzimática.....	36

4.4. Caracterização Das Lipases.....	37
- Especificidade.....	37
- Regioespecificidade.....	38
- Massa Molecular.....	39
4.5. Otimização Da Produção De Lipases.....	39
4.6. Aplicação Das Lipases.....	40
- Biorremediação de Óleos Vegetais.....	41
- Produção de Biodiesel.....	41
4.7. Perfil Dos Produtos De Reações.....	42
4.8. Atividades Biológicas De Produtos De Reações.....	43
- Atividade Antioxidante.....	44
- Efeito sobre Viabilidade Celular.....	44
- Atividade Antibacteriana.....	45
- Atividade Antifúngica.....	46
5. Resultados E Discussão.....	46
5.1. Triagem De Micro-Organismos E Atividades De Lipases.....	46
5.2. Concentração Enzimática.....	48
5.3. Caracterização Das Lipases.....	50
- Especificidade.....	50
- Regioespecificidade.....	53
- Massa Molecular.....	55
5.4. Otimização Da Produção De Lipases.....	57
5.5. Aplicação Das Lipases.....	59

- Biorremediação de Óleos Vegetais.....	60
- Produção de Biodiesel.....	60
5.6. Perfil De Produtos De Reações.....	61
5.7. Atividades Biológicas De Produtos De Reações.....	65
- Atividade Antioxidante.....	65
- Efeito sobre Viabilidade Celular.....	68
- Atividade Antibacteriana.....	76
- Atividade Antifúngica.....	81
6. Conclusão.....	83
7. Prosseguimento Da Pesquisa.....	83
8. Referências Bibliográficas.....	85
Anexos.....	96

## ÍNDICE ILUSTRAÇÕES

### Índice Figuras

**Figura 1.** Processo de formação de DDGS, após fermentação de grãos. Os números indicados na figura elucidam as etapas que cada produto pode ser submetido. **1:** Centrifugação. **2:** Reutilização como fonte aquosa. **3:** Evaporação. **4:** Secagem.....22

**Figura 2.** Análise comparativa das atividades enzimáticas (U/g) de cada extrato enzimático em diferentes substratos. **1:** Lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho; **2:** Lipases de *Aspergillus niger* (INCQS 40065) cultivado em DDGS de milho; **3:** Lipases de *Penicillium* sp. 09 cultivado em DDGS de milho; **4:** Lipases de *Aspergillus brasiliensis* (INCQS 40036) cultivado em DDGS

de sorgo, sendo A: diferença estatística significativa quando comparado laurato a palmitato ( $p < 0,0001$ ); \*\*\* ( $p < 0,0007$ ) e \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ): diferença estatística significativa quando comparado a butirato.....52

**Figura 3.** Análise dos produtos de degradação de trioleína para a determinação de regioespecificidade de lipases, sendo **A:** regioespecificidade de lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho; **B:** padrão de lipase 1,3-específica de *Rhizomucor miehei*. \***1:** monoleína; **2:** dioleína; **3:** ácido oleico; **4:** trioleína; **5:** glicerol; **6:** ácido esteárico.....55

**Figura 4.** Eletroforese de extrato enzimático de lipase obtido a partir de *Aspergillus niger* 01 sobre DDGS de milho e padrões de massa molecular.....56

**Figura 5.** Atividades de lipases (U/mL) observadas nos ensaios e preditos pelo modelo estatístico.....59

**Figura 6.** Análise dos produtos de alcoólise catalisada por lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho, sendo **A:** padrão oleato de etila; **B:** padrão palmitato de etila; **C:** Alcoólise sobre óleo de milho; **D:** Alcoólise sobre óleo de soja.....60

**Figura 7.** Viabilidade de fibroblastos (NIH-3T3), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (G + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAG); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol sem adição de extrato enzimático (BOG); e **Ctrl:** Controle de células sem tratamento. \*: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....68

**Figura 8.** Viabilidade de queratinócitos (HaCaT), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (G + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAG); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol sem adição de extrato enzimático (BOG); e **Ctrl:**

Controle de células sem tratamento. \*: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....69

**Figura 9.** Viabilidade de carcinoma bucal (SCC-9), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (G + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAG); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol sem adição de extrato enzimático (BOG); e **Crtl:** Controle de células sem tratamento. \*: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....71

**Figura 10.** Viabilidade de fibroblastos (NIH-3T3), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (M + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAM); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho sem adição de extrato enzimático (BOM); e **Crtl:** Controle de células sem tratamento. \*: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....72

**Figura 11.** Viabilidade de queratinócitos (HaCaT), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (M + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAM); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho sem adição de extrato enzimático (BOM); e **Crtl:** Controle de células sem tratamento. \*: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....73

**Figura 12.** Viabilidade de carcinoma (SCC-9), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (M + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAM); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho sem adição de extrato enzimático (BOM); e **Crtl:**

Controle de células sem tratamento. \*: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....74

**Figura 13.** Placas com inibição de crescimento bacteriano representada pela formação de halos. Sendo **a:** Placa de *Staphylococcus aureus* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol por lipases de *Aspergillus niger* 01; **b:** Placa de *Pseudomonas aeruginosa* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol por lipases de *Aspergillus niger* 01; **c:** Placa de *Escherichia coli* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de milho por lipases de *Aspergillus niger* 01; **d:** Placa de *Staphylococcus aureus* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de milho por lipases de *Aspergillus niger* (INCQS 40065). \*Quadrante A: disco de antibiótico anfotericina B. Quadrante B: controle salino. Quadrantes C e D: produtos de reação de lipases em duplicata.....77

**Figura 14.** Placa com inibição de crescimento de *Escherichia coli* representada pela formação de halos por produtos de reação de alcoólise de óleo de soja por lipases de *Aspergillus niger* 01. \*Quadrante A: disco de antibiótico anfotericina B. Quadrante B: controle salino. Quadrantes C e D: produtos de reação de lipases em duplicata.....80

## ANEXOS

**Figura 1:** Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol em reação de hidrólise (Teste 1).....96

**Figura 2:** Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol em reação de hidrólise (Teste 2).....96

**Figura 3:** Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol em reação de hidrólise (Teste 3).....97

**Figura 4:** Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de milho em reação de hidrólise (Teste 1).....97

<b>Figura 5:</b> Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 sobre óleo de milho em reação de hidrólise (Teste 2).....	98
<b>Figura 6:</b> Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 sobre óleo de milho em reação de hidrólise (Teste 3).....	98
<b>Figura 7:</b> Perfil de ésteres etílicos resultantes da atuação de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 sobre óleo de milho em reação de alcoólise.....	99
<b>Figura 8:</b> Perfil de ésteres etílicos resultantes da atuação de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 sobre óleo de soja em reação de alcoólise.....	99

### Índice Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Níveis codificados e valores reais do planejamento fatorial para a produção de lipases fúngicas em DDGS.....	40
<b>Tabela 2.</b> Produção de lipases fúngicas em DDGS de milho e sorgo e suas atividades de hidrólise.....	47
<b>Tabela 3.</b> Atividade lipolítica de extratos de lipases fracionados por sulfato de amônio.....	49
<b>Tabela 4.</b> Especificidade das lipases liofilizadas produzidas por fungos em DDGS de milho e sorgo em relação a ácidos graxos de cadeia curta, média e longa.....	51
<b>Tabela 5.</b> Níveis codificados para o planejamento experimental e atividades de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 em DDGS de milho.....	57
<b>Tabela 6:</b> Análise dos efeitos e coeficientes de regressão na produção de lipases por <i>Aspergillus niger</i> 01 em DDGS de milho por fermentação em estado sólido.....	58
<b>Tabela 7.</b> Perfil de ácidos graxos resultantes de hidrólise de óleo de girassol realizada por lipases produzidas por <i>Aspergillus niger</i> 01.....	62

<b>Tabela 8.</b> Perfil de ácidos graxos resultantes de hidrólise de óleo de milho realizada por lipases produzidas por <i>Aspergillus niger</i> 01.....	63
<b>Tabela 9.</b> Capacidade antioxidante de produtos de reação de hidrólise de óleos de girassol e milho por lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 ou <i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065).....	65
<b>Tabela 10.</b> Capacidade antioxidante de produtos de reação de alcoólise de óleos de soja e milho por lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01.....	66
<b>Tabela 11.</b> Atividade antibacteriana dos produtos de reação de hidrólise obtidos por lipases do projeto.....	76
<b>Tabela 12.</b> Atividade antibacteriana dos produtos de reação de alcoólise obtidos por lipases do projeto.....	79
<b>Tabela 13.</b> Associação de composição de produtos de reações e suas atividades biológicas.....	82

#### *Abreviações*

- 2-MP: monopalmitina;
- a.d.: anterior à destilação;
- AG: ácido(s) graxo(s);
- ATCC: *American Type Culture Collection*;
- BAG: branco de amostra em óleo de girassol;
- BAM: branco de amostra em óleo de milho;
- BHA: hidroxianisol butilado;
- BHT: hidroxitolueno butilado;
- bi: bilhões;
- BOG: branco de óleo de girassol;
- BOM: branco de óleo de milho;
- CCD: cromatografia em camada delgada;
- CG: cromatografia gasosa;

- CG-DIG: cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama;
- CG-EM: cromatógrafo a gás acoplado a espectrofotômetro de massas;
- CLA: ácido linoleico conjugado;
- Ctrl: controle;
- DDGS: *distiller's dried grains with solubles*;
- DG: grãos destilados;
- DMEM: *dulbecco's modified eagle's medium*;
- DMSO: dimetilsulfóxido;
- DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila;
- DS: solúveis destilados condensados;
- E.E.: extrato etéreo;
- EUA: Estados Unidos da América;
- F.B.: fibras brutas;
- FES: fermentação em estado sólido;
- FL: fermentação líquida;
- HaCaT: queratinócitos humano normais;
- INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde;
- IOC: Instituto Oswaldo Cruz;
- mi: milhões;
- ISO: *International Organization for Standardization*;
- MAGs: *monoacylglycerols*;
- MCSFA: *medium chain saturated fatty acids*;
- MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio];
- NIH-3T3: fibroblastos de camundongo normais;
- opm: oscilações por minuto;
- p-NP: p-nitrofenilfosfato;
- OPO: 1,3-oleil-2-palmitoilglicerol;

- P.B.: proteínas brutas;
- PDA: *potato dextrose agar*;
- p.f.: pós-fermentação;
- PUFAS: *polyunsaturated fatty acids*;
- Rf: fator de retenção;
- rpm: rotações por minuto;
- SCC-9: carcinoma epidermóide bucal;
- SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel eletrophoresis*;
- SFB: soro fetal bovino.

## **RESUMO**

O descarte de resíduos agroindustriais pode causar poluição e desperdício se feito de maneira incorreta. Uma solução viável econômica e ecologicamente é usá-los como meio de cultura para crescimento fúngico por fermentação em estado sólido (FES), visando à obtenção de enzimas de interesse. Nesse contexto, grãos de destilaria secos com solúveis (DDGS) são ótima opção para a produção de lipases devido à grande geração mundial e a sua composição. Lipases são enzimas versáteis que podem expressar atividade hidrolítica e de síntese. O uso de resíduos como substrato acarreta uma produção enzimática barata, contornando o problema de acesso a essas enzimas, que são comercializadas a altos preços por poucas empresas. Assim sendo, este trabalho objetivou cultivar fungos por FES em DDGS de sorgo e milho, visando à produção de lipases e à sua caracterização quanto à especificidade, regiosseletividade e massa molecular. Objetivou também aplicar essas enzimas em reações de hidrólise (almejando a biorremediação), esterificação e alcoólise (almejando a produção de biodiesel), assim como testar os produtos destas reações quanto às capacidades antioxidante, antimicrobiana e de influenciar a viabilidade celular, correlacionando-as com estrutura química. As fermentações fúngicas produziram lipases 1,3-específicas com afinidade predominante por ácidos graxos de cadeia longa (até 246,5 U/g) e com o extrato bruto contendo proteínas de massas moleculares entre 14,12 e 37,15 kDa. As lipases foram capazes de catalisar reações de hidrólise e alcoólise, sendo que os produtos de reações (ácidos graxos, mono e diglicerídeos e ésteres etílicos) apresentaram capacidades antioxidantes (até 92,12%), antibacterianas e influenciaram as viabilidades de fibroblastos, queratinócitos e células de carcinoma bucal.

## ***ABSTRACT***

The disposal of agro-industrial waste can cause pollution and wastage if done incorrectly. An economically and ecologically viable solution is the use of the waste as a culture medium for fungal growth by solid state fermentation (SSF), aiming at the generation of enzymes of interest. In this context, distiller's dried grains with solubles (DDGS) are an excellent choice due to the worldwide production and their composition to produce lipases, versatile enzymes of wide applicability due to the hydrolytic and synthetic activity. The use of waste as a substrate generates a cheap production of lipases, what is an alternative to the problem of access to these enzymes, sold at high prices by a few companies. This work aimed to cultivate fungi by SSF in DDGS of sorghum and corn, targeting the production of lipases with their characterization as to specificity, regioselectivity and molecular mass; the application of the lipases in reactions of hydrolysis (aiming at bioremediation) and esterification and alcoholysis (aiming at the production of biodiesel); and the test of the products of these reactions as to their antioxidant, antimicrobial and cellular viability capacities. The fermentations produced 1,3-specific lipases with major specificity by long chain fatty acids (up to 246.5 U/g) and proteins with molecular weights between 14.12 and 37.15 kDa. The lipases were able to catalyze reactions of hydrolysis and alcoholysis and the products of reactions (fatty acids, mono and diglycerides and ethyl esters) presented antioxidant capacity (up to 92.12%), antibacterial activity and influenced the viability of fibroblasts, keratinocytes and oral carcinoma cells.

## ***1. INTRODUÇÃO***

O mundo produz 1,3 bilhões de toneladas de resíduos sólidos por ano e espera-se uma produção de 2,2 bi de toneladas até 2025 (HOORNWEG e BHADA-TATA, 2012). Indústrias são responsáveis pelo gerenciamento, transporte, tratamento e destinação final de seus efluentes que, se não tratados, ameaçam ciclos naturais onde são despejados, além do desperdício de substâncias com alto valor biológico e econômico encontradas nesses rejeitos. O impasse da correta manipulação de resíduos é seu alto custo, porém com uma gestão adequada, empresas podem equilibrar benefícios econômicos e diminuição de riscos ambientais (SHAHBAZI *et al.*, 2014).

Uma opção de destino de despejo do setor agroindustrial é seu uso como meio de cultura para Fermentação em Estado Sólido (FES) realizada por fungos, que se mostrou como alternativa à Fermentação Líquida por demandar menos custos e mão-de-obra (KAHIL e HASSAN, 2015), o que permite a obtenção de moléculas de interesse comercial resultantes do metabolismo dos microorganismos, a implantação de um ciclo sustentável e a redução do valor do bioprocessamento (DAS *et al.*, 2014).

Potenciais substratos pouco explorados são os grãos de destilaria secos com solúveis (*distiller's dried grains with solubles* - DDGS), que se referem a coprodutos da produção de etanol a partir de culturas como milho e sorgo (RACHBAUER *et al.*, 2015). Destilarias brasileiras aprimoraram seus processos produtivos graças ao apoio da iniciativa pública nos últimos anos pela busca de fontes de energia diferentes às fósseis (KONISHI *et al.*, 2014), portanto, o valor de seus resíduos tende à diminuição devido à rápida expansão da produção de etanol a partir de cereais, como já demonstram nos últimos anos. Em 2014, DDGS

apresentaram um custo 50% inferior em relação ao farelo de soja por tonelada de produto e 37% superior ao farelo de trigo (CLICMERCADO, 2014), substratos estes amplamente utilizados em FES. Já em 2015, a comparação de seus valores foi 64% inferior em relação ao farelo de soja por tonelada de produto e 16% superior ao farelo de trigo (CLICMERCADO, 2015).

Indústrias que exploram o potencial máximo de biomassas como matéria-prima para produção de biocombustíveis, produtos químicos, biomoléculas, entre outros, contemplando a necessidade de insumos renováveis e sustentáveis, recebem o nome de Biorrefinarias (BIZ *et al.*, 2016), que podem complementar a produção de etanol a partir de cereais de forma lucrativa com o uso de seus resíduos como substrato.

O mercado global de biocatalisadores movimenta ao ano cerca de 5 bi de dólares e apresenta crescimento exponencial, assim como a participação das lipases nesse mercado. Lipases são enzimas catalisadoras de reações de síntese e hidrólise que podem ser aplicadas em inúmeros processos, como produção de biodiesel e biorremediação. O principal problema relacionado à substituição de catalisadores químicos pelos enzimáticos está no alto custo das enzimas (FLEURI *et al.*, 2014 a e b), consequência do pequeno número de empresas dominantes em sua produção, ficando inacessíveis para o uso em larga escala na maioria dos casos (DEVASENA, 2010), sendo necessárias resoluções que diminuam custos.

Em geral, catálises químicas são rápidas e eficientes quando comparadas a catálises enzimáticas, motivo de serem utilizadas prioritariamente pelas indústrias. Porém, na catálise química a separação de produtos e catalisador é complexa; os resíduos podem ser contaminantes e corrosivos, características que aumentam o consumo de água e energia para tratamentos pós-reação; raramente o catalisador é reutilizável, além de inespecífico com o substrato. Processos com biocatalisadores

são extremamente versáteis, requerem menos energia, menos água e apresentam condições mais brandas, permitindo que o processo tenha custo menor e seja sustentável (SUN e CHENG, 2002), ademais, podem também ser escolhidos para que se adequem às condições da reação proposta. Com tantos benefícios ao meio ambiente, a catálise enzimática se mostra promissora por proporcionar um processo mais flexível e com menos gastos, devido à variedade de matéria-prima que pode ser utilizada, à purificação dos resíduos ser mais simples, com menor demanda energética, sem poluição e com a possibilidade de reutilização do catalisador (TAN *et al.*, 2010; FERNANDEZ *et al.*, 2016). Além disso, produtos de reações catalisadas por enzimas são pouco caracterizados; suas possíveis funções biológicas e celulares também representam uma nova vertente de pesquisa a ser investigada.

À luz do que foi discutido, a pesquisa aqui apresentada buscou um "Bioprocesso Ideal": otimização da produção de biomoléculas por FES com a utilização de substratos residuais, aplicação de biocatalisadores em reações voltadas à sustentabilidade como biorremediações e produção de biocombustíveis, além de investigar propriedades de produtos de reações que ofereçam vantagens para setores diversos (farmacêutico, cosmético, de alimentos), reduzindo resíduos, desperdício, uso de água, manutenção, poluição, custos e implementando sustentabilidade.

## **6. CONCLUSÃO**

Os DDGS de milho e sorgo demonstraram potencial para serem aplicados como substratos para FES na produção de lipases fúngicas, o que pode ampliar a utilização desses resíduos, bem como viabilizar a produção de lipases fúngicas a baixo custo. As lipases produzidas apresentaram eficiência frente às condições distintas de reações, dando origem a ácidos graxos e ésteres etílicos com promissoras atividades biológicas.

Os testes de atividades biológicas, apesar de iniciais, demonstraram todo o potencial de produtos de reação de hidrólise e alcoólise, além de abrirem precedentes para o aprofundamento da pesquisa nas mesmas e novas reações catalisadas por lipases do projeto.

Nenhuma pesquisa deveria ter o intuito de fechar a discussão de um assunto; deve-se sempre alcançar resultados que instiguem a busca por novas respostas e aprimoramentos, como foi o caso deste, uma vez que há várias correlações levantadas que devem ser complementadas e elucidadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: [www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia). Acessado em Maio de 2015.

AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 565–570, 2001.

ALDAI, N.; AALHUS, J. L.; DUGAN, M. E. R.; ROBERTSON, W. M.; MCALLISTER, T. A.; WALTER, L. J.; MCKINNON, J. J. Comparison of wheat-versus corn-based dried distillers grains with solubles on meat quality of feedlot cattle. **Meat Science**, v. 84, p. 569–577, 2010.

APROSOJA. Disponível em [www.aprosoja.com.br](http://www.aprosoja.com.br). Acessado em Dezembro de 2014.

ADAK, S. e BANERJEE, R. A green approach for starch modification: Esterification by lipase and novel imidazolium surfactant. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 359-368, 2016.

BARNERJEE, A. e CHAKRABORTY, R. Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production - A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 53, p. 490-497, 2009.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed Lipases: Sources, Applications and Properties - A Review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, 2010.

BARROS-NETO, B. Planejamento e otimização de experimentos, ed. 2, p. 300, 2001.

BASIRICÒ, L.; MORERA, P.; DIPASQUALE, D.; TRÖSCHER, A.; BERNABUCCI, U. Comparison between conjugated linoleic acid and essential fatty acids in preventing oxidative stress in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11729>, 2017.

BELYEA, R. L.; RAUSCH, K. D.; CLEVINGER, T. E.; SINGH, V.; JOHNSTON, D. B.; TUMBLESON, M. E. Sources of variation in composition of DDGS. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, p. 122-130, 2010.

BHANGU, S. K.; GUPTA, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic enhancement of lipase-catalysed transesterification for biodiesel synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 305-309, 2017.

BIZ, A.; FINKLER, A. T. J.; PITOL, L. O.; MEDINA, B. S.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 54-62, 2016.

BOTELHO, R. M. Grãos secos de destilaria com solúveis em dietas para tilápia-do-Nilo. Tese Doutorado em Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - Campus Botucatu, UNESP, Brasil, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27 de 22 de maio de 2009. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Produtos Detergentes Enzimáticos de Uso Restrito em Estabelecimentos de Assistência à Saúde e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

CALADO, C. R. C.; MONTEIRO, S. M. S.; CABRALI, J. M. S.; FONSECA, L. P. Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, 2002.

CHEN, J.; LINDMARK-MANSSON, H.; GORTON, L.; AKESSON, B. Antioxidante capacity of bovine milk assayed by spectrophotometric and amperometric methods. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 927-935, 2003.

CHRENKOVÁ, M.; ČEREŠŇÁKOVÁ, Z.; FORMELOVÁ, Z.; POLÁČIKOVÁ, M.; MLYNEKOVÁ, Z.; FLAK, P. Chemical and nutritional characteristics of different types of DDGS for ruminants. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 21, p. 425–435, 2012.

CLICMERCADO. Disponível em [www.ceres.net](http://www.ceres.net). Acessado em Dezembro de 2014 e Agosto de 2015.

DAS, S.; GANGLY, A.; DEY, A.; TING, Y. P.; CHATTERJEE, P. K. Characterization of water hyacinth biomass and microbial degradation of the biomass under solid state fermentation using a lignocellulolytic fungus (*Alternaria spp* NITDS1). **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 4, p. 2279-2293, 2014.

DESBOIS, A. P. e SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1629-1642, 2010.

DEVASENA, T. Enzymology. 1ª edição, Oxford, Inglaterra, 2010.

DUONG-LY, K. C. e GABELLI, S. B. Chapter Seven – Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. **Methods in Enzymology**. v. 541, p. 85–94, 2014.

EBRAHIMI, M.; RAJION, M. A.; GOH, Y. M.; SAZILI, A. Q. Impact of different inclusion levels of oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) fronds on fatty acid profiles of goat muscles. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 6, p. 962-969, 2012.

FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. Tese de doutorado - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 131, 2007.

FERNANDEZ, I. A. P.; LIU, D.; ZHAO, J. LCA studies comparing alkaline and immobilized enzyme catalyst processes for biodiesel production under Brazilian conditions. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 3270, p. 11, 2016.

FERNANDEZ-AVILA, C.; GUTIERREZ-MERIDA, C.; TRUJILLO, A. J. Physicochemical and sensory characteristics of a UHT milk-based product enriched with conjugated linoleic acid emulsified by Ultra-high Pressure Homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 39, p. 275-283, 2017.

FILER, K. The newest old way to make enzymes. **Feed Mix**, v. 9, p. 27–29, 2001.

FIRDAUS, M. Y.; GUO, Z.; FEDOSOV, S. N. Development of kinetic model for biodiesel production using liquid lipase as a biocatalyst, esterification step. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 52–61, 2016.

FLEURI, L. F.; CASSANI, M.; ARCURI, M.; CAPOVILLE, B. L.; PEREIRA, M. S.; DELGADO, C. O.; NOVELLI, P. K. Production of fungal lipases in wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 1, p. 1-15, 2014a.

FLEURI, L. F.; FREIRE, D. M. G.; MACEDO, G. A. Hydrolysis of *Jatropha curcas* oil by a combined lipase system. **14th European Congress on Biotechnology**, Barcelona, Espanha, 2009.

FLEURI, L. F.; FREIRE, D. M. G.; MACEDO, G. A. Studying synergic effects of the combined lipase systems in vegetable oil hydrolysis. **IX Brazil-Japan International Workshop: Society, Energy and Environment**. Campinas, Brasil, 2011

FLEURI, L. F.; NOVELLI, P. K.; DELGADO, C. O.; PIVETTA, M. R.; PEREIRA, M. S.; ARCURI, M.; CAPOVILLE, B. L. Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 1, p. 1-18, 2014b.

FLEURI, L. F. Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas. Tese de Livre Docência, 2016.

FREITAS, L.; PAULA, A. V.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO<sub>2</sub>-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 87-90, 2010.

GERBER, C. B.; KAUFMANN, F.; NICOLETTI, G.; COSTA, M. D.; KEMPKA, A. P. Production of Lipase Using Cassava Peel and Sunflower Oil in Solid-State Fermentation: Preliminary Study. **Journal of Agricultural Science and Technology**. p. 948-954, 2013.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009.

HAMAM, F. e SHAHIDI, F. Acidolysis Reactions Lead to Esterification of Endogenous Tocopherols and Compromised Oxidative Stability of Modified Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7319-7323, 2006.

HAN, J. e LIU, K. Changes in Composition and Amino Acid Profile during Dry Grind Ethanol Processing from Corn and Estimation of Yeast

Contribution toward DDGS Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3430-3437, 2010.

HE, Y.; LI, J.; KODALI, S.; BALLE, T.; CHEN, B.; GUO, Z. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: Catalytic specificity and parameterization. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 445-456, 2017.

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

HOORNWEG, D. e BHADA-TATA, P. What a Waste: A Global Review of Solid Waste Management. **Urban Development Series Knowledge Papers**, n°15, 2012.

IGARASHI, M. e MIYAZAWA, T. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. **Cancer Letters**, v. 148, p. 173-179, 2000,

ISAACS, C. E.; LITOV, R. E.; THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 6, p. 362–366, 1995.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z. M.; FOONG, C. W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v. 87, p. 581-586, 2004.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H. Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by bha, Bht, and Other Antioxidants. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 15, p. 109-150, 1985.

JIANG, W. G.; BRYCE, R. P.; HORROBIN, D. F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 27, n. 3, p. 179-209, 1998.

JOHNSON, F. X. e SILVEIRA, S. Pioneer countries in the transition to alternative transport fuels: Comparison of ethanol Programmes and policies in Brazil, Malawi and Sweden. **Environmental Innovation and Societal Transitions**, v. 11, p. 1-24, 2014.

KABBASHI, N. A.; MOHAMMED, N. I.; ALAM, M. Z.; MIRGHANI, M. E. S. Hydrolysis os *Jatropha curcas* oil for biodiesel synthesis using

immobilized *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 95-100, 2015.

KAHIL, T. e HASSAN, H. M. Economic Co-Production of Cellulase and  $\alpha$ -Amylase by Fungi Grown on AgroIndustrial Wastes Using Solid-State Fermentation Conditions. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 05, p. 184-195, 2015.

KAPOOR, M. e GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 3, p. 223, 2010.

KONISHI, F.; SOARES, P. M.; GALVÃO, R. A.; SILVA, M. S.; ROCHA, A. M. Uma Década da Tecnologia Biocombustível: Análise do Segmento Automobilístico e a sua Correlação com o Setor Sucroalcooleiro. **Energia na Agricultura**, v. 29, p. 272-276, 2014.

KUMAR S.; MATHUR A.; SINGH V.; NANDY S.; KUMAR K.; NEGI S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 300–304, 2012.

LANSER, A. C.; MANTHEY, L. K.; HOU, C. T. Regioselectivity of New Bacterial Lipases Determined by Hydrolysis of Triolein. **Current Microbiology**, v. 44, p. 336-340, 2002.

LARROCHE, C.; ARPAH, M.; GROS, J. B. Methyl-ketone production by Ca-alginate/Eudragit RL entrapped spores of *Penicillium roquefort*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 106-112, 1989.

LEKHA, P. K. e LONSANE, B. K. Comparative Titres, Location and Properties of Tannin Acyl Hydrolase Produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in Solid-State, Liquid Surface and Submerged Fermentations, **Process Biochemistry**, v. 29, p. 497-503, 1994.

LIM, C. e YILDIRIM-AKSOY, M. Distillers dried grains with solubles as an alternative protein source in fish feeds. **8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture**, 2008.

LIMA, J. R. O. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova**, São Paulo, Brasil, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007 .

LIU, C.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. The Two-Step Synthesis of 1,3-Oleoyl-2-Palmitoylglycerol by *Candida* sp. 99-125 lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016.

LIU, K. Chemical Composition of Distillers Grains, a Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1508-1526, 2011.

LIU, K. e HAN, J. Changes in mineral concentrations and phosphorus profile during dry-grind processing of corn into ethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3110-3118, 2011.

LODGE, S. L.; STOCK, R. A.; KLOPFENSTEIN, T. J.; SHAIN, D. H.; HEROLD, D. W. Evaluation of corn and sorghum distillers byproducts. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 3743, 1997.

LOO, A. Y.; JAIN, K.; DARAH, I. Antioxidant and radical scavenging activities of the pyroligneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 300-307, 2007.

LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? **Food Science and Technology**, v. 31, 2011.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 28, p. 90-95, 1997.

MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M. A.; FIGUEROA, J. G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1520–1526, 2012.

MEGHWANSHI, G. K.; AGARWAL, L.; DUTT, K.; SAXENA, R. K. Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 127–131, 2006.

MENONCIN, S. Concentração, Imobilização e Caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido. Erechim, Brasil, URI, 2007.

MITA, L.; SICA, V.; GUIDA, M.; NICOLUCCI, C.; GRIMALDI, T.; CAPUTO, L.; BIANCO, M.; ROSSI, S.; BENCIVENGA, U.; ELDIN, M. S. M.; TUFANO, M. A.; MITA, D. G.; DIANO, N. Employment of immobilised lipase

from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 133-141, 2010.

MISRA, R. M.; JAIN, A.; TANDON, P.; WARTEWIG, S.; GUPTA, V. D. Normal mode analysis of  $\gamma$  form of oleic acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 142, p. 70-83, 2006.

MOTTA, A. S. e BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 63-70, 2002.

MULINARI, J.; VENTURIN, B.; SBARDELOTTO, M.; AGNOL, A. D.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; BALDISSARELLI, D. P.; MODKOVSKI, T. A.; ROSSETTO, V.; DALLA ROSA, C.; REICHERT Jr, F. W.; GOLUNSKI, S. M.; VIEITEZ, I.; VARGAS, G. D. L. P.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by homemade lipases. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 313-318, 2017.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic Biodiesel Production: Technical and Economical Considerations. **European Journal Science Technology**, v. 110, n. 8, 2008.

O'FALLON, J. V.; BUSBOOM, J. R.; NELSON, M. L.; GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1511-1521, 2007.

OGBOLU, D. O.; ONI, A. A.; DAINI, O. A.; OLOKO, A. P. In vitro antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 384–387, 2007.

ÖZTÜRK, M.; DURU, M. E.; KIVRAK, S.; MERCAN-DOGAN, N.; TÜRKÖGLÜ, A.; ÖZLER, M. A. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1353–1360, 2011.

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

PARFENE, G.; HORINCAR, V.; TYAGI, A. K.; MALIK, A.; BAHIRM, G. Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial

activity from crude coconut fat by solid state cultivation of *Yarrowia lipolytica*.

**Food Chemistry**, v. 136, p. 1345–1349, 2013.

PATEL, M.; MISTRY, J.; DESAI, S.; PATEL, S. Isolation and Characterization of Lipase producing Bacteria from Vegetable Oil Spillage Site. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, p. 214-232, 2016.

RACHBAUER, L.; GABAUER, W.; SCHEIDL, S.; ORTNER, M.; FUCHS, W.; BOCHMANN, G. Closing the Nutrient Cycle in Two-Stage Anaerobic Digestion of Industrial Waste Streams. **Energy & Fuels**, DOI: 10.1021/ef502809e, 2015.

RON, E. Z. e ROSENBERG, E. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 191–194, 2014.

RÚA, M. L.; DÍAZ-MAURIÑO, T.; FERNÁNDEZ, V. M.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1156, p. 181-189, 1993.

SANTOS, R. R.; MURUCI, L. N. M.; SANTOS, L. O.; ANTONIASSI, R.; SILVA, J. P. L.; DAMASO, M. C. T. Characterization of Different Oil Soapstocks and Their Application in the Lipase Production by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, p. 561-566, 2014.

SHAHBAZI, S.; BJELKEMYR, M.; JÖNSSON, C.; WIKTORSSON, M. The Effect of Environmental and Economic Perception on Industrial Waste Management. **1st International EurOMA Sustainable Operations and Supply Chains Forum**, p. 24-25, 2014.

SHULTZ, T. D.; CHEW, B. P.; SEAMAN, W. R.; LUEDECKE, L. O. Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and P-carotene on the in vitro growth of human cancer cells. **Cancer Letters**. v. 63, p. 125- 133, 1992.

SILVEIRA, G. I Fórum Brasileiro de Etanol de Milho e Sorgo. **Agroanalysis**, 2013.

SIVARAMAKRISHNAN, R. e INCHAROENSAKDI, A. Direct transesterification of *Botryococcus* sp. catalysed by immobilized lipase: Ultrasound treatment can reduce reaction time with high yield of methyl ester. **Fuel**, v. 191, p. 363-370, 2017.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820–4825, 2010.

SUN, Y. e CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002.

SUK, V. R. E. e MISRAN, M. Preparation, characterization and physicochemical properties of DOPE-PEG2000 stabilized oleic acid-soy lecithin liposomes (POLL). **Colloids and Surfaces A**, v. 513, p. 267-273, 2017.

TALUKDER, M. M. R.; TAMALAMPUDY, S.; LI, C. J.; LE, Y. L.; WU, J. C.; KONDO, A. An improved method of lipase preparation incorporating both solvent treatment and immobilization onto matrix. **Biochemical Engineering**, v. 33, p. 60–65, 2007.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A Review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TONG, L. T.; LIU, L. Y.; ZHONG, K.; WANG, Y.; GUO, L. N.; ZHOU, S. M. Effects of Cultivar on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Naked Oat in China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, p. 1809-1816, 2014.

TSUNECHIRO, A.; MARIANO, R. M.; MARTINS, V. A. Produção e preços de sorgo no estado de São Paulo, 1991-2001. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.1, p. 15-24, 2002.

VLACHA, M.; GIANNAKAS, A.; KATAPODIS, P.; STAMATIS, H.; LADAVOS, A.; BARKOULA, N. M. On the efficiency of oleic acid as plasticizer of chitosan/clay nanocomposites and its role on thermo-mechanical, barrier and antimicrobial properties - Comparison with glycerol. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 10-19, 2016.

ZHU, Q. Y.; HACKMAN, R. M.; ENSUNSA, J. L.; HOLT, R. R.; KEEN, C. L. Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 692-9, 2002.

WANG, M.; NIE, K.; CAO, H.; DENG, L.; WANG, F.; TAN, T. Biodiesel production by combined fatty acids separation and subsequently enzymatic esterification to improve the low temperature properties. **Bioresource Technology**, v. 174, p. 302-305, 2014.

WEBER, K. e OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, 1969.

WOLLINGER, A.; PERRIN, É.; CHAHBOUN, J.; JEANNOT, V.; TOURAUD, D.; KUNZ, W. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis L.* leaves determined by DPPH assays. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, p. 754-765, 2016.

WU, X.; JAMPALA, B.; ROBBINS, A.; HAYS, D.; YAN, S.; XU, F.; ROONEY, W.; PETERSON, G.; SHI, O.; WANG, D. Ethanol Fermentation Performance of Grain Sorghums (*Sorghum bicolor*) with Modified Endosperm Matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9556-9562, 2010.

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.

YAN, X. e BOIES, A. M. Quantifying the uncertainties in life cycle greenhouse gas emissions for UK wheat ethanol. **Environmental Research Letters**, v. 8, 2013.

YANG, H. J.; LEE, P. S.; CHOE, J.; SUH, S.; KO, S. Improving the encapsulation efficiency and sustained release behaviour of chitosan/b-lactoglobulin double-coated microparticles by palmitic acid grafting. **Food Chemistry**, v. 220, p. 123-128, 2017.