



CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Fusarium oxysporum* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUA APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES DE BIODIESEL.

Gilberto Victor Coradi

Orientador: **Dra. Valéria Marta Gomes de Lima**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Abril – 2012
Rio Claro-SP

GILBERTO VICTOR CORADI

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Fusarium oxysporum* EM FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO E SUA APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES
DE BIODIESEL.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas

Orientadora: Dr.^a Valéria Marta Gomes de Lima

Rio Claro

2012

547.29 Coradi, Gilberto Victor
C787p Produção de lipase por *Fusarium oxysporum* em
fermentação em estado sólido e sua aplicação em reações de
síntese de ésteres de biodiesel. / Gilberto Victor Coradi. - Rio
Claro : [s.n.], 2012
83 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Valéria Marta Gomes de Lima

1. Fermentação. 2. Esterificação. 3. Torta de crambe. I.
Título.

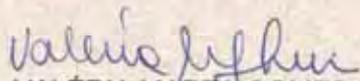
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Produção de lipase por *Fusarium oxysporum* em fermentação em estado sólido e sua aplicação em reações de síntese de ésteres de Biodiesel.

AUTOR: GILBERTO VICTOR CORADI

ORIENTADORA: Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DE LIMA

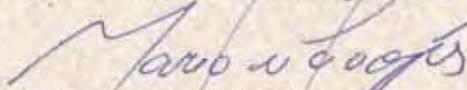
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DE LIMA
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis



Profa. Dra. CÍNTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Departamento de Microbiologia, Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro



Prof. Dr. MARIO LUCIO LOPES
Fermentec Ltda Assistência Técnica Fermentação Alcoólica, Piracicaba/SP

Data da realização: 19 de abril de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais e minha família pelo carinho e apoio que me deram nesta empreitada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me proporcionado mais esta conquista.

Agradeço à minha família pelo apoio em todos os momentos e circunstâncias. Em especial aos meus pais Gilberto e Roseli por sempre me apoiarem e me darem forças em batalhar pelos meus sonhos. Agradeço tanto pelo apoio moral quanto pelo financeiro. Agradeço a Maíra por me agüentar sempre enchendo sua paciência, mas afinal... irmãos mais novos são pra isso mesmo... hehe. Sem vocês com certeza não seria possível a realização de mais esta etapa.

Agradeço ao Bruno, Mari, Kassandra, Aline, Caçula e Cíntia por serem os amigos mais antigos e por me agüentarem já há tanto tempo. Agradeço ainda a todos os companheiros do LABI, desde os mais recentes até os mais antigos (não vou citar todos porque com certeza poderia esquecer alguém, afinal a lista é grande... e põe grande nisso... nosso laboratório é muito pop... hehe), pela companhia durante as intermináveis horas passadas trabalhando, assim como por fazê-las mais divertidas. Como se esquecer das famosas saídas para comilanças e festinhas do LABI? Saibam que cada um de vocês contribuiu para este momento. Agradeço ao Kairo e ao Mini pela ajuda com os experimentos. Agradeço aos amigos que foram companhia constante nas viagens até Rio Claro. Bruno que o diga das nossas aventuras no ônibus e na rodô... tem cada história que daria até livro!

Agradeço ao Chal, Burns, Grazy, Xena, Bill, Alex, Latino e demais amigos de Rio Claro por me acolherem tão bem, por me arrumar um teto quando chegava perdido por aí e pela companhia nas disciplinas e festas. Fizeram-me sentir como se conhecesse a turma de Rio Claro de longa data.

Agradeço muito à professora Valéria pela orientação, pela paciência, pelo conhecimento transmitido e pela ajuda, inclusive com a “mão na massa”. Se não fosse por ela meu relacionamento de amor e ódio com o HPLC seria somente de ódio e ódio... hahaha. Obrigado Valéria por me aceitar como orientando quando cheguei com cara de perdido e sem inspirar muita confiança!

Agradeço também ao professor Pedro pela ajuda e por fornecer o micro-organismo utilizado neste trabalho.

Agradeço ao Alan, Giba e Sérgio pela ajuda com os equipamentos e reagentes do laboratório.

Agradeço ao *Fusarium*, pois sem ele esse trabalho não existiria... considero-o quase como um filho, que me deixava feliz quando tudo estava bem e preocupadíssimo quando alguma coisa não dava certo.

Agradeço à Capes pela bolsa de Mestrado e à Fapesp pelo financiamento do projeto. Ambos foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Finalmente agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, seja ela acadêmica ou simplesmente pela companhia ao longo destes dois anos de trabalho.

Obrigado a todos!

*"O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um oceano"*

Isaac Newton (1643-1727)

RESUMO

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster em meio aquoso, ou reações sintéticas quando em ambientes aquo-restritos, o que as tornam interessantes para aplicações em diferentes segmentos industriais como tratamento de efluentes, indústria alimentícia, e mais recentemente, na indústria de biocombustíveis, para produção de biodiesel por processos de esterificação e transesterificação. Essas enzimas normalmente são produzidas por micro-organismos por dois tipos de fermentação: a submersa ou em estado sólido. A fermentação em estado sólido (FES) apresenta vantagens interessantes como o baixo custo dos substratos utilizados para o crescimento microbiano (bagaços, tortas de origem agroindustrial ou farelos), economia de energia e água e produto final concentrado. Este trabalho teve como objetivos estudar parâmetros para produção de lipase pelo fungo filamentosso *Fusarium oxysporum* em FES, seguido da caracterização enzimática, e posterior aplicação em reações de síntese. O cultivo microbiano procedeu-se durante 120h a 28°C, e a atividade enzimática quantificada pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila. Foram testados diferentes substratos para a produção enzimática, bem como adição de sais e óleos. O extrato bruto com maior atividade lipolítica (5,08 U/gss) foi obtido após 120h de fermentação em torta de crambe umedecida com tampão fosfato pH 7,0. O extrato enzimático bruto apresentou maior atividade à 40°C e em tampão fosfato pH 8,0; foi pouco estável em temperaturas acima de 37°C, porém manteve-se estável em amplo intervalo de pH. Em relação a solventes polares, foi estável em baixas concentrações destes; em solventes apolares a atividade foi aumentada para até 130%. Mostrou-se estável, ainda, em diferentes tensoativos. A hidrólise dos diferentes substratos, tanto sintéticos como naturais, confirmou tratar-se de uma lipase verdadeira. O emprego do sólido fermentado em reações de esterificação mostrou-se eficiente apresentando altas taxas de conversão (cerca de 90%) em ésteres metílicos e etílicos, além da possibilidade de reutilização do mesmo por diversos ciclos, sem perda significativa de atividade.

Palavras-chave: Esterificação, Fermentação em estado sólido, *Fusarium oxysporum*, Lipase, Torta de crambe

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) are enzymes that catalyze the hydrolysis of ester in aqueous system, or synthetic reactions when in non-aqueous system, which makes them interesting for many industries as wastewater treatment, food industry, and more recently, in the biofuels industry for biodiesel production by esterification and transesterification. These enzymes are usually produced by microorganisms by two types of fermentation: submerged or solid. The solid-state fermentation (SSF) offers interesting advantages as the low cost of substrates for microbial growth (bagasses, agroindustrial cakes or sharps), economy of energy and water and more concentrate final product. This study aimed to study parameters for lipase production by filamentous fungus *Fusarium oxysporum* in SSF, followed by enzymatic characterization, and subsequent application in synthesis reactions. The microbial cultivation proceeded for 120 hours at 28°C, and enzymatic activity measured by the hydrolysis of *p*-nitrophenyl-palmitate. Different substrate were tested for the enzyme production, and addition of salts and oils. The crude extract with highest lipase activity (5.08 U/gds) was obtained after 120 hours of fermentation in cake crambe moistened by phosphate buffer pH 7.0. The crude enzyme extract showed higher activity at 40°C in phosphate buffer pH 8.0; and was unstable at temperatures above 37°C, but remained stable in a wide pH range. It was stable at low concentrations of polar solvents, however in non-polar solvents, the activity was increased up to 130%, and it was also stable in different surfactants. The hydrolysis of various substrates, both synthetic and natural, confirmed that it was a true lipase. The use of fermented solid in esterification reactions proved to be efficient, having high conversion rates (around 90%) of methyl and ethyl esters, as well as the possibility of reusing the same for several cycles, without significant loss of activity.

Keywords: Esterification, *Fusarium oxysporum*, Solid state fermentation, Lipase, Crambe cake.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

AOT: Dioctil sulfosuccinato de sódio

BCA: Bagaço de cana-de-açúcar

BDA: Batata dextrose Agar

BSA: Soro-albumina bovina

C/N: Relação carbono/nitrogênio

CCD: Cromatografia em camada delgada

CMCC: Contato múltiplo de contra-corrente

CTAB: Brometo de cetil trimetil amônio

DCCR: Delineamento composto central rotacional

FES: Fermentação em estado sólido

FM: Farelo de milho

FS: Farelo de soja

FSM: Fermentação submersa

GRAS: *Generally regarded as safe*

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

PEO: Polióxido de etileno

***p*NP:** *p*-nitrofenol

***p*NPP:** Palmitato de *p*-nitrofenila

RM: Razão molar

RPM: Rotações por minuto

RSM: Superfície de resposta

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TC: Torta de crambe

TM: Torta de mamona

Tris-HCl: Tampão Tris (hidroximetil) amino metano – ácido clorídrico

U/gss: Unidade de atividade enzimática por grama de substrato seco

U/mL: Unidade de atividade enzimática por mililitro

U: Unidade de atividade enzimática

UT: Unidade de atividade de transesterificação enzimática

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações catalisadas por lipases. Adaptado de Paques e Macedo, 2006.....	20
Figura 2: Modelo estrutural da lipase de <i>Gibberella zeae</i> , a forma teleomórfica do <i>F. graminearum</i> , um fungo conhecido por causar doença (fusariose) em cereais. Fonte: Protein Data Bank.....	23
Figura 3. Reações de esterificação (A) e de transesterificação (B) na presença de catalisador.	31
Figura I.1: Esquema geral para obtenção do extrato bruto de <i>F. oxysporum</i>	37
Figura I.2: Hidrólise do <i>p</i> NPP liberando <i>p</i> NP e ácido palmítico. O <i>p</i> NP possui coloração amarelada e pode ser lido à 410nm.....	38
Figura I.3: A) Cultivo de <i>F. oxysporum</i> em meio contendo Rodamina B. O halo alaranjado evidenciado pela exposição à luz UV de 365nm indica produção de lipase. B) <i>F. oxysporum</i> cultivado em meio contendo solução de sais Czapeck e óleo de oliva 1,5% (v/m) como única fonte de C.	40
Figura I.4: Produção da lipase de <i>Fusarium</i> sp. após cultivo em diferentes substratos. Bagaço de cana-de-açúcar [○]; Farelo de milho [□]; farelo de soja [▲]; torta de crambe [△]; torta de mamona [■].	42
Figura I.5: Produção de lipase por <i>F. oxysporum</i> em torta de crambe com diferentes suplementos. Meios de cultivo: 1) Controle: Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de oliva 1%; 2) Czapeck, óleo de oliva 1%; 3) H ₂ O, óleo de oliva 1%; 4) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de oliva 3%; 5) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de soja 1%; 6) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de soja 3%; 7) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de crambe 1%; 8) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de crambe 3%; 9) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de milho 1%; 10) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de milho 3%; 11) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, sem adição de óleo. Condições de cultivo: 28°C, 120h.	45
Figura I.6: Influência da temperatura sobre a atividade [■] e estabilidade [□] da lipase de <i>F. oxysporum</i> produzida em torta de crambe, tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0 e extraída com solução salina 1%. Ensaio realizados em tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0. A atividade obtida pelo método padrão (37°C) foi considerada como 100% (3,22 U/mL).....	48
Figura I.7: Influência do pH sobre a atividade (A) e estabilidade (B) da lipase de <i>F. oxysporum</i> produzida em torta de crambe, tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0 e extraída com solução salina 1%. Incubação durante 2h em tampão citrato-fosfato, pH 3,0 - 7,0 [■]; tampão	

fosfato, pH 7,0 e 8,0 [●]; tampão tris-HCl, pH 8,0 e 9,0 [▲]; tampão glicina-NaOH, pH 9,0 e 10,0 [□], a 0,05 mol/L. Ensaio realizado a 37°C. A atividade obtida pelo método padrão (tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0) foi considerada como 100% (2,40 U/mL).....	49
Figura II.1: Partículas do sólido fermentado observado ao microscópio óptico, aumento de 400 vezes.....	58
Figura II.2: Atividade lipolítica do sólido fermentado nos ciclos de hidrólise. Ensaio realizado a 37°C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0, substrato pNPP,	59
Figura II.3: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2 ² para esterificação metílica. X1: Razão molar ácido/metanol; X2: Temperatura.....	61
Figura II.4: Superfície de resposta da taxa de conversão (%) em função da razão molar ácido/metanol (X1) e temperatura (X2).....	62
Figura II.5: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2 ² para esterificação etílica. X1: Razão molar ácido/etanol; X2: Temperatura.....	64
Figura II.6: Superfície de resposta da taxa de conversão (%) em função da razão molar ácido/etanol (X1) e temperatura (X2).....	65
Figura II.7: Conversão do ácido oléico em oleato de metila (■) e etila (□) nas condições otimizadas (RM 1:3, 40°C e RM 1:2, 40°C, respectivamente). Foram utilizados 500 mg (35,7 U) de sólido fermentado liofilizado.....	66
Figura II.8: Avaliação dos ciclos de esterificação metílica e etílica pelo sólido fermentado. Condições: RM 1:3, 40°C (metanol) e RM 1:2, 40°C (etanol). Foram utilizados 500 mg (35,7 U) de sólido fermentado liofilizado.....	67
Figura II.9: Conversão em metil e etil ésteres utilizando sólido fermentado por <i>F. oxysporum</i> em função do tempo. Condições: RM 1:3, 40°C (metanol) e RM 1:2, 40°C (etanol).....	68
Figura II.10: Cromatografia de camada delgada demonstrando a conversão de ácido oléico em ésteres. 1- controle ácido oléico; 2- padrão oleato de metila; 3- formação do oleato de metila; 4- formação do oleato de etila.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lipases produzidas por fungos do gênero <i>Fusarium</i> sp.	25
Tabela I.1: Composição centesimal dos substratos empregados na FES.	42
Tabela I.2: Extração da lipase usando diferentes soluções.	46
Tabela I.3: Atividade enzimática residual (%) após 1h de incubação em solventes.	50
Tabela I.4: Atividade enzimática residual (%) após 1h de incubação em surfactantes.	52
Tabela I.5: Atividade lipolítica do extrato bruto frente a diferentes substratos.	53
Tabela I.6: Perfil de ácidos graxos de cadeia longa predominantes nos diferentes óleos hidrolisados.	54
Tabela II.1: DCCR 2 ² para esterificação do ácido oléico.	56
Tabela II.2: Delineamento experimental 2 ² , com a avaliação da conversão do ácido oléico em oleato de metila.	60
Tabela II.3: Estimativa dos efeitos para taxa de conversão (%) da reação de esterificação metílica do ácido oléico para o DCCR 2 ²	61
Tabela II.4: Análise de variância obtida para o DCCR 2 ² da reação de esterificação metílica.	62
Tabela II.5: Delineamento experimental 2 ² , com a avaliação da conversão do ácido oléico em oleato de etila.	63
Tabela II.6: Estimativa dos efeitos para taxa de conversão (%) da reação de esterificação etílica do ácido oléico para o DCCR 2 ²	64
Tabela II.7: Análise de variância obtida para o DCCR 2 ² da reação de esterificação etílica.	64
Tabela II.8: Taxa de conversão em ésteres de palmitato e atividade de transesterificação utilizando diferentes alcoóis.	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivos gerais.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. Definição e características das lipases.....	19
3.2. Fontes de lipases	21
3.3. Produção de lipases por <i>Fusarium sp.</i>	22
3.4. Aplicação das lipases.....	26
3.5. Fermentação em estado sólido	27
3.5.1 Produção de lipases por fermentação em estado sólido.....	29
3.6. Esterificação e transesterificação visando produção de biodiesel.....	30
3.7. Crambe (<i>Crambe abyssinica</i>)	32
CAPÍTULO I: PRODUÇÃO DA LIPASE POR <i>Fusarium oxysporum</i> EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO BRUTO.....	34
1. MATERIAIS E MÉTODOS	34
1.1. Micro-organismo e manutenção da cepa.....	34
1.2. Produção da lipase por <i>Fusarium oxysporum</i> em FES.....	34
1.2.1. Substratos usados na FES	34
1.2.2. Determinações de granulometria, capacidade de absorção de água e composição centesimal dos substratos.....	35
1.2.3. Cultivo em FES	35
1.2.4. Influência da adição de óleos vegetais.....	35
1.2.5. Influência da adição de sais minerais	36
1.3. Extração e obtenção do extrato bruto	36
1.4. Métodos analíticos.....	37
1.4.1. Determinação da atividade lipolítica através da hidrólise do palmitato de <i>p</i> - nitrofenila.....	37
1.4.2. Determinação de proteínas totais	38

1.5. Caracterização bioquímica do extrato enzimático de <i>F. oxysporum</i> produzida por FES	38
1.5.1. Influência da temperatura e pH na atividade e estabilidade enzimática	38
1.5.2. Estabilidade em solventes orgânicos	39
1.5.3. Estabilidade em surfactantes	39
1.5.4. Atividade lipolítica frente a diferentes substratos	39
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
2.1. Produção da lipase por <i>F. oxysporum</i> em FES	40
2.1.1. Produção da enzima por FES utilizando diferentes substratos	40
2.1.2. Influência da adição de óleos vegetais e sais minerais ao substrato.....	44
2.2. Extração e obtenção do extrato bruto	45
2.3. Caracterização bioquímica do extrato enzimático de <i>F. oxysporum</i> produzida por FES	47
2.3.1. Influência da temperatura e pH na atividade e estabilidade enzimática.....	47
2.3.2. Estabilidade em solventes orgânicos	50
2.3.3. Estabilidade em surfactantes	51
2.3.4. Atividade lipolítica frente a diferentes substratos	52
3. CONCLUSÕES PARCIAIS	54

CAPÍTULO II: PRODUÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS VIA ESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO O SÓLIDO FERMENTADO

1. MATERIAIS E MÉTODOS	55
1.1. Preparo do sólido fermentado para caracterização e aplicação em reações de síntese .	55
1.2. Aplicação do sólido fermentado em reação de hidrólise.....	55
1.3. Aplicação do sólido fermentado em reações de síntese	56
1.3.1. Síntese do oleato de metila e etila	56
1.3.2. Síntese do palmitato de metila ou etila a partir de palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPP).....	56
1.4. Métodos analíticos.....	57
1.4.1. Determinação de ácidos graxos em ensaios de esterificação	57
1.4.2. Análise qualitativa de ésteres alquílicos por cromatografia em camada delgada (CCD).....	57
1.5. Análises estatísticas.....	57

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
2.1. Aplicação do sólido fermentado em reações de hidrólise	58
2.2. Aplicação do sólido fermentado em reação de esterificação.....	59
2.2.1. Síntese do oleato de metila.....	59
2.2.2. Síntese do oleato de etila.....	63
2.3. Avaliação dos ciclos de esterificação pelo sólido fermentado.....	66
2.4. Esterificação com redução do volume de co-solvente	68
2.5. Aplicação do sólido fermentado em reação de transterificação.....	70
2.5.1. Síntese do palmitato de metila e etila a partir de palmitato de <i>p</i> -nitrofenila	70
3. CONCLUSÕES PARCIAIS	71
CONCLUSÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a tecnologia de produção e aplicação enzimática é um campo importante para a síntese de compostos de alto valor agregado. Projetos desenvolvidos nesta área geram conhecimento e tecnologia de ponta, sobretudo nos países desenvolvidos, onde recebem incentivos e investimentos para as pesquisas. No entanto, a tecnologia empregada na produção e principalmente na purificação de enzimas ainda representa um custo elevado, tornando alguns processos inviáveis e pouco competitivos.

As lipases estão entre as enzimas de maior interesse e estudos. Estas enzimas são capazes de catalisar reações que envolvem óleos e gorduras, liberando os seus ácidos graxos constituintes. Lipases podem ser encontradas em animais, vegetais e micro-organismos, sendo os últimos os escolhidos para a produção em larga escala, utilizando processos fermentativos. Este biocatalisador é de grande importância econômica devido à possibilidade de aplicações industriais, produção de alimentos, fármacos, bem como uso em tratamentos de resíduos contaminados com óleos e gorduras. As lipases podem ainda, em ambientes aquo-restritos, catalisar reações reversas como a esterificação e transesterificação, princípios pelos quais são produzidos alguns ésteres utilizados em combustíveis, cosméticos, drogas e herbicidas.

Atualmente, a esterificação enzimática é considerada como uma importante alternativa na produção de ésteres bicomustíveis, podendo substituir os processos químicos convencionalmente utilizados. Contudo, em muitos casos os custos dos processos enzimáticos em relação aos processos químicos ainda são elevados, devido aos altos custos de produção e recuperação do biocatalisador do meio de fermentação. Uma das maneiras de reduzir custos das reações de biocatálise é pela utilização de enzimas imobilizadas, devido à possibilidade de sua recuperação e reutilização após o processo. Entretanto, esta abordagem ainda pode ter custo elevado, pois requer, na maioria das vezes, a concentração do meio de cultura, bem como a purificação da enzima (geralmente necessitando de métodos cromatográficos de alta sensibilidade) e sua posterior imobilização.

Uma alternativa que visa reduzir estes custos trata da fermentação em estado sólido (FES), vista como uma tecnologia promissora para produção de enzimas, pois além de usar substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, o biocatalisador pode ser produzido de forma mais concentrada, facilitando a sua recuperação do meio de cultivo, quando necessário. Outras vantagens da FES ainda são a economia de água e energia. Em sistemas de fermentação sólida, o micro-organismo cresce em partículas de um substrato orgânico sólido,

com o mínimo de água livre necessária entre as partículas do substrato. Assim, o substrato fermentado pode atuar como suporte para a enzima, sem a necessidade de uma etapa de extração prévia e imobilização da mesma. Se, juntamente com o processo de FES, desenvolverem-se aplicações que possam gerar produtos de alto valor agregado como ésteres, e que dispensem a etapa de extração da enzima do sólido fermentado, então as possibilidades de redução de custos podem aumentar, viabilizando a aplicação do processo em escala industrial.

Tendo em vista a importância econômica das lipases em diversos processos industriais e a vasta gama de aplicabilidade dessas enzimas em diferentes áreas, bem como o baixo custo da fermentação em estado sólido, o estudo de novos micro-organismos e de vias para a produção de lipases faz-se necessário. Além disso, as lipases podem ser empregadas na produção de biocombustíveis, um mercado em alta devido à grande demanda desses produtos em substituição aos combustíveis fósseis.

Este trabalho visa buscar alternativas à produção e aplicação de lipases, empregando uma linhagem de fungo do gênero *Fusarium oxysporum* anteriormente isolada e selecionada como lipolítica. A cepa foi cultivada em FES e posteriormente aplicada diretamente em reações de esterificação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Estudar as melhores condições para a produção de lipase pelo ascomiceto *Fusarium oxysporum* em fermentação em estado sólido; caracterizar parcialmente o extrato enzimático bruto obtido e empregar o sólido fermentado como biocatalisador em reações de esterificação.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos gerais foram alcançados a partir do desenvolvimento dos seguintes objetivos específicos:

- Capítulo I:

- 1) Produção da enzima por fermentação em estado sólido pelo fungo *Fusarium oxysporum*;
- 2) Determinação do melhor substrato para crescimento e produção de lipase pelo micro-organismo;
- 3) Avaliação da influência da adição de sais e óleos vegetais na produção da enzima;
- 4) Avaliação de soluções para extração da enzima do meio de fermentação;
- 5) Caracterização parcial do extrato bruto quanto à atividade e estabilidade em diferentes temperaturas, pHs, solventes orgânicos e surfactantes.

- Capítulo II:

- 1) Síntese de ésteres alquílicos por reações de esterificação utilizando-se o sólido fermentado liofilizado como biocatalisador;
- 2) influência de diferentes parâmetros sobre a bioconversão (tempo e temperatura de reação; influência de diferentes alcoóis; razão molar ácido/álcool; co-solvente; re-utilização da enzima).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Definição e características das lipases

Segundo a NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3) também definidas como carboxilesterases, são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases que atuam sobre triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) liberando ácidos graxos e glicerol, enquanto que as enzimas relacionadas, porém incapazes de hidrolisar acilgliceróis insolúveis em água, são genericamente denominadas como esterases (MESSIAS et al., 2011; JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999). Em meios aquo-restritos o suficiente para deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese, as lipases podem também catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), bem como aminólise (síntese de amidas) e lactonização (PAQUES e MACEDO, 2006), (Figura 1), além de poderem atuar sobre substratos não-naturais (JAEGER e EGGERT, 2002).

As lipases geralmente não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, são relativamente estáveis à altas temperaturas, apresentam especificidade: regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (PANDEY et al., 1999; GANDHI, 1997). Essas enzimas são em sua maioria glicoproteínas ácidas, que podem apresentar uma quantidade de carboidratos de 2 a 15%, como resíduos glicosídicos de manose, xilose, galactose e arabinose (FREIRE et al., 1997). Apresentam uma massa molar variando entre 19 a 60 kDa e possuem uma estrutura de dobramento α / β hidrolase, sendo que muitas estruturas destas enzimas já foram definidas. As lipases possuem um núcleo central composto por uma folha β pregueada formada por oito segmentos β ($\beta 1-\beta 8$), conectadas, interligadas e envolvidas por α -hélices. O centro ativo é composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato). O resíduo serina é responsável pela catálise e encontra-se ligado por ligações de hidrogênio ao resíduo histidina, que por sua vez encontra-se ligado a um resíduo carboxilado (aspartato ou glutamato) (CASTRO et al., 2004; JAEGER e REETZ, 1998).

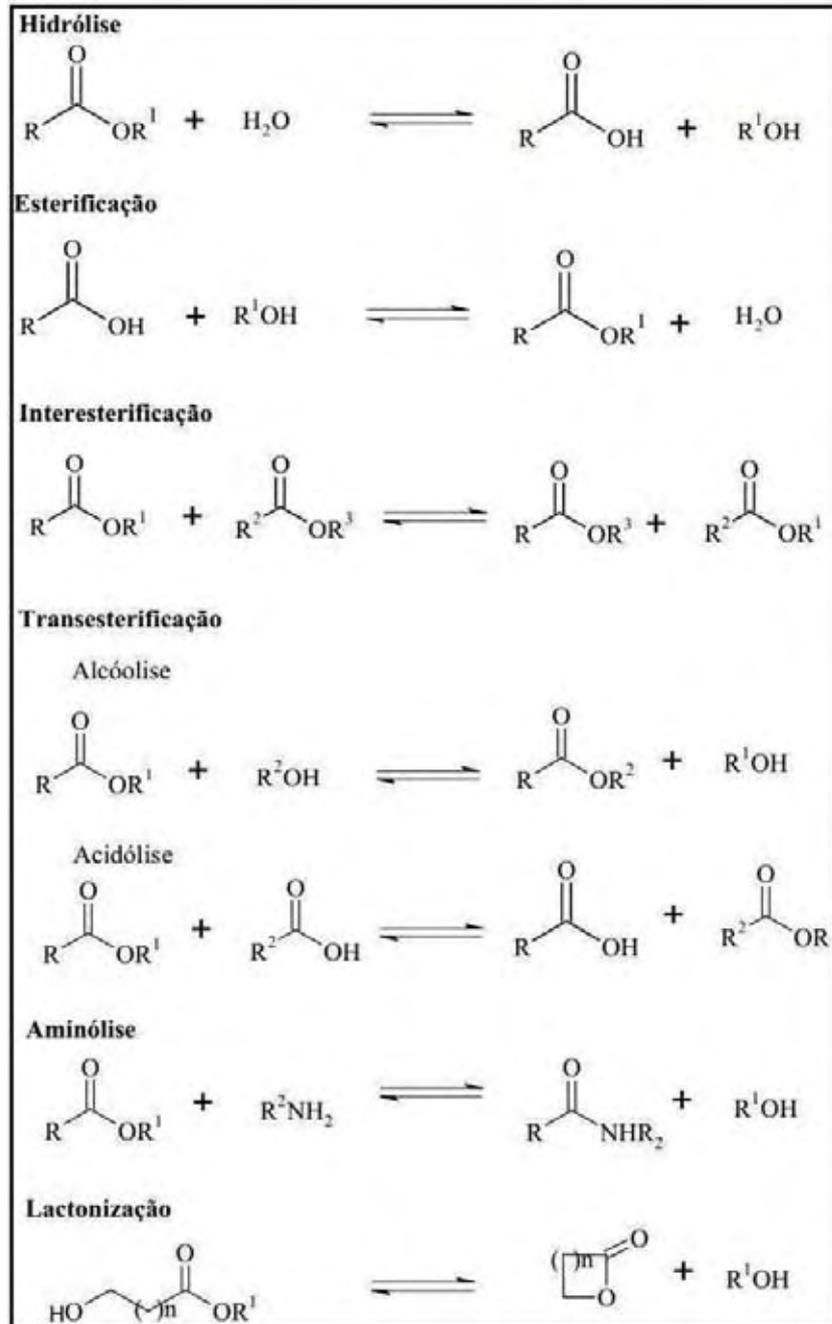


Figura 1. Reações catalisadas por lipases. Adaptado de Paques e Macedo, 2006.

Em grande parte das lipases, o sítio ativo é coberto por uma “tampa” com características hidrofóbicas, uma estrutura helicoidal, que, em ausência de interface óleo/água, deixa o sítio ativo inacessível ao substrato. Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface. Este fenômeno é chamado de ativação interfacial (CASTRO et al., 2004; JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

O uso de lipases como aditivos em detergentes (biosurfactantes) ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas; entretanto, a capacidade hidrolítica das lipases tem sido explorada em vários outros campos de atividade, como, por exemplo, na indústria de papel e celulose, para remoção de material hidrofóbico como triacilgliceróis e ceras que são indesejáveis na manufatura de papel; no tratamento de águas residuárias de laticínios, esgoto doméstico, ou proveniente de indústrias de refino de óleos que poluem solos e águas; na indústria de alimentos para a produção de flavorizantes (PANDEY et al., 2000; JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999); na maturação do queijo; na indústria farmacêutica (síntese de fármacos em suas formas enantioméricas com elevada pureza ótica devido à enantiosseletividade da enzima); e química fina (síntese de ésteres e resolução de racematos). Recentemente as lipases têm sido usadas para processos de transesterificação em meio alcoólico para a produção de biodiesel, substituindo o método tradicional da transesterificação alcalina ou ácida (BAJAJ et al., 2010).

Pela capacidade de catalisar diversas reações e a possibilidade de diferentes especificidades de substratos, as lipases apresentam um enorme potencial de aplicações, e já representam cerca de 30% das enzimas utilizadas nos processos de biotransformação na indústria, além da aplicação na área ambiental (FREIRE e CASTILHO, 2008).

3.2. Fontes de lipases

As lipases são naturalmente encontradas nos tecidos de animais, principalmente no pâncreas, de onde inicialmente eram obtidas, em plantas como a mamona (*Ricinus communis*) e a canola (*Brassica napus*), e em micro-organismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo os gêneros *Rhizopus*, *Candida* e *Pseudomonas* considerados as principais fontes produtoras desta enzima (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; PANDEY et al., 1999). Devido às suas diversas fontes produtoras cada lipase apresenta propriedades e características únicas (SAXENA et al., 2003).

Os micro-organismos (bactérias, leveduras ou fungos filamentosos) são de particular interesse para a produção de enzimas, incluindo as lipases, devido ao curto período de geração, exigências nutricionais relativamente simples, e porque as enzimas por eles produzidas normalmente são mais estáveis, possuem alto rendimento de conversão de substrato em produto, bem como o fato de serem extracelulares, facilitando sua recuperação do meio de fermentação (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; CARVALHO et al., 2005). As fontes fúngicas têm sido também preferencialmente utilizadas, não necessariamente devido às suas melhores características em relação à lipases bacterianas, mas sim porque na sua grande

maioria não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS (*Generally Regarded as Safe*) (JAEGER et al., 1994).

Em condições apropriadas de cultivo, algumas espécies de fungos filamentosos produzem quantidades consideráveis de lipases extracelulares, sendo estas separadas do meio de cultivo e da massa micelial por simples filtração e centrifugação; apenas pequenas quantidades de lipases têm sido encontradas dentro ou aderidas ao micélio fúngico, (TREICHEL et al., 2010; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; RAPP, 1995). Os fungos filamentosos são reconhecidamente ótimas fontes produtoras de lipases, com várias patentes requeridas, sendo amplamente estudadas do ponto de vista genético e bioquímico. Porém, apesar do grande número de lipases descritas na literatura, as enzimas produzidas por cada espécie possuem características únicas e, portanto, diferentes aplicações: algumas possuem a estabilidade requerida em reações de síntese, outras se destacam em reações de hidrólise.

Apesar de todos os avanços obtidos atualmente, objetivando maximizar a síntese de lipases por meio de cepas microbianas já conhecidas, é fundamental também buscar ferramentas como melhoramento genético, tecnologia de DNA recombinante, e análises genômicas, visando tornar estes micro-organismos apropriados para o uso comercial (FUNGARO e MACCHERONI, 2002). No entanto, a seleção de cepas selvagens hiperprodutoras ainda é uma técnica de grande importância, sobretudo em países com grande biodiversidade como o Brasil (FREIRE e CASTILHO, 2000).

Os micro-organismos podem produzir lipases tanto pelo método de fermentação submersa (FSM) como por fermentação em estado sólido (FES). Em ambos os casos a produção de lipases está diretamente relacionada à composição do meio de cultivo e das condições de fermentação, sendo influenciada por fatores como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono, água, agitação, presença de sais minerais e vitaminas (LIMA et al., 2003).

3.3. Produção de lipases por *Fusarium* sp.

Os fungos do gênero *Fusarium* são de ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes, ocorrendo, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas (BURGESS et al., 1994). Algumas espécies apresentam íntima associação com hospedeiros, e por isso são reconhecidas como potenciais fitopatógenos de cereais (*F. graminearum*, causador da fusariose) e da banana (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*, causador da doença do Panamá). Segundo estudos, a produção de lipases associada à produção de

micotoxinas pode estar fortemente associada ao mecanismo de infecção em cereais pelo fungo (VOIGT, SCHÄFER E SALOMON, 2005).

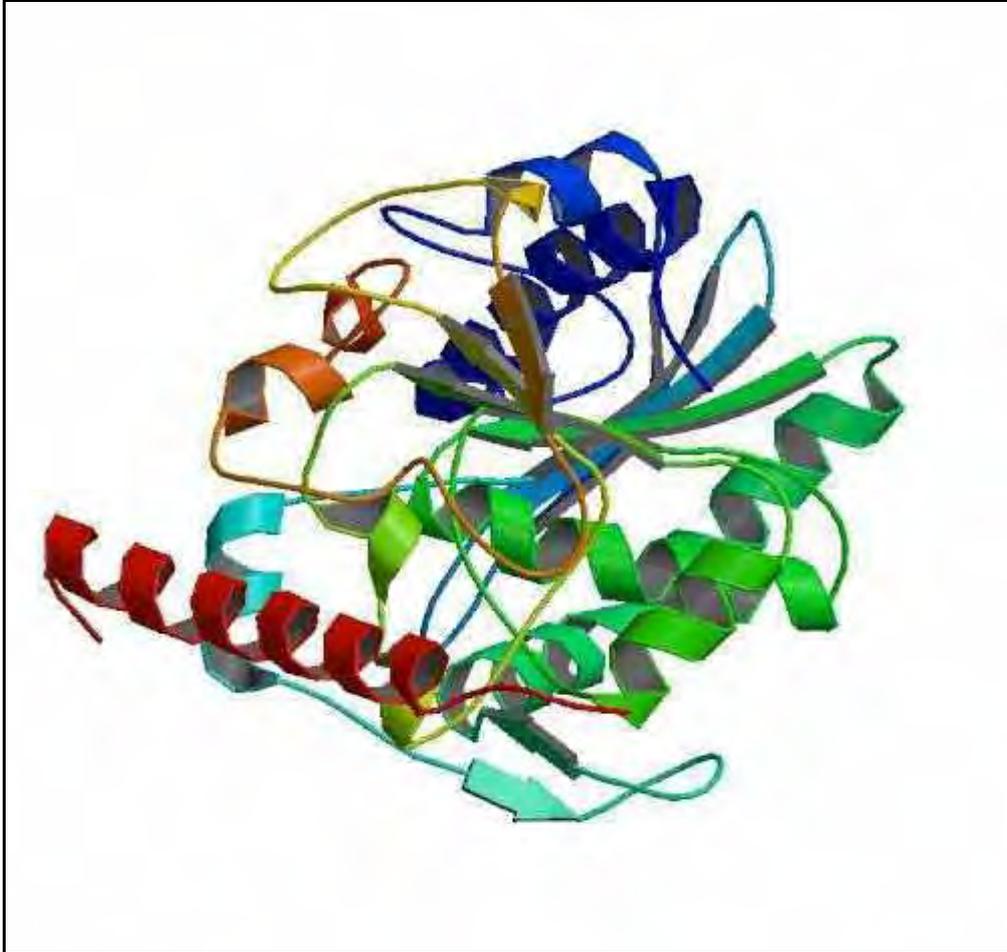


Figura 2: Modelo estrutural da lipase de *Gibberella zeae*, a forma teleomórfica do *F. graminearum*, um fungo conhecido por causar doença (fusariose) em cereais. Fonte: Protein Data Bank.

A capacidade de síntese de várias enzimas por *Fusarium* sp, tanto em fermentação submersa como em fermentação em estado sólido é amplamente discutida. Entre as enzimas produzidas encontra-se cutinases (BADENES, LEMES e CABRAL, 2010; MANNESSE et al., 1995), xilanases e celulasas (PANAGIOTOU et al., 2003), enzimas fibrinolíticas (SUN et al., 1998 e 1997) e lipases.

Um grande número de trabalhos demonstrando a produção de lipases por *Fusarium* nos mais diferentes meios pode ser encontrado na literatura. Hoshino et al. (1992) reportaram a produção de lipase por *F. oxysporum* f. sp. *lini* em meio mínimo para *Fusarium*. A produção foi de 10 U/mL, sendo o peso molecular da enzima de 30 kDa. Shimada et al. (1993), isolou do solo uma cepa de *F. heterosporum* produtora de uma lipase solvente-tolerante. A atividade obtida foi de 62700 U após 65h de fermentação em meio contendo 3% de óleo de soja. O

mesmo grupo de autores obtiveram produção de lipase por *F. solani* em meio contendo óleo de oliva (MAIA et al., 1999) e óleo de gergelim (MAIA et al., 2001). Em ambos os trabalhos, a glicose pareceu inibir o efeito estimulador do óleo, enquanto que a peptona e elementos traços favoreceram a síntese da enzima. Foi relatada também a produção de lipases intracelulares por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* cultivado em meio Basal (BM) suplementado com 1% (m/v) de óleo de oliva (RAPP, 1995).

Uma forma de baratear o custo dos processos fermentativos para produção de lipases é pelo uso de subprodutos da indústria. Nesse sentido, Quadros et al. (2009) demonstraram a possibilidade do uso de resíduos industriais para a produção de lipase por *F. oxysporum* utilizando água de maceração de milho e óleo de fritura para enriquecimento do meio de cultivo. A atividade enzimática obtida (5 U) foi semelhante à obtida quando utilizado meio sintético e óleo de oliva.

Como discutido anteriormente, o ascomiceto *Fusarium* pode ser encontrado nos mais diversos ambientes. Prova disso é o isolamento de uma cepa de *F. solani* produtora de grande quantidade de lipase (605U/mL), a partir das vísceras de um peixe coletado em um lago alcalino na China. Esta lipase mostrou atividade mesmo em temperaturas baixas como 0°C e alta estabilidade em pHs básicos (LIU et al., 2009).

Encontra-se na literatura trabalhos em que o gene responsável por codificar a lipase do gênero *Fusarium* foi transferido para outros micro-organismos. Nagao et al. (1996, 2000, 2001 e 2002), sintetizaram um lipídeo estruturado utilizando a lipase de *F. heterosporum* expressa na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estes autores relataram também que quando o gene foi transferido para a levedura houve um aumento tanto da produção de lipase quanto uma considerável melhora na estabilidade da enzima.

Não foram encontradas referências na literatura para produção de lipase pelo gênero *Fusarium* em FES, confirmando o ineditismo e a importância deste trabalho. Outras referências à lipases produzidas por este micro-organismo estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Lipases produzidas por fungos do gênero *Fusarium* sp.

Micro-organismo	Indutor	Atividade		Referência
		pH	Temp. (°C)	
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	2% (v/v) Tween-20	7,0	42	Hoshino et.al, 1992.
<i>F. heterosporum</i>	3% (v/v) óleo de soja	5,5-6,0	40	Shimada et al., 1993.
<i>Fusarium</i> sp YM-30	1% (v/v) mono-oleína	7,0	37	Mase, Matsumiya e Akiba, 1995.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	1% (v/v) óleo de oliva	5,8	45	Rapp, 1995.
<i>S. cerevisiae</i> expressando gene de <i>F. heterosporum</i>	4% (m/v) sacarose	---	---	Nagao et al., 1996, 2000, 2001 e 2002.
<i>F. solani</i> FS1	0,5% (v/v) óleo de oliva	8,6	30	Maia et al., 1999.
<i>F. solani</i> FS1	Não citado	---	---	Knight et al., 2000.
<i>F. solani</i> FS1	0,5% (v/v) óleo de gergelim	---	---	Maia et al., 2001.
<i>F. globulosum</i>	2% (v/v) óleo de neem	10,0	37	Gulati et al., 2001 e 2005.
<i>F. oxysporum</i> AM3	1,5% (v/v) trioleína	9,0	35-40	Camargo-de-Morais et al., 2003.
<i>F. oxysporum</i>	0,2% (v/v) óleo de girassol	7,0	55	Saad, Kansoh e Gadalla, 2004.
<i>F. graminearum</i>	2% (v/v) óleo de germen de trigo	---	---	Voigt, Schäfer e Salomon, 2005
<i>F. oxysporum</i>	1% (v/v) óleo de oliva	8,0	50	Prazeres, Cruz e Pastore, 2006.
<i>Aspergillus oryzae</i> expressando gene de <i>F. heterosporum</i>	2% glicose	---	---	Hama et al., 2008.
<i>F. oxysporum</i>	1% (v/v) óleo de fritura	---	---	Quadros et al., 2009.
<i>F. solani</i> N4-2	3% (v/v) óleo de oliva	9,0	30	Liu et al., 2009.
<i>Aspergillus oryzae</i> expressando gene de <i>F. heterosporum</i>	2% glicose	---	---	Koda et al., 2010.
<i>F. oxysporum</i>	1% (v/v) óleo de oliva	---	---	Bicas et al., 2010.
<i>F. oxysporum</i>	1,5% (v/v) óleo de oliva	6,0-8,0	20-30	Rifaat et al., 2010.
<i>F. oxysporum</i>	1% (v/v) óleo de oliva	---	---	Quadros, Duarte e Pastore, 2011

3.4. Aplicação das lipases

As propriedades das enzimas, tais como seletividade, atuação em condições brandas, catálise sem geração de produtos tóxicos ou poluentes e economia de água e energia, tornou-as de grande interesse para aplicação em processos industriais (SCHMID et al., 2002).

As lipases representam cerca de 30% das enzimas usadas em processos de biotransformação pela indústria (FREIRE e CASTILHO, 2008), sendo que o uso como aditivos em detergentes (biosurfactantes) ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas. Isso se deve ao fato de que as lipases utilizadas para este fim não necessitam de um alto grau de pureza nem de especificidade, o que resulta em enzimas de menor custo de produção. Entretanto, a capacidade hidrolítica das lipases tem sido explorada em vários outros campos de atividade, como, por exemplo, na indústria de papel e celulose, para remoção de material hidrofóbico como triacilgliceróis e ceras que são indesejáveis na manufatura de papel, na indústria do couro, em processos de biodegradação e tratamento de águas residuárias (efluentes) ricas em gorduras, provenientes de fábricas, frigoríficos, laticínios, ou de indústrias de refinação de óleos e gorduras que poluem solos e águas (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; PANDEY et al., 1999). Outra área em que as lipases são largamente empregadas é na indústria alimentícia, para modificar as propriedades organolépticas do alimento, como textura e sabor; na produção de flavorizantes, aromatizantes e na maturação do queijo.

O mercado farmacêutico e de cosméticos também é um destino importante para as lipases de alto grau de pureza e especificidade. Estas são importantes para a síntese de fármacos em suas formas enantioméricas com elevada pureza ótica, sem oferecer riscos à saúde humana (JAEGER e EGGERT, 2002). A indústria de química fina tem empregado as lipases para resolução de racematos e em processos de transesterificação em meio alcoólico para a produção de biodiesel, substituindo o método tradicional da transesterificação alcalina ou ácida (BAJAJ et al., 2010). Porém, a transesterificação enzimática ainda necessita de muitos estudos, uma vez que apesar de apresentar vantagens sobre o método químico, ainda não é vantajoso para a indústria devido ao alto custo que apresenta.

Aplicações biotecnológicas envolvendo lipases produzidas por *Fusarium* têm sido relatadas recentemente. Na área de bioenergética, autores demonstraram a possibilidade de produção de biodiesel via transesterificação enzimática por *Aspergillus oryzae* (HAMA et al., 2008; KODA et al., 2010) que expressava o gene para produção de lipase de *F. heterosporum*. Da mesma forma, a lipase produzida por *F. globulosum* em meio contendo óleo de neem mostrou-se altamente versátil em reações de biocatálise. Esta enzima foi usada com sucesso

em reações de acetilação e desacetilação de hidróxi-fenóis e esterificação de ácidos graxos frente a diferentes alcoóis, açúcares, sorbitol e ácido ascórbico (GULATI et al., 2001). Outra importante aplicação das lipases pode ser na sanitização de ambientes hospitalares. Estudos reportaram que a lipase produzida por uma cepa de *F. oxysporum* em combinação com um biosurfactante foi usado com eficiência para a inibição do crescimento de certas bactérias (QUADROS, DUARTE e PASTORE, 2011).

3.5. Fermentação em estado sólido

Existem dois tipos básicos de fermentação para produção de ácidos, enzimas e outros metabólitos: a fermentação submersa (FSM) e fermentação em estado sólido, ou fermentação em meio semi-sólido (FES). A fermentação sólida ocorre de forma natural, como quando uma fruta ou um pão mofa ou quando fungos atacam matéria orgânica em decomposição. Como um processo biotecnológico, ela é há muito empregada em países africanos e do Oriente, visando a elaboração ou enriquecimento de alimentos. Atualmente países da América e Europa têm estudado a FES como uma importante ferramenta para o aproveitamento de resíduos, pois pode ser usada para enriquecimento protéico do mesmo (compostos para rações), para detoxificação, com eliminação de substâncias recalcitrantes, e para compostagem (PANDEY, 2003), bem como para produção de metabólitos de alto valor agregado como enzimas, etanol, ácidos orgânicos, biopesticidas, e antibióticos (BIANCHI, MORAES E CAPALBO, 2001). A FES também pode ser empregada na produção de esporos e cogumelos, impossíveis de se obter em fermentação submersa.

Na FES, o micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato que compõe o meio (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo-os e secretando os metabólitos, (MITCHELL et al., 2006; RAHARDJO et al., 2005). O material sólido é geralmente insolúvel e age como suporte físico para as células e como fonte de nutrientes para o micro-organismo (por exemplo, resíduos da agroindústria). Contudo, nem sempre o substrato necessita ser insolúvel. Algumas vezes um substrato líquido pode ser usado para umedecer uma matriz sólida inerte (como poliuretano ou resinas poliméricas) que será usada como suporte de crescimento das células microbianas (BIANCHI, MORAES E CAPALBO, 2001).

Entre todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES em virtude do elevado grau de interação com os componentes sólidos, sendo que não há líquido livre no sistema. Na FES, a baixa atividade de água (a_w) no substrato limita o número de micro-organismos, evitando a contaminação bacteriana e

favorecendo a utilização dos fungos, devido a sua capacidade de tolerar ambientes com baixa quantidade de água (COUTO E SANROMÁN, 2005). Assim, os fungos são utilizados em vários processos, desde a compostagem até a produção de enzimas, enquanto que leveduras são mais usadas na indústria de alimentos e na produção de etanol. Outro ponto importante para o crescimento e atividade microbiana no substrato é o tamanho das partículas (granulometria). Geralmente pequenas partículas fornecem uma grande superfície de contato com o micro-organismo, mas resulta num baixo crescimento. Por outro lado, partículas maiores fornecem melhor aeração, troca gasosa e dissipação do calor, mas limitam a superfície de contato para o micro-organismo. Portanto, a granulometria do substrato deve ser selecionada de acordo com cada processo em particular (PANDEY ET AL., 1999).

Existem ainda outras vantagens na FES como: meio de cultivo mais barato por ser geralmente constituído de resíduos de produtos agrícolas não refinados (por exemplo, palhas, bagaços e tortas vegetais), que muitas vezes são até descartados pelas indústrias de beneficiamento agrícola; menor produção de resíduos resultante do processo fermentativo (SANTOS et al., 2006; HÖLKER, HÖFER e LENZ, 2004). Pelo fato da fermentação em estado sólido se aproximar mais do ambiente natural de desenvolvimento do fungo, permite que se possa trabalhar com linhagens silvestres dos mesmos, que muitas vezes não se desenvolvem na fermentação submersa (HÖLKER, HÖFER e LENZ, 2004). Autores têm demonstrado que a FES produz enzimas de forma mais concentrada que em FSM, facilitando sua recuperação do meio de cultivo. No entanto há alguns problemas envolvendo a FES como controle da temperatura do meio, dificuldade nas medições de pH, O₂ e CO₂, escassez de biorreatores automatizados, e complexidade em quantificar a biomassa microbiana produzida e de cálculos de rendimento e conversão do substrato em produto devido à heterogeneidade do mesmo (SANTOS et al., 2006; BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001).

As enzimas, incluindo-se as lipases, e outros metabólitos microbianos são tradicionalmente obtidos por processos de fermentação submersa. Neste tipo de fermentação, além de um melhor controle do processo, a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa são facilitadas, sendo realizadas por filtração simples ou centrifugação para a remoção das células. O sobrenadante da cultura é utilizado para os estudos enzimáticos e o crescimento microbiano é quantificado após secagem da biomassa (LIMA et al., 2003). Entretanto, a fermentação em estado sólido apresenta vantagens em relação à primeira como já citado, além de representar uma alternativa aos processos tradicionais. Outra possibilidade que apresenta é vincular o processo fermentativo diretamente

à aplicação da enzima, sem que seja necessária a extração, purificação e imobilização da mesma para que seja utilizada.

3.5.1 Produção de lipases por fermentação em estado sólido

Embora as lipases sejam produzidas tradicionalmente por fermentação submersa, a fermentação em estado sólido tem sido estudada como tecnologia de produção alternativa, devido às vantagens que proporciona em relação à FSM. Contudo, a produção de enzimas proteolíticas tem sido apontada como a causa de baixos rendimentos de lipases produzidas em FES em alguns trabalhos (COUTO E SAROMÁN, 2005).

Substratos derivados de grãos ricos em conteúdo lipídico, usados na indústria de óleos, como soja, girassol, milho, babaçu e azeitona são usados para produção de lipases por fungos e bactérias em FES; subprodutos como farelo de casca de trigo, farelo de cevada e arroz, dentre outros, também vêm sendo utilizados (FERNANDES et al., 2007). Nesse sentido, uma nova e promissora fonte de óleo para a indústria do biodiesel e mais uma alternativa de substrato para FES é o crambe (*Crambe abyssinica*), um vegetal que possui de 28 a 38% de óleo em sua semente, além do alto teor de proteína. É uma cultura de fácil manejo, pois assemelha-se muito à da soja e com um ciclo mais rápido. O óleo produzido é rico em ácido erúico e por isso não é comestível, sendo exclusivamente usado para fins industriais como lubrificante e opção à produção de biocombustível (GUIRRA, 2009; SOUZA et al., 2009).

A produção de lipases por FES mostra-se, em alguns casos, dependente da relação C/N e do tipo de fonte de carbono do meio (DOMINGUEZ et al., 2003; GOMBERT et al., 1999). Por isso, vários trabalhos buscam elucidar os efeitos da adição de nutrientes e de indutores durante o processo fermentativo, tanto em fermentação sólida, quanto em fermentação submersa. Em alguns casos, a suplementação tem possibilitado aumentos consideráveis na produção de lipases. Contudo, trabalhos que utilizam a FES para a produção de lipase mostram que, dependendo da composição do substrato utilizado na fermentação (principalmente nos ricos em lipídeos e proteínas), a adição de fontes complementares de carbono e nitrogênio é desnecessária (KAMINI, MALA e PUVANAKRISHNAN, 1998). Por exemplo, Dominguez et al. (2003) relataram que o uso de materiais orgânicos como suporte para produção de lipases, diminuiu não só o custo do processo, mas também proporcionou maiores atividades lipolíticas quando comparado ao uso de suportes sintéticos. A utilização de nozes trituradas como substrato gerou cerca de 70U/g de atividade enzimática após 10 dias de fermentação, superando os resultados obtidos com farelo de cevada suplementado com óleo de girassol, milho e oliva.

Como já discutido, apesar da possibilidade de produção de lipases em FES, até o momento não foi relatado o uso deste processo para produção da enzima pelo gênero *Fusarium*. Desta forma, mais uma vez destaca-se a importância e o ineditismo deste trabalho.

3.6. Esterificação e transesterificação visando produção de biodiesel

A proteção do meio ambiente e a conservação de recursos naturais não renováveis é um dos temas mais debatidos na atualidade, pois existe quantidade finita de combustíveis fósseis como o petróleo, sendo que este pode ter suas reservas esgotadas em poucas décadas se mantida a taxa atual de consumo. Sendo assim, faz-se necessário a busca por fontes alternativas de combustíveis. O biodiesel, também conhecido como éster alquílico de ácido graxo é um forte candidato para substituir o diesel de petróleo já que suas características são semelhantes, além de muitas vantagens, entre elas o fato de que matéria-prima não deriva do petróleo e, como tal, é menos tóxico e proveniente de fontes renováveis, é biodegradável e em relação ao diesel convencional, seus produtos de combustão têm níveis reduzidos de poluentes, principalmente derivados de enxofre. Pode ser usado puro ou, mais comumente, como uma mistura com diesel convencional, sem necessitar de qualquer modificação nos motores. O Brasil segue a tendência de adotar biocombustíveis em substituição aos combustíveis fósseis, como já ocorreu anteriormente com o etanol, e por isso, a partir de 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado no país passou a ter adição de 5% de biodiesel (mistura conhecida como B5), resultando em economia e redução da poluição. A meta para os próximos anos é aumentar essa porcentagem de biodiesel, até chegar ao chamado B-100 (100% de biodiesel) (SEBRAE, 2010).

Os processos para produção do biodiesel podem ser químicos ou enzimáticos. Os métodos usados são a esterificação de ácidos graxos ou, mais comumente, a transesterificação (alcoólise) de óleos ou gorduras com um álcool na presença de um catalisador, sendo este uma base, ácido ou enzima (Figura 3). Entre eles, as bases como NaOH ou KOH são as mais usadas (SEBRAE, 2010). Embora eficiente nos termos do tempo de reação, o processo químico de síntese de biodiesel apresenta inconvenientes como a demanda de altas quantidades de energia, dificuldade de recuperação do glicerol e de remoção do catalisador ácido ou alcalino do produto final e tratamento da água residuária (RIBEIRO et al., 2011; GHALY et al., 2010).

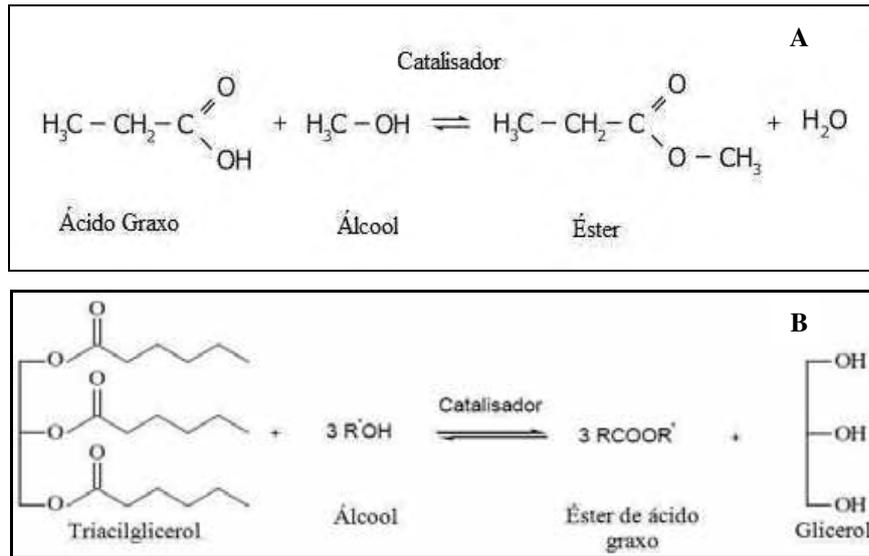


Figura 3. Reações de esterificação (A) e de transesterificação (B) na presença de catalisador.

Os processos de transesterificação e esterificação enzimática com o uso de lipases apresentam vantagens como: reação ocorre em condições amenas (temperatura próxima à ambiente e pH neutro), o éster obtido é facilmente recuperado e purificado e praticamente não há geração de resíduos e, assim, pode se sobrepôr aos problemas relacionados ao processo químico. Porém a comercialização deste sistema é dificultada pelo preço da produção da lipase, significativamente mais alto do que os preços associados com o processo padrão. Além disso, existem questões relacionadas à instabilidade enzimática (à temperatura ou solventes orgânicos), e à dificuldade de recuperação da mesma após a catálise, obrigando o desenvolvimento de técnicas e materiais para imobilização enzimática (FJERBAECK, CHRISTENSEN e NORDDHAL, 2009; MU, XIAU e ZHANG, 2008). Para contornar estes desafios, diferentes estratégias têm sido propostas, como por exemplo, a seleção de cepas microbianas selvagens, potenciais produtoras de enzimas com características de estabilidade passíveis de aplicação em processos industriais e o desenvolvimento de tecnologias de fermentação que permitam redução de custo e associação de etapas entre a produção e aplicação da enzima (CHEN, DU e LIU, 2008; MOREIRA et al., 2007; KAIEDA et al., 1999).

A imobilização de enzimas tem sido usada para que a mesma possa ser reaproveitada nos processos biocatalíticos e, conseqüentemente, reduzir os custos. Enzimas imobilizadas são também mais estáveis quanto à temperatura e desnaturação química ou por cisalhamento. Em caso de biocatalisadores em meio não-aquoso, a imobilização tem sido relatada por resultar em melhor atividade. Tem sido demonstrado que o gel de sílica usado para imobilização promove a migração da acila no processo de transesterificação, o que aumenta o rendimento

da reação (BAJAJ et al., 2010; GHALY et al., 2010;). A atividade enzimática também depende das propriedades físicas e químicas da imobilização. Por exemplo, em caso de lipases imobilizadas em sol-gel, os grupos alquila livres de seus precursores promovem um microambiente lipofílico e interagem com a lipase levando à sua ativação, de forma semelhante à interação interfacial. No entanto, a imobilização também pode causar a limitação de transferência de massa interna e externa para as grandes moléculas como os triacilgliceróis e ésteres alquilados de ácidos graxos (BAJAJ et al., 2010; FJERBAECK, CHRISTENSEN e NORDDHAL, 2009).

Uma alternativa interessante para a redução de custos nos processos de transesterificação enzimática consiste na produção de lipases em fermentação sólida, uma vez que existe a possibilidade de que a enzima seja adsorvida e imobilizada no próprio substrato e, conseqüentemente, da adição do material sólido fermentado aos meios reacionais de esterificação e transesterificação, como demonstrado por Salum et al., (2010) e Fernandes et al. (2007). Estes autores relataram não só a produção de lipases em FES pela bactéria *Burkholderia cepacia*, como desenvolveram uma metodologia para utilização do suporte contendo as células e enzimas extracelulares diretamente no meio reacional para biocatálise, evitando as etapas de concentração, purificação e imobilização da enzima. Nos referidos trabalhos, foi observada a síntese do éster oleato de etila utilizando os substratos sólidos fermentados por *B. cepacia*, com rendimentos melhores do que quando a síntese do éster ocorreu pela adição da enzima livre no meio reacional. O sólido fermentado pôde ainda ser usado por 10 vezes sem que houvesse perda significativa da atividade de esterificação. Zago (2010) também demonstrou ser possível a associação do uso do sólido fermentado por *Rizhopus microsporus* em reações de esterificação e transesterificação, obtendo resultados satisfatórios.

Desta forma, estudos de otimização da produção e da utilização de lipases e de novas fontes de óleo vegetal para a produção do biocombustível, promovendo melhores resultados, tornam-se ainda mais atrativos tanto para o meio ambiente quanto para a indústria, agronomia e economia.

3.7. Crambe (*Crambe abyssinica*)

Originário da Etiópia, país africano de clima quente e seco, e domesticado na Europa, na região do Mediterrâneo, o crambe (*Crambe abyssinica*) pertence à família das crucíferas, a mesma da colza e da canola. Seus grãos oleaginosos contêm um óleo não comestível usado em produtos industriais. A planta é encontrada em áreas tropicais e subtropicais da África, no

Oriente Médio, na Ásia Central e Ocidental, na Europa, nos Estados Unidos e na América do Sul.

O óleo de crambe é utilizado para fabricar uma infinidade de itens de consumo industrial nos países norte-americanos, tais como lubrificantes, fluidos de transferência de calor, surfactantes, cosméticos, poliésteres, plásticos e nylons (*Economic Research Service; VOSS, 2006*). No Brasil seu cultivo iniciou-se em 1995, sendo o único país que estuda a viabilidade do cultivo voltado à produção de biodiesel, uma das apostas do governo visando o crescente mercado de bicompostíveis (*GUIRRA, 2009*).

A semente do crambe fornece até 38% de óleo, bem como alto teor de proteínas (*PILAU et al., 2011, SOUZA et al., 2009*). O óleo de crambe é menos susceptível à oxidação do que os óleos de soja e girassol, isso por que enquanto no óleo de crambe o ácido graxo predominante é o ácido erúico (58,5%), monoinsaturado (22:1), os óleos de soja e girassol contêm quantidades mais expressivas de ácidos graxos poli-insaturados, como o linoléico (18:2) e o linolênico (18:3) (*SILVA et al. 2009; VOSS, 2006*).

A Fundação MS, situada em Maracaju MS é a pioneira no país nos estudos com o crambe, e detém os direitos de comercialização das sementes do cultivar FMS Brillante. Segundo a fundação, o plantio apresenta produtividade que pode variar de 1.000 a 1.500 Kg por hectare, o ciclo produtivo é rápido e a cultura é rústica e de baixo custo. A tecnologia para a cultura do crambe é simples, uma vez que a maquinaria da soja pode ser facilmente adaptada para o uso, além da simplicidade nos métodos de extração do óleo por meio de prensa ou extrusora. Sobretudo, a cultura do crambe visa favorecer a agricultura familiar, segmento econômico visto como importante produtor de oleaginosas para a produção de biodiesel.

Pelas características apresentadas, o crambe é tido como uma importante alternativa de matéria prima para o biodiesel: possui boa quantidade de óleo, baixo custo de plantio, boa produtividade e precocidade de colheita. Estudos recentes comprovam a viabilidade do óleo de crambe para produção de biodiesel, porém estes são escassos (*SILVA et al. 2009; SOUZA et al., 2009*), sendo ainda mais escassos os estudos de transesterificação enzimática dessa matéria prima (*STEINKE ET AL., 2000*). Ainda mais, o resíduo sólido originado após a extração do óleo, chamado de torta de crambe, pode vir a ser uma importante fonte de substrato para a FES visando a produção de lipases, especialmente pelo alto teor de óleo encontrado nesta semente.

CAPÍTULO I: PRODUÇÃO DA LIPASE POR *Fusarium oxysporum* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO BRUTO

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Micro-organismo e manutenção da cepa

Uma cepa de fungo filamentoso foi isolada pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Assis, a partir de matéria orgânica coletada na Mata Atlântica do litoral norte do Estado de São Paulo (Núcleo Picinguaba, Parque Estadual da Serra do Mar) e selecionada como produtora de lipases após cultivo tanto em meio sólido, contendo óleo de oliva e o corante Rodamina B nas condições descritas por Lima et al. (2004 a), quanto em fermentação submersa. Este gênero é encontrado naturalmente no solo e é conhecido por ser um potencial fitopatógeno na agricultura.

A cepa foi mantida em meio BDA (batata-dextrose ágar), com incubação por um período de 7 a 10 dias à temperatura de 28°C. Em seguida, foi preparada uma suspensão de esporos com concentração de 10^8 esporos/mL, adicionada de glicerol de modo a se obter uma suspensão a 15% de glicerol. Essa suspensão foi acondicionada em microtubos tipo “ependorf”, e mantida a -20°C. Também foram mantidas cepas repicadas em tubos *slant* contendo meio BDA.

1.2. Produção da lipase por *Fusarium oxysporum* em FES

1.2.1. Substratos usados na FES

Os substratos estudados como meio para FES foram: bagaço de cana de açúcar (BCA, *Saccharum sp.*) proveniente de usina de álcool e açúcar (Raizen); farelo de soja (FS, *Glycine max*) e farelo de milho (FM, *Zea mays*), provenientes da extração do óleo e usados como componentes de ração animal (Landtech); torta de mamona (TM, *Ricinus communis*) proveniente da extração do óleo (A. Azevedo Óleos) e torta de crambe (TC, *Cambre abyssinica*) proveniente da extração de óleo em prensa manual (Fundação MS).

1.2.2. Determinações de granulometria, capacidade de absorção de água e composição centesimal dos substratos

Os substratos foram peneirados de modo a se obter a fração retida entre 1,0 e 2,0 milímetros. Para determinar a capacidade de absorção de água, 100 mL de água destilada foram adicionados à 10g de substrato seco. Após 24 h o substrato foi filtrado a vácuo, novamente pesado, e o volume de água absorvido foi determinado pela diferença da massa entre substrato seco e úmido.

A análise da composição centesimal dos substratos foi feita pelo Centro de Pesquisa em Ciências (CEPECI) da Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA) utilizando os métodos de Weende e Kjeldahl (A.O.A.C., 1993).

1.2.3. Cultivo em FES

A linhagem de *F. oxysporum* foi repicada em frascos *Erlenmeyers* de 125mL contendo meio BDA e mantido a 28°C por um período de 7 a 10 dias. Após o crescimento, a superfície foi lavada com água destilada estéril para remoção dos conídeos, visando o preparo de uma suspensão contendo 10⁸ esporos/mL, a ser inoculada sobre o substrato sólido.

As fermentações se deram em *Erlenmeyers* de 250mL contendo 10g do substrato seco, umedecido com tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0, de modo a obter 60% de umidade no experimento e adicionado 1% (v/m) de óleo de oliva. Os frascos foram então inoculados com 1mL da suspensão de esporos descrita acima e incubados em estufa a 28°C durante 120h, com retirada de amostras em intervalos de 24h. A fim de garantir condições estéreis de crescimento do micro-organismo, todos os meios (de propagação, pré-inóculo e de produção), bem como todos os materiais utilizados, foram autoclavados a 121°C, durante 20 minutos.

Para avaliar a produção enzimática, os diferentes cultivos foram acompanhados por determinação de atividade lipolítica por espectrofotometria frente à hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila. O substrato que proporcionou maior produção de lipase foi utilizado nos demais estudos de produção e caracterização enzimática.

1.2.4. Influência da adição de óleos vegetais

Após a determinação de qual o melhor substrato para a produção da lipase por *F. oxysporum*, foi avaliada a influência da adição de diferentes óleos ao substrato, visando aumentar a produção da enzima. Para tanto foram feitos ensaios sem adição de óleo ou com adição de óleos de oliva, soja, milho, crambe em proporções de 1% e 3% (v/m).

1.2.5. Influência da adição de sais minerais

Ao meio de cultivo foram adicionados volume de água, tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0 ou solução de sais minerais Czapeck (NaNO_3 , 3g/L; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g/L; KCl , 0,5g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01g/L), de modo a se obter 60% de umidade requeridos no experimento.

1.3. Extração e obtenção do extrato bruto

Para a determinação da atividade lipolítica e de proteínas totais, foi necessária a extração da enzima. Para isto, foram adicionados 40 mL de solução NaCl 1% (m/v), seguido de agitação em shaker (180 rpm, 20°C, 45 min), prensagem manual, filtração em gaze e centrifugação (3000 rpm, 10 min) para remoção das partículas sólidas. O sobrenadante, chamado de extrato bruto, foi coletado e o precipitado descartado. A fim de conservá-lo, foi adicionada azida sódica para evitar o crescimento de micro-organismos. Para testes de extração enzimática, a solução salina foi substituída por água destilada ou Triton X-100 0,5% (m/v). A determinação da atividade lipolítica no extrato bruto foi utilizada como parâmetro para avaliação das diferentes condições de cultivo. A Figura I.1 resume as etapas para obtenção do extrato bruto.

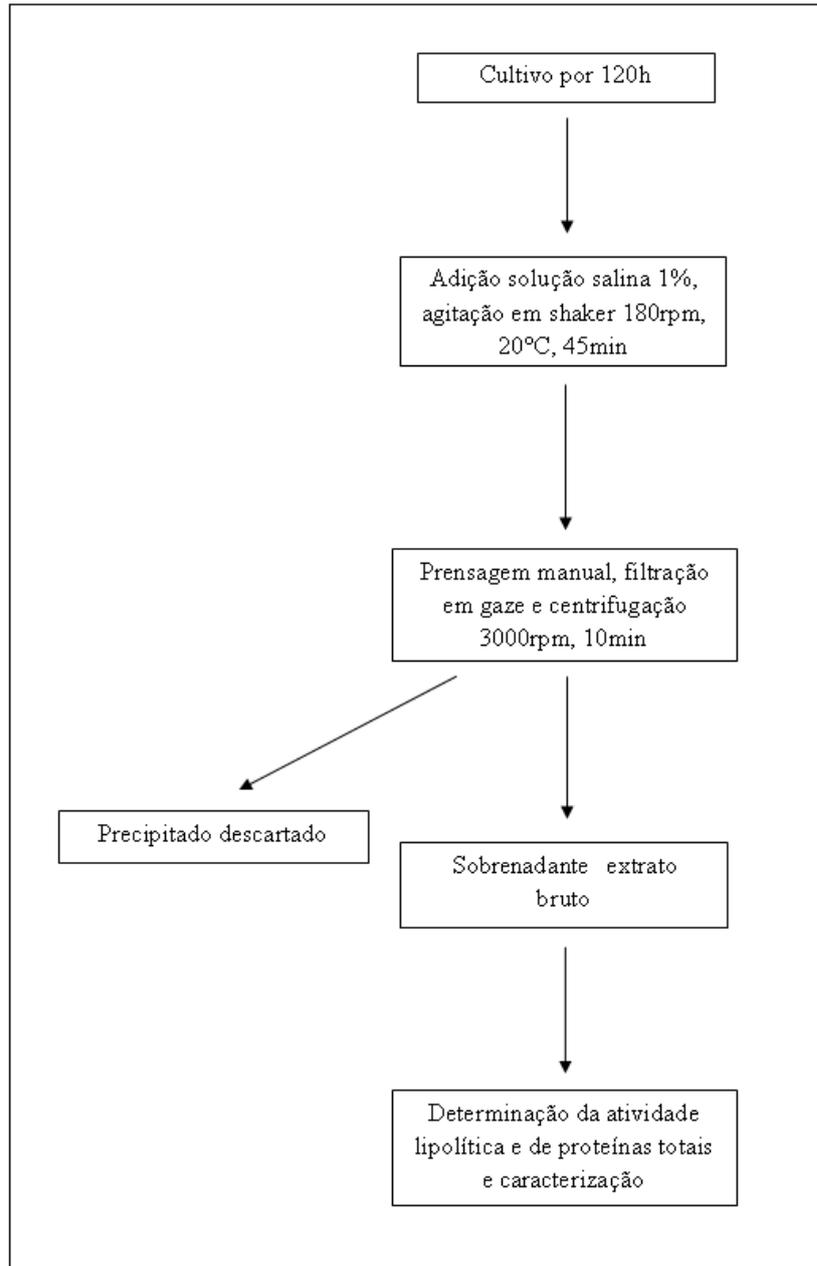


Figura I.1: Esquema geral para obtenção do extrato bruto de *F. oxysporum*.

1.4. Métodos analíticos

1.4.1. Determinação da atividade lipolítica através da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila

A determinação da atividade enzimática a partir do extrato bruto foi feita pelo método da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) a 410nm (Figura I.2). Este método espectrofotométrico foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo

modificado por Lima et al. (2004 a). As condições padrões do ensaio foram definidas como pH 8,0 em tampão fosfato 0,05 mol/L e temperatura de 37°C. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1µmol de *p*-nitrofenol (*p*NP, de coloração amarelada), por minuto. O coeficiente de extinção molar do *p*NP (nestas condições, $\epsilon = 1,5$) foi então utilizado para relacionar a concentração do produto com o coeficiente da reta obtida pela cinética enzimática, segundo a equação $\epsilon \cdot a \cdot b = C$, onde ϵ é o coeficiente de extinção molar, a é o coeficiente da reta, b é o caminho óptico (1 cm) e C é a concentração molar do *p*NP. A atividade lipolítica foi expressa em unidades por grama de substrato seco (U/gss) quando referia-se a produção da enzima ou em unidades por mililitro (U/mL) nos ensaios de caracterização enzimática. Esta mesma metodologia foi empregada para medir a atividade lipolítica do sólido fermentado.

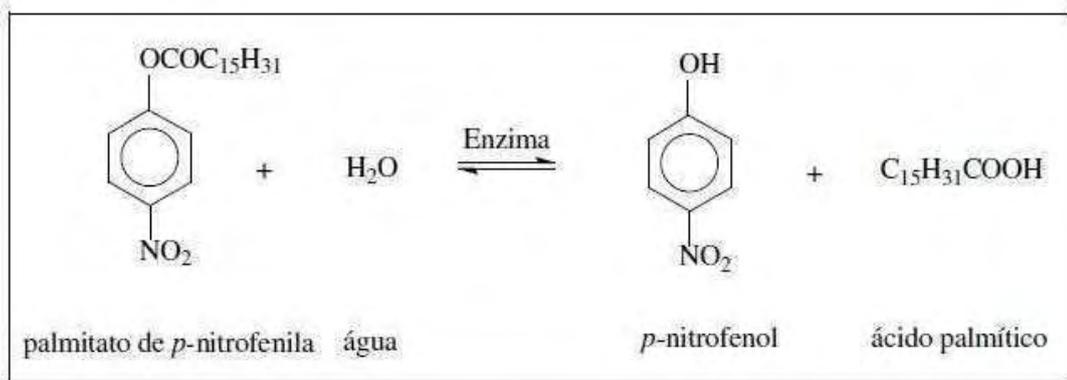


Figura I.2: Hidrólise do *p*NPP liberando *p*NP e ácido palmítico. O *p*NP possui coloração amarelada e pode ser lido à 410nm.

1.4.2. Determinação de proteínas totais

A dosagem de proteínas do extrato bruto foi feita de acordo com o método de Bradford (1976). Nesse método, mede-se a coloração azulada (595nm) adquirida pela ligação do corante Comassie-Blue G-250 com os grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. A absorbância foi relacionada à concentração de proteínas a partir da curva de calibração construída com o padrão soro-albumina bovina (BSA).

1.5. Caracterização bioquímica do extrato enzimático de *F. oxysporum* produzida por FES

1.5.1. Influência da temperatura e pH na atividade e estabilidade enzimática

A atividade enzimática foi medida pelo método da hidrólise do *p*NPP em temperaturas entre 20°C e 70°C. Para estabilidade enzimática, o extrato bruto foi incubado durante 1h nas

mesmas temperaturas descritas acima e a atividade medida segundo o método padrão (37°C). Também foi estudada a influência da estocagem do extrato enzimático por longos períodos (até 30 dias) à baixas temperaturas (4°C e -20°C).

Para verificar a influência do pH na atividade, o meio reacional foi preparado com diferentes tampões a 0,05 mol/L (citrato-fosfato pH 3,0 – 7,0; fosfato pH 7,0 – 8,0; tris-HCl pH 8,0 – 9,0 e glicina-NaOH pH 9,0 – 10,0). Uma alíquota dessa reação foi adicionada ao tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0 em banho de gelo e o *p*NP liberado pela ação enzimática foi lido em 410nm (Lima et al., 2004 a). Para medir estabilidade ao pH, o extrato bruto foi incubado durante 2h nos mesmos tampões e a atividade lipolítica residual medida segundo o método padrão.

1.5.2. Estabilidade em solventes orgânicos

O extrato enzimático foi incubado durante 1h em diferentes proporções (20, 40, 60 e 80% v/v) de solventes polares (metanol, etanol e isopropanol). Para solventes apolares (*n*-hexano, *n*-heptano e iso-octano), um volume conhecido da enzima foi adsorvido em papel de filtro e incubada durante 1h em 100% do solvente. Em seguida o papel de filtro foi imerso em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0 durante 30 min para dessorção da enzima. Em todos os protocolos a atividade foi mensurada segundo método padrão e compara ao controle (sem incubação em solvente).

1.5.3. Estabilidade em surfactantes

Para avaliar a estabilidade frente a diferentes surfactantes, o extrato bruto foi incubado durante 1h em diferentes proporções (0,01%, 0,10% e 0,50%) dos seguintes detergentes: Triton X-100 e Tween-80 (não-iônicos); dioctil sulfosuccinato de sódio (AOT) e dodecil sulfato de sódio (SDS), ambos aniônicos; e brometo de cetil trimetil amônio (CTAB, catiônico). Em seguida a atividade residual foi medida segundo método padrão.

1.5.4. Atividade lipolítica frente a diferentes substratos

A atividade lipolítica determinada por titulometria foi baseada no método de Stuer et al. (1986). O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação de uma lipase a partir de triacilgliceróis. Para tanto, foram testados diversos substratos (tributirina, tricaprilina, trioleína, óleos de dendê, oliva, soja, linhaça, crambe e frango). O ensaio foi realizado durante 1h à 200rpm e 37°C. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 µmol de ácidos graxos por minuto.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Produção da lipase por *F. oxysporum* em FES

2.1.1. Produção da enzima por FES utilizando diferentes substratos

Foi observada a presença de atividade lipolítica no cultivo do ascomiceto *F. oxysporum* em cultivo em meio BDA contendo óleo de oliva e Rodamina B, fato evidenciado pela fluorescência do corante quando submetido à luz ultravioleta de 365nm (Figura I.3A), bem como pelo crescimento em meio contendo solução de sais Czapeck e óleo de oliva 1,5% (v/m) como única fonte de carbono (Figura I.3B), assim como em testes de fermentação submersa.

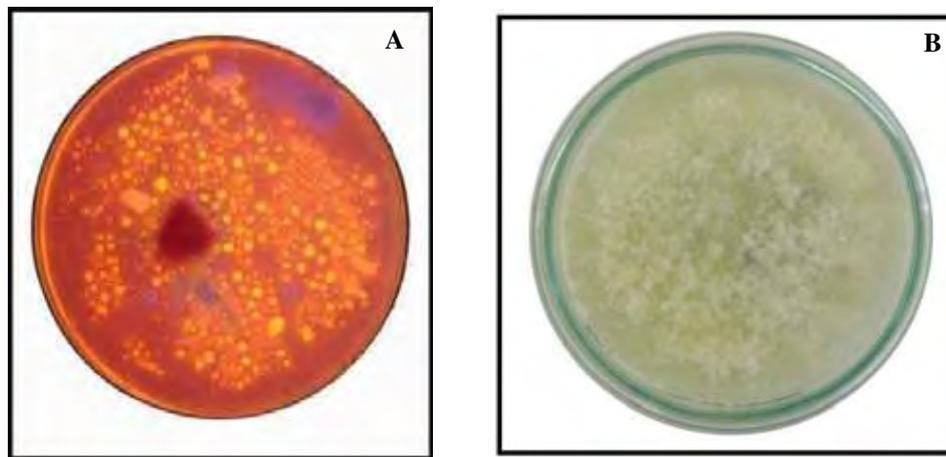


Figura I.3: A) Cultivo de *F. oxysporum* em meio contendo Rodamina B. O halo alaranjado evidenciado pela exposição à luz UV de 365nm indica produção de lipase. B) *F. oxysporum* cultivado em meio contendo solução de sais Czapeck e óleo de oliva 1,5% (v/m) como única fonte de C.

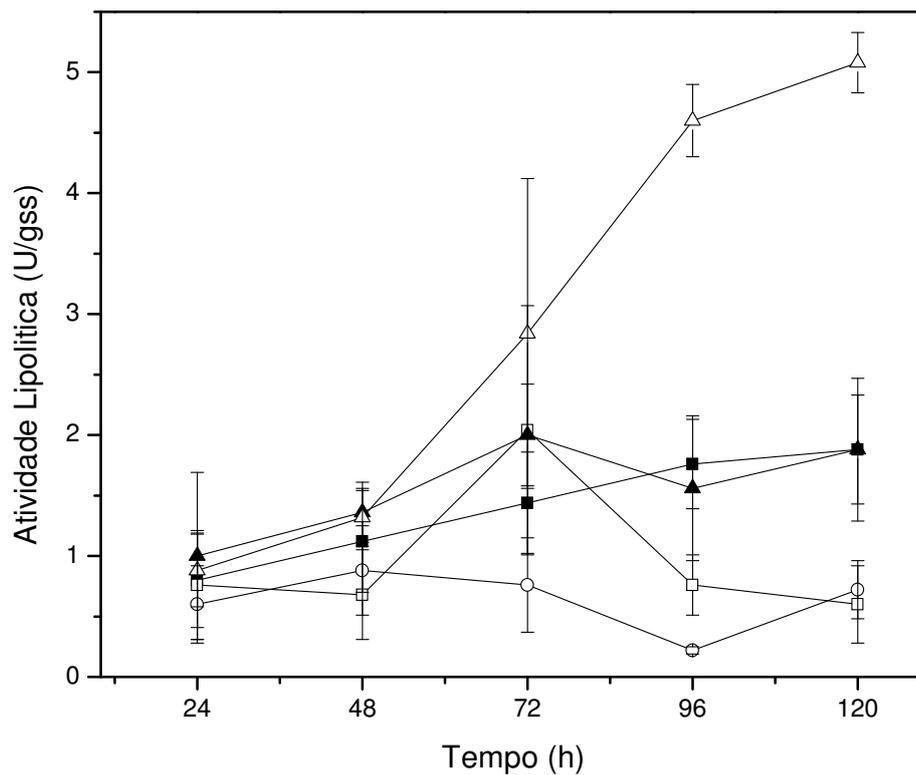
Quando cultivado em FES, nos diferentes substratos testados (bagaço de cana de açúcar, BCA; farelo de soja, FS; farelo de milho FM; torta de mamona, TM; e torta de crambe, TC), também foi constatada a produção da enzima de interesse. Entre os meios estudados, o melhor substrato para produção de lipase pelo micro-organismo foi a torta de crambe, após 120h de cultivo (apresentou atividade de $5,08 \pm 0,25$ U/gss, Figura I.4). A produção enzimática nos farelos de soja e milho resultou em atividades similares, sendo a máxima após 72h de fermentação ($2,00 \pm 0,42$ e $2,04 \pm 1,03$ U/gss, respectivamente). O cultivo em torta de mamona apresentou atividade máxima após 120h de fermentação ($1,88 \pm 0,59$ U/gss), enquanto o bagaço de cana não foi eficiente como substrato indutor para a produção de lipase (atividade abaixo de 1 U/gss). Não foi encontrado na literatura trabalhos de produção de lipase por *Fusarium sp.* em FES para comparação dos resultados. A utilização

de torta de crambe como substrato para a produção de lipases também é inédita, não sendo verificadas, até o momento, referências de outros autores.

A possível explicação para os resultados obtidos pode estar na composição de cada substrato, a qual é muito distinta entre si, conforme mostrado na Tabela I.1. Como características principais de cada meio, observa-se alto conteúdo de carboidratos de fácil absorção (extrativo não-nitrogenado) no bagaço de cana-de-açúcar e no farelo de milho, alto conteúdo de fibras na torta de mamona e de proteínas no farelo de soja. Já a torta de crambe, por outro lado, tem uma constituição centesimal equilibrada, mantendo as diferentes classes de nutrientes em torno de 20%. Embora tanto carboidratos quanto lipídeos sejam utilizados como fontes de carbono para a produção de lipases por fungos filamentosos, cada nutriente induz à uma resposta diferente pelos micro-organismos: enquanto os óleos e gorduras têm sido citados como indutores, a glicose tem sido relacionada à repressão catabólica da produção da enzima. Quando glicose e lipídeos estão disponíveis simultaneamente, os micro-organismos utilizam preferencialmente a glicose, e depois de sua exaustão, passam a utilizar os lipídeos, momento em que ocorre o início da produção de lipases (LIMA et al., 2003; JAEGER, DIJKSTRA E REETZ, 1999). Assim sendo, é compreensível a maior produção lipolítica pelo *F. oxysporum* ter-se dado na TC, uma vez que esta contém de cinco até 20 vezes mais lipídeos residuais que os demais meios testados (apresentado como extrato etéreo na Tabela I.1), bem como o menor teor de carboidrato entre eles. O uso de substratos ricos em lipídeos residuais para aumentar a produção de lipases também foi constatado por outros trabalhos. Córdova et al. (1998) conseguiram um aumento de 16 e de 8 vezes na produção de lipase com *Rhizopus rhizopodiformis* e *Rhizomucor pusillus*, respectivamente, ao adicionar 50% de torta de oliva ao bagaço de cana. Mala et al. (2007) aumentaram a produção de lipase em mais de 100 U/gss por *A. niger* ao adicionar torta de gergelim ao farelo de trigo.

Tabela I.1: Composição centesimal dos substratos empregados na FES.

Determinação	Bagaço de Cana-de-açúcar	Torta de Mamona	Farelo de Soja	Farelo de Milho	Torta de Crambe
Extrativo não-nitrogenado	60,13%	24,38%	34,85%	70,03%	23,21%
Extrato etéreo	2,44%	1,15%	2,20%	4,90%	22,32%
Fibra bruta	28,47%	37,37%	14,02%	4,76%	23,02%
Proteína bruta	3,27%	27,91%	46,56%	17,82%	26,70%
Resíduo mineral fixo	5,69%	9,19%	2,37%	2,49%	4,75%
Nutriente digestivo total	65,30%	56,47%	75,32%	77,65%	78,72%
Matéria seca	81,88%	89,41%	92,04%	88,00%	89,17%
Umidade	18,12%	10,59%	10,89%	12,00%	10,83%

**Figura I.4:** Produção da lipase de *Fusarium* sp. após cultivo em diferentes substratos. Bagaço de cana-de-açúcar [○]; Farelo de milho [□]; farelo de soja [▲]; torta de crambe [△]; torta de mamona [■].

Outro fator a ser considerado é a porcentagem de proteínas disponíveis nos substratos sólidos, uma vez que altas concentrações de nitrogênio são citadas como favoráveis à

produção de lipases fúngicas como observado por Maia et al. (1999), Lima et al. (2003) e Adham e Ahmed (2009). A relação C/N nos substratos pode ser calculada por:

$$\text{C/N} = \text{Extrativo não-nitrogenado} + \text{extrato etéreo/proteína bruta}$$

O BCA, ineficiente para a produção da enzima pelo *F. oxysporum*, possui uma relação C/N muito alta (19,13), enquanto que os meios TM e FS apresentam uma C/N baixa (0,95 e 0,80 respectivamente), resultando em atividades lipolíticas intermediárias. A relação C/N intermediária encontrada no meio FM (4,20) resultou em atividade semelhante à obtida com o meio FS. No entanto o meio TC parece ter apresentado um balanço favorável na relação C/N (1,70), possibilitando assim a melhor produção da enzima por *F. oxysporum*.

Os resultados obtidos demonstram que a produção de lipases foi maior nos ensaios com menor relação C/N, ou seja, com maior concentração da fonte de nitrogênio, como verificado por outros autores. Para a produção de lipases de *Penicillium aurantiogriseum*, por exemplo, as atividades mais altas foram obtidas com relação C/N de 5 (17 U/mL) e 2,5 (13 U/mL, LIMA et al., 2003). Resultados semelhantes também foram obtidos na produção de lipases por *R. delemar* utilizando fontes industriais de carbono e nitrogênio, em que verificou-se um grande aumento na produção da enzima quando essa relação foi mudada de 1 para 0,5 (CRUZ et al., 1993). Por outro lado, alguns trabalhos demonstraram melhores produções de lipases utilizando um valor de C/N mais alto. A maior atividade lipolítica apresentada por *R. homothallicus* foi obtida com relação C/N de 17,50 em FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar como suporte (RODRIGUEZ et al., 2006), enquanto que para *P. restrictum* cultivado em torta de babaçu, as melhores condições para produção da enzima foram relações C/N de 11,70 e 14,10 (GOMBERT et al., 1999).

Os melhores resultados foram obtidos com a torta de crambe, o que é bastante interessante. O óleo de crambe é utilizado para várias finalidades industriais, porém a torta resultante necessita de descarte apropriado. Esta oleaginosa não é de uso alimentar, não sendo utilizada para ração devido à toxicidade por alto teor de ácido erúcido e de glicosinatos (SOUZA et al., 2009). Este trabalho mostra a possibilidade de utilização de um resíduo de baixo custo para a produção de um composto de alto valor agregado. Aliado a isso, o próprio material fermentado pode ser utilizado como suporte para a enzima, sendo empregado diretamente no meio reacional, como será demonstrado em experimentos posteriores neste trabalho. Outro fator a se considerar é que o crescimento do micro-organismo sobre a torta, com conseqüente consumo dos nutrientes disponíveis, deve alterar a composição centesimal do substrato. Assim, o consumo dos compostos da torta de crambe pelo fungo pode

influenciar na toxicidade do ácido erúxico residual, possivelmente diminuindo-a pelo consumo do ácido graxo. Esta hipótese, se confirmada, pode tornar a torta de crambe um composto para rações animais ou como adubo após a fermentação por *F. oxysporum*. Entretanto estudos posteriores devem ser feitos a fim de confirmar a redução do ácido erúxico na torta, assim como uma investigação da possível produção de micotoxinas pela cepa utilizada.

2.1.2. Influência da adição de óleos vegetais e sais minerais ao substrato

Nesta sessão os experimentos foram realizados em quintuplicatas devido ao alto desvio padrão observado nos ensaios. Ainda assim, houve uma diferença razoável entre as repetições, possivelmente devido à variação da produção enzimática inerente ao micro-organismo, bem como à heterogeneidade do substrato.

A fermentação foi realizada utilizando-se a torta de crambe, determinada como melhor substrato para a FES e interrompida após 120h, quando a atividade constatada era máxima. Notou-se que não houve diferença estatística ($p > 0,10$, Figura I.5) entre o controle (óleo de oliva 1%, umedecido com tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0, condições experimentais utilizadas nos ensaios para determinação do melhor substrato para produção lipolítica) e os demais óleos vegetais em nenhuma das concentrações testadas e mesmo em relação ao experimento onde não houve adição de óleo. O óleo usado como indutor desempenha um papel fundamental na produção de lipases por micro-organismos, sendo que diferentes fontes de lipídeos provocam alterações na produção da enzima; contudo, o teor de lipídeos residuais presentes na torta de crambe demonstrou ser suficiente para induzir a produção da lipase pelo fungo, tornando desnecessária a adição de outros óleos ao processo fermentativo, o que diminui ainda mais o seu custo. Os resultados obtidos por Palma et al. (2000) com *P. restrictum* cultivado em torta de babaçu e Córdova et al. (1998) com *Rizhomucor pusillus* e *R. rhizopodiformis* cultivados em uma mistura de bagaço de cana e torta de oliva corroboram essa hipótese, uma vez que em seus trabalhos o simples uso de tortas com alto valor de lipídeos foram suficientes para a produção de lipases, sem necessitar de adição de óleo.

Ao analisar a influência da adição de sais, esta parece ter uma maior importância em relação ao pH do que aos sais propriamente ditos, uma vez que o uso da solução de sais Czapeck e de água destilada não alteraram a produção lipolítica quando comparada ao controle (tampão fosfato pH 7,0, Figura I.5). Possivelmente, os minerais presentes naturalmente na TC (apresentados como cinzas na Tabela I.1) foram suficientes para suprir as necessidades nutricionais do fungo. O tampão fosfato demonstrou ter maior influência sobre a produção de lipases, muito provavelmente por ajustar o pH inicial à neutralidade e por mantê-

lo mais estável durante a fermentação, evitando grandes variações durante o processo (o pH do extrato enzimático obtido variou entre 6,5 a 8,5). Além disso, neste intervalo de pH é onde encontra-se a maior atividade enzimática, conforme discutido no item 2.3.1. Por outro lado, nos experimentos utilizando sais ou água a variação do pH ficou próximo a de ambientes levemente ácidos (pH 6,3 a 5,2). Outros autores demonstram que apesar de fungos filamentosos crescerem em pHs ácidos, um ambiente próximo à neutralidade é mais indicado para produção de lipases (RIFAAT et al., 2010; ADHAM E AHMED, 2009; PRAZERES et al., 2006; PASTORE, COSTA E KOBLITZ, 2003).

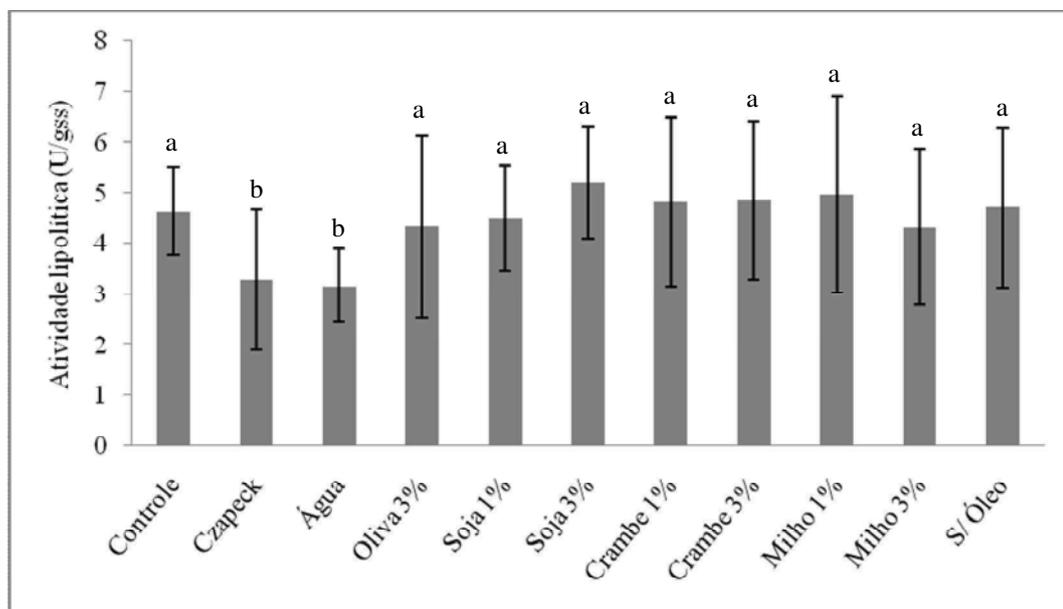


Figura 1.5: Produção de lipase por *F. oxysporum* em torta de crambe com diferentes suplementos. Meios de cultivo: 1) Controle: Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de oliva 1%; 2) Czapeck, óleo de oliva 1%; 3) H₂O, óleo de oliva 1%; 4) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de oliva 3%; 5) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de soja 1%; 6) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de soja 3%; 7) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de crambe 1%; 8) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de crambe 3%; 9) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de milho 1%; 10) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, óleo de milho 3%; 11) Tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0, sem adição de óleo. Condições de cultivo: 28°C, 120h.

A partir dos resultados obtidos foi então definido o melhor meio para produção de lipase por *F.oxysporum* em FES, o qual consistiu de torta de crambe com 60% de teor de umidade utilizando tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 e sem adição de óleo para barateamento dos custos de produção. O tempo de fermentação total foi definido em 120h.

2.2. Extração e obtenção do extrato bruto

Para obter o extrato bruto usado nos ensaios de caracterização, foram testadas diferentes soluções contendo sal, surfactante ou apenas água destilada. Foram medidas as atividades em cada extrato obtido (aproximadamente 40mL de volume, referente ao volume

de solução extratora adicionada ao meio) e também no sólido fermentado liofilizado após a extração, para verificar a atividade residual no mesmo (Tabela I.2).

Tabela I.2: Extração da lipase usando diferentes soluções*

Solução Extratora	At Extrato (U/gss)	At Sólido (U/gss)	At Total (U/gss)	Recuperação (%)
Controle (água)	3,97	57,39	61,36	6,92
NaCl 1%	12,31	61,00	73,31	20,18
Triton X-100 0,5%	9,80	48,46	58,26	20,22
Sólido Fermentado	***	74,00	74,00	100%

*Média da triplicata, os desvios padrões não estão mostrados por serem irrelevantes. Atividade total obtida pela soma da atividade no extrato mais a atividade presente no sólido.

As soluções salina e de surfactante mostraram-se melhores que somente a água para a extração da enzima. Este dado está de acordo com o obtido por Rodriguez et al. (2006) que obteve 70% de extração usando Triton X-100 a 0,5%. Este fenômeno pode ser explicado pelo aumento das interações hidrofílicas entre água e enzima. Foi notado ainda que, apesar de maior atividade no líquido de extração pela solução de cloreto de sódio, também o resíduo sólido proveniente deste foi o que apresentou maior atividade residual. Ao comparar a porcentagem de recuperação, obtém-se valores iguais a 20%.

Apesar da recuperação ter sido relativamente baixa, foi considerada suficiente neste trabalho, pois foi usada somente a fim de obter o extrato para avaliar a produção e a caracterização da lipase, além de servir em testes preliminares para futuros experimentos de purificação. Para ensaios de purificação ou em processos que visem a aplicação do extrato enzimático, um estudo mais detalhado de extração deve ser realizado visando aumentar a recuperação enzimática. Para tanto deve-se testar outras soluções ou outros métodos, como o contato múltiplo de contra-corrente (CMCC, esse processo resultou em 97% de extração da enzima, MALA et al., 2007), fluxo fracionado, entre outros. Por outro lado, a verificação da intensa ligação da enzima ao substrato reforçou a hipótese de que o sólido fermentado poderia ser utilizado diretamente ao meio reacional em biocatálise, tanto em ambientes aquosos, quanto orgânicos, sem que ocorresse dessorção da enzima, objetivo principal deste trabalho.

2.3. Caracterização bioquímica do extrato enzimático de *F. oxysporum* produzida por FES

Os ensaios de caracterização aqui apresentados foram realizados com o extrato enzimático bruto obtido a partir das melhores condições determinadas para a produção de lipase por *F. oxysporum* em FES (fermentação em torta de crambe durante 120h, sem adição de óleo e umedecida com tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0) e extraído com a solução salina 1%. Este extrato possuía atividade enzimática inicial de 3,22 U/mL (37°C, tampão fosfato 0,05mol/L pH 8,0), 6,37 mg/mL de proteínas totais e 0,50 U/mg de atividade específica.

2.3.1. Influência da temperatura e pH na atividade e estabilidade enzimática

O pH e a temperatura influenciam grandemente na atividade e estabilidade das enzimas, portanto conhecer como estas se comportam frente à esses fatores físicos é de suma importância para se decidir em quais processos elas podem ser aplicadas.

A atividade máxima para a lipase produzida por *F. oxysporum* foi obtida nas temperaturas entre 37 e 40°C (3,4 U/mL, Figura I.6); já entre 20 e 45°C a atividade ficou em torno de 60%, caindo significativamente com o aumento da temperatura, sendo que a 70°C a atividade foi próxima de zero. Normalmente as lipases fúngicas variam sua temperatura ótima entre 35°C a 45°C como verificado por autores como Benjamin e Pandey (2001) para a lipase de *Candida rugosa*; Pastore, Costa e Koblitiz (2003) para a lipase de *Rhizopus sp.* e Pinheiro et al. (2008) para a lipase de *P. verrucosum*. Lipases de outras cepas de *Fusarium sp.* também apresentaram temperaturas ótimas semelhantes (RIFAAT et al., 2010; MAIA et al., 2001; CAMARGO-DE-MORIAS et al., 2003; RAPP, 1995; SHIMADA et al., 1993; HOSHINO et al., 1992). Em relação à estabilidade, até 37°C a atividade residual manteve-se em torno de 75% (Figura I.6), enquanto que a 45°C a atividade não foi maior que 50%, caindo ainda mais com o aumento da temperatura. Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram observados também com as lipases de *Geotrichum candidum* e *P. solitum*, em pH 6,5, quando submetidas à temperaturas entre 30 e 70°C (CARVALHO et al., 2005). Com a lipase de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* notou-se perda de 70% de atividade da lipase após 15 min de incubação a 50°C (RAPP, 1995), enquanto que, diferentemente dos demais trabalhos, Prazeres, Cruz e Pastore (2006) obtiveram tanto temperatura ótima quanto estabilidade à 50°C com uma lipase produzida pela cepa de *F. oxysporum lini*, mesmo fato observado por Saad, Kansoh e Gadallah (2004). Apesar da enzima estudada não apresentar atividade ou estabilidade em altas temperaturas, isso não a exclui de aplicações como em processos de

esterificação e transesterificação para produção de biodiesel; pelo contrário, estes processos ocorrem em temperaturas mais amenas, resultando em economia de energia.

A estocagem do extrato lipolítico a baixas temperaturas mostrou-se eficaz para esta lipase. À 4°C a atividade enzimática manteve-se em $62\% \pm 7,5$ e em $54\% \pm 6,6$ após 15 e 30 dias, respectivamente. Quando congelada (-20°C), a atividade manteve-se em 100% mesmo após 30 dias, demonstrando a estabilidade desta enzima.

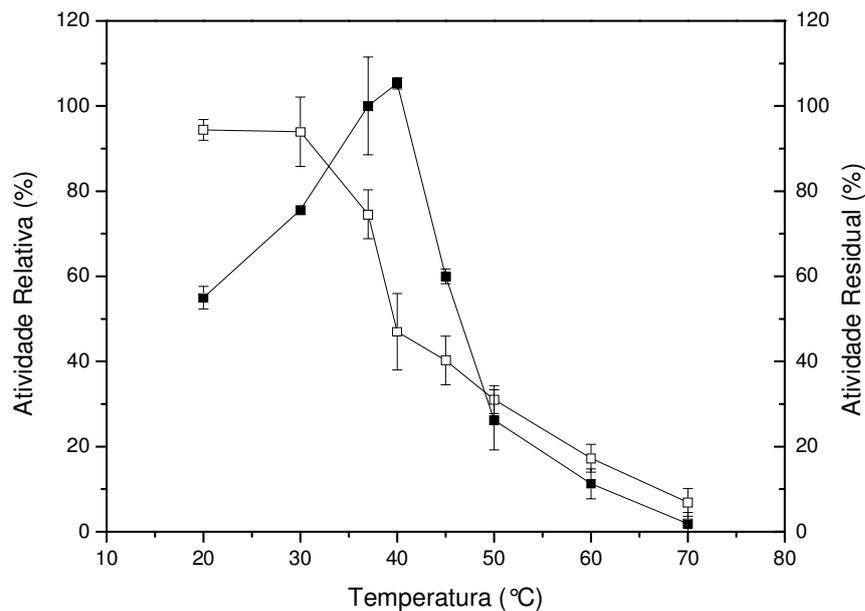


Figura I.6: Influência da temperatura sobre a atividade [■] e estabilidade [□] da lipase de *F. oxysporum* produzida em torta de crambe, tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0 e extraída com solução salina 1%. Ensaio realizados em tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0. A atividade obtida pelo método padrão (37°C) foi considerada como 100% (3,22 U/mL).

A maior atividade foi obtida em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0 (Figura I.7A), mantendo até 60% de atividade em pH básico (10,0). Em pHs ácidos (abaixo de 7,0) a atividade não passou de 30%. Quanto à estabilidade, em pH neutro ou levemente básico (7,0 e 8,0) houve ativação enzimática, aumentando a atividade para 110% (Figura I.7B). Esse fenômeno tem sido relatado, embora ainda não se conheça o mecanismo de funcionamento. Entre pH 5,0 e 9,0 a atividade residual manteve-se em torno de 80%. Somente nos extremos de pH a atividade residual caiu para 60 a 50%. Tanto a atividade como a estabilidade da lipase em pHs neutro ou levemente alcalinos segue o padrão geralmente encontrado para estas enzimas (PINHEIRO et al., 2008; PRAZERES, CRUZ e PASTORE, 2006; LIMA et al., 2004 b; PASTORE, COSTA e KOBLITZ, 2003; MAIA et al., 1999) fato que faz com que as lipases sejam largamente usadas como aditivos em detergentes. Embora a atividade seja baixa

em pHs ácidos, a estabilidade é mantida, sendo assim, a enzima pode ser usada em processos onde o controle do pH não é tão eficaz.

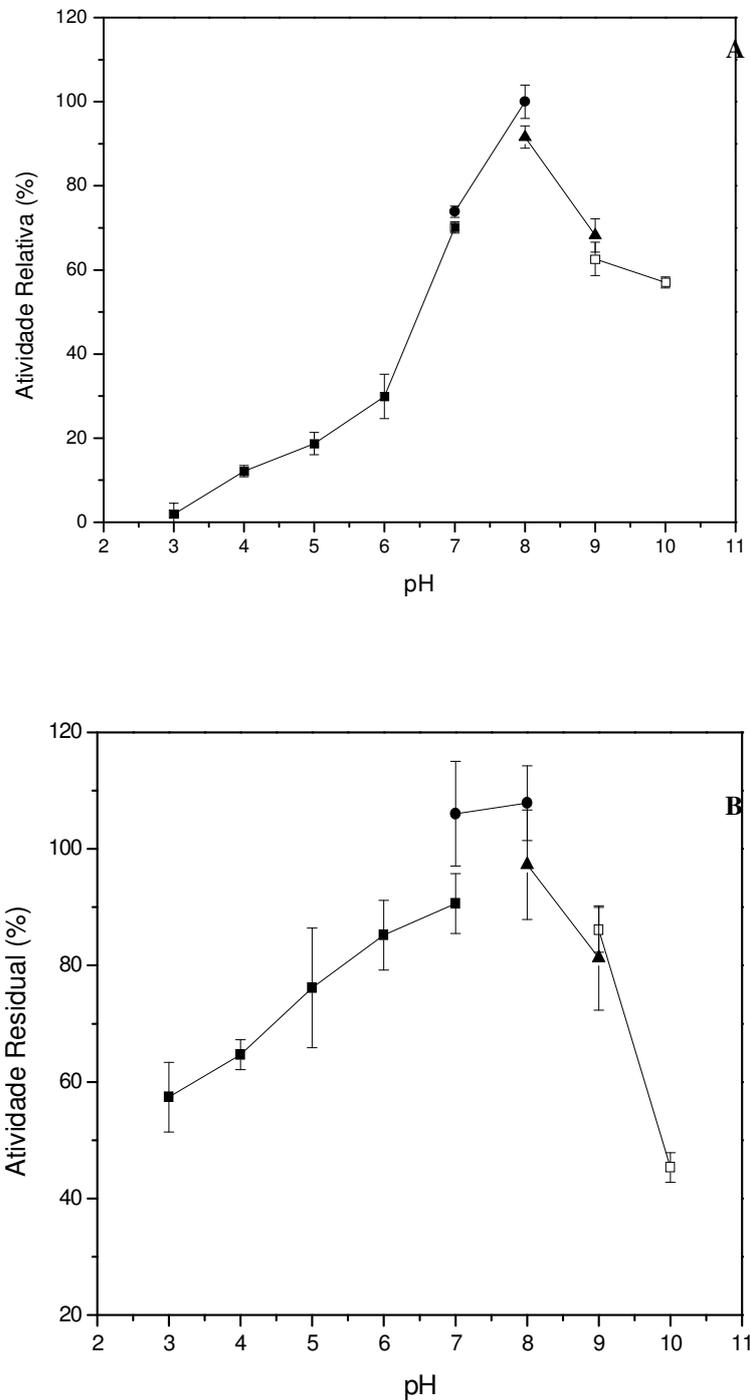


Figura I.7: Influência do pH sobre a atividade (A) e estabilidade (B) da lipase de *F. oxysporum* produzida em torta de crambe, tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0 e extraída com solução salina 1%. Incubação durante 2h em tampão citrato-fosfato, pH 3,0 - 7,0 [■]; tampão fosfato, pH 7,0 e 8,0 [●]; tampão tris-HCl, pH 8,0 e 9,0 [▲]; tampão glicina-NaOH, pH 9,0 e 10,0 [□], a 0,05 mol/L. Ensaio realizado a 37°C. A atividade obtida pelo método padrão (tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0) foi considerada como 100% (2,40 U/mL).

2.3.2. Estabilidade em solventes orgânicos

A polaridade dos solventes é um fator determinante para a estabilidade em biocatálise, sendo que o valor de “log P” é usado para medir a hidrofobicidade dos mesmos. Solventes hidrofílicos ($-2,5 < \log P < 0$) geralmente são incompatíveis com a atividade enzimática, pois eles retiram a camada de água que envolve a enzima causando sua desnaturação, enquanto que os solventes imiscíveis em água ($2 < \log P < 4$), como os alcanos ou haloalcanos mantêm a atividade catalítica (LIMA et al., 2004 a; AZEVEDO et al., 2001; ZAKS E KLIBANOV, 1988).

A enzima estudada apresentou pouca estabilidade frente a solventes polares, mantendo atividade residual considerável apenas em baixa concentração de alcoóis (Tabela I.3). Em concentrações acima de 40% de solventes polares, a atividade residual caiu para menos de 20% no caso de metanol e isopropanol, mas ainda mantém uma atividade razoável em etanol (cerca de 30%). Rapp et al. (1995) e Maia et al. (2001 e 1999) obtiveram resultados semelhantes, onde concentrações entre 20% e 40% de solventes polares foram suficientes para reduzir a atividade enzimática próximo à zero. Por outro lado, a cepa de *F. heterosporum* estudada por Shimada et al. (1993), mostrou-se produtora de uma lipase extremamente tolerantes à solventes, tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos, mantendo alta atividade em 50% de metanol e etanol mesmo após 20h de contato.

Tabela I.3: Atividade enzimática residual (%) após 1h de incubação em solventes.

Solvente Orgânico	Log P	Concentração de Solvente				
		20%	40%	60%	80%	100%
Metanol	-0,76	61,1 ± 1,8	13,9 ± 1,3	10,0 ± 1,8	2,8 ± 1,3	
Isopropanol	-0,28	53,9 ± 1,1	16,3 ± 0,6	5,2 ± 0,7	4,4 ± 0,7	
Etanol	-0,24	60,9 ± 2,5	28,2 ± 2,7	5,3 ± 0,4	4,1 ± 1,3	
Controle (Tampão fosfato pH 8,0)						100,00 ± 4,9
<i>n</i> -Hexano	3,50					95,1 ± 2,7
<i>n</i> -Heptano	4,00					136,9 ± 12,4
Iso-octano	4,51					130,1 ± 13,7

A resistência das lipases a solventes hidrofóbicos pode ser constatada também neste experimento. Após 1h de incubação, a enzima manteve a atividade no caso do *n*-hexano, e até aumentou no caso do *n*-heptano e do iso-octano, mesmo padrão observado por outros

trabalhos envolvendo lipases produzidas por este gênero de fungo (CAMARGO-DE-MORAIS et al., 2003; MAIA et al., 2001 e 1999; RAPP et al., 1995 E SHIMADA et al., 1993). No caso de solventes apolares, a situação é inversa àquela dos solventes polares, ou seja, a água fica aprisionada entre o sitio ativo da enzima e o solvente, bem como também auxiliam na emulsão do substrato hidrofóbico, aumentando a superfície de contato entre a enzima e o mesmo e por conseqüência, conservando a atividade enzimática (LIMA et al., 2004a e RAPP, 1995).

2.3.3. Estabilidade em surfactantes

Os substratos naturais das lipases não são miscíveis em água, o que dificulta o processo catabólico, pois este necessita de meio aquoso. Para amenizar este problema, geralmente é adicionado ao sistema um surfactante, visando à formação de uma emulsão. A adição de surfactantes também é utilizada em processos de purificação e extração enzimática. Além disso, até hoje a maior demanda por lipases é na indústria de detergentes. Sendo assim, é de suma importância avaliar a estabilidade destas enzimas frente a esses produtos.

Conforme mostrado na Tabela I.4, a lipase produzida foi estável em surfactantes não-iônicos (Triton X-100 e Tween-80). Estes dados estão de acordo com o encontrado para outras lipases fúngicas (LIU et al., 2009 e MATEOS-DIAZ et al., 2006). A presença de um surfactante catiônico (CTAB) aumentou expressivamente a atividade enzimática, chegando a 200% de atividade residual quando comparada ao controle (incubado sem adição de surfactante). Prazeres, Cruz e Pastore (2006) também obtiveram um aumento na atividade lipolítica com o uso de Triton X-114 (não-iônico). Esse fenômeno pode ser explicado porque a presença do surfactante normalmente inibe a agregação da lipase, bem como proporciona melhor emulsão do meio, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. Por outro lado, alguns detergentes podem causar a diminuição da atividade lipolítica por inibição da enzima ou por desnaturação enzimática, causada pela ruptura de sua estrutura terciária (LIU et al., 2009 e LIMA et al., 2004b). A adição de surfactantes aniônicos afetou negativamente a atividade da lipase estudada. Mesmo em pequenas concentrações de AOT, um surfactante amplamente usado em purificação por micelas reversas, a atividade residual da lipase de *F. oxysporum* foi reduzida para 45%. Em 0,10% de SDS, conhecido por ser altamente desnaturante, e por isso utilizado na eletroforese SDS-PAGE, a atividade foi praticamente nula. Diferentemente, a lipase de *P. aurantiogriseum* foi estável em baixa concentração desse reagente (LIMA et al., 2004b).

Tabela I.4: Atividade enzimática residual (%) após 1h de incubação em surfactantes.*

Surfactante	Carga	Concentração de Surfactante		
		0,01%	0,10%	0,50%
Triton X-100	Não-Iônico	106,4 ± 7,6	98,0 ± 11,1	65,7 ± 9,7
Tween-80	Não-Iônico	88,2 ± 5,5	83,3 ± 6,9	73,0 ± 3,5
AOT	Aniônico	45,1 ± 8,3	13,2 ± 4,9	2,9 ± 1,4
SDS	Aniônico	34,3 ± 5,5	1,5 ± 2,1	0,0
CTAB	Catiônico	135,3 ± 16,6	139,7 ± 6,2	208,8 ± 8,3

*Atividades residuais comparadas ao controle incubado sem a presença de surfactante.

2.3.4. Atividade lipolítica frente a diferentes substratos

Ao contrário das cutinases e de outras esterases, as lipases são capazes de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa (mais de 10C). Esta importante propriedade permite que estas enzimas hidrolisem cadeias lipídicas de diversos tamanhos e óleos das mais variadas composições. O extrato enzimático produzido mostrou-se capaz de hidrolisar todos os substratos testados, tanto triacilgliceróis de cadeia longa como a trioleína, quanto óleos vegetais e gordura animal (Tabela I.5), confirmando assim, tratar-se de uma lipase verdadeira. O teor de ácidos graxos que compõe cada óleo ésta indicado na Tabela I.6.

O tamanho da cadeia carbônica e o número de insaturações influenciam na atividade das lipases, fato comprovado pelos resultados obtidos. A maior atividade observada foi frente à tributirina (4C; 10,9U/mL). Conforme houve aumento no tamanho da cadeia carbônica a atividade diminuiu para até 6,0U/mL em trioleína, um substrato com ácidos graxos de 18C, típico para medida de lipases e que não é hidrolisado por esterases como a cutinase (LIMA et al., 2004a; JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999). Quando comparada a taxa de hidrólise frente aos óleos ricos em cadeias com 18C (frango, oliva, soja, linhaça, Tabela I.6) percebeu-se maior atividade tanto mais insaturações houvesse. Isso foi observado, por exemplo, no trabalho de Ogino et al., (2000), no qual a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou atividade máxima frente à trilinoleína (C18:2 $\Delta^{9,12}$), 50% menor com trioleína (18:1 Δ^9) e quase nula com triestearina (18:0). Em cadeias carbônicas saturadas, normalmente as melhores atividades são obtidas em cadeias de tamanho médio (6 a 12 carbonos), conforme trabalhos de Raap (1995) e Shimada et al., (1993) para as lipases de *F. oxysporum* e *F. heterosporum*, respectivamente.

Houve alta taxa de hidrólise do óleo de dendê, rico em ácido palmítico e oléico. O óleo de frango apesar de possuir uma composição semelhante, foi menos sujeito à ação enzimática.

Também foi obtida uma atividade alta frente ao óleo de crambe, rico em ácido erúxico, um ácido graxo de cadeia muito longa (22:1), o que está de acordo com os resultados da fermentação em torta de crambe, comprovando que o micro-organismo era capaz de usar o lipídeo residual presente no substrato. Essa propriedade é interessante, uma vez que o crambe é uma fonte promissora de óleo para produção de biodiesel. A heterogeneidade do conteúdo dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis dos óleos pode explicar as diferentes atividades enzimáticas observadas. A lipase de *Pseudomonas sp.* (ZALIHA et al., 2005), apresentou em óleo de soja apenas 56% da atividade medida em óleo de oliva, enquanto que a de *P. aeruginosa* apresentou o dobro de atividade frente a óleo de rícino, se comparada com o óleo de oliva (OGINO et al., 2000). Já a lipase de *F. oxysporum* estudada por outros autores mantiveram atividades semelhantes entre diversos óleos (PRAZERES, CRUZ E PASTORE, 2006). Pode-se dizer, portanto, que cada lipase possui melhor atividade frente a um substrato específico, permitindo-se diferentes aplicações.

Tabela I.5: Atividade lipolítica do extrato bruto frente a diferentes substratos.

Substrato*	U/mL
Tributirina (4:0)	10,90 ± 0,28
Tricaprilina (6:0)	10,7 ± 0,28
Trioleína (18:1)	6,02 ± 0,06
Óleo de dendê (16:0)	4,04 ± 0,00
Gordura de frango (18:1)	2,79 ± 0,06
Óleo de oliva (18:1)	3,40 ± 0,11
Óleo de soja (18:2)	3,52 ± 0,17
Óleo de linhaça (18:3)	4,12 ± 0,11
Óleo de crambe (22:1)	3,64 ± 0,00

*Em notação a cadeia carbônica do ácido graxo em maior quantidade na composição.

Tabela I.6: Perfil de ácidos graxos de cadeia longa predominantes nos diferentes óleos hidrolisados.

Óleo	Ácidos graxos predominantes (%)				
	Palmítico (16:0)	Oléico (18:1)	Linoléico (18:2)	Linolênico (18:3)	Erúico (22:1)
Dendê (ROCHA et al., 2008)	60,3	8,6	19,0	< 1,0	-
Frango (CENTENARO, FURLAN e SOARES, 2008)	18	55	17	-	-
Oliva (PIMENTEL et al., 2007)	18	63	12	< 1	-
Soja (ROCHA et al., 2008)	9,6	34,9	51,1	4,0	< 1
Linhaça (PITA et al., 2006)	-	14	14-25	40-60	-
Crambe (GOMES JR., 2010)	2	18	9	6	56

3. CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados obtidos até esta etapa permitem concluir que o melhor meio para produção de lipase por *F. oxysporum* foi a torta de crambe umedecida com tampão fosfato pH 8,0, sem necessidade de suplementação com óleo ou sais minerais. A recuperação enzimática do meio de fermentação foi baixa (20%), indicando uma forte ligação da enzima ao substrato. O extrato enzimático estudado apresentou maiores atividades em 40°C e pH 8,0 e foi estável em ampla faixa de pH e em temperaturas de até 37°C. A presença de solventes polares demonstraram um efeito negativo na atividade enzimática, entretanto foi observada alta estabilidade em solventes apolares, assim como em surfactantes não-iônicos. Surfactante aniônicos tiveram efeito desnaturante sobre a enzima, entretanto, em presença de um surfactante catiônico, a atividade foi aumentada em 200%. Finalmente, a hidrólise dos diferentes substratos confirmou tratar-se de uma lipase verdadeira.

CAPÍTULO II: PRODUÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS VIA ESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO O SÓLIDO FERMENTADO

1. MATERIAIS E MÉTODOS

Após determinação das melhores condições de cultivo para a produção da enzima, foi dado prosseguimento nos experimentos de síntese de ésteres, utilizando a lipase diretamente no sólido fermentado, sem extração da mesma. Essa metodologia visa reduzir custos e maximizar a eficiência tanto por evitar a etapa de extração da enzima quanto por usá-la de forma imobilizada no próprio meio de fermentação (SALUM et al., 2010; ZAGO, 2010; FERNANDES et al., 2007).

1.1. Preparo do sólido fermentado para caracterização e aplicação em reações de síntese

Para utilização do sólido fermentado, este foi submetido à liofilização a -60°C durante 24h a fim de remover a umidade do mesmo, uma vez que as reações de síntese devem ocorrer em meio livre de água, e em seguida estocado à 4°C .

1.2. Aplicação do sólido fermentado em reação de hidrólise

A atividade hidrolítica do sólido fermentado foi medida pelo método do *p*NPP, conforme descrito no item 1.4.1 Capítulo I (WINKLER e STUKMANN, 1979; modificado por LIMA et al., 2004a). Foram adicionados 10mg de sólido fermentado em 3mL do meio reacional. As condições padrões do ensaio foram definidas como pH 8,0 em tampão fosfato 0,05 mol/L e temperatura de 37°C . Após 1 min a reação foi colocada em banho de gelo por 1 min para precipitação do sólido. Uma alíquota da reação (1mL) foi então lida à 410nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de $1\mu\text{mol}$ de *p*-nitrofenol (*p*NP), por minuto e a atividade expressa em U/gss.

A fim de determinar a eficiência da imobilização da enzima no substrato, foram realizados diversos ciclos de hidrólise do *p*NPP até que a atividade fosse considerada baixa a ponto de inviabilizar o processo.

1.3. Aplicação do sólido fermentado em reações de síntese

1.3.1. Síntese do oleato de metila e etila

Os ensaios de esterificação foram realizados empregando 5mL de uma solução 100 mmol/L de ácido oléico em *n*-hexano, e a ela foram adicionados metanol ou etanol. A razão molar (RM) ácido/álcool e a temperatura usadas no experimento foram variadas segundo o DCCR 2² mostrado na Tabela II.1. Para cada álcool foi feito um DCCR. Como catalisador, foram adicionados 500mg (37,5U) de massa do sólido fermentado liofilizado. O experimento foi mantido em shaker à 200 rpm durante 24h. O teor de ácidos graxos residuais foi quantificado pelo método de Lowry e Tinsley (1976) de acordo com item 1.5.1. A taxa de conversão em ésteres foi estimada pela diferença na concentração de ácido oléico e confirmada por cromatografia em camada delgada (CCD). Obtida as condições de otimização do processo, verificou-se o tempo necessário para a reação se completar (amostras retiradas em diferentes tempos, durante 24h), bem como a capacidade de ciclos da enzima para esta reação.

Outro experimento foi realizado visando a redução do volume de *n*-hexano no sistema. Para isso, a solução de ácido oléico foi substituída por 3 mL de ácido oléico puro, mantendo-se a razão molar e temperaturas obtidas na condição otimizada e adicionando-se apenas 3% (v/v) de *n*-hexano para que este assumisse o papel de co-solvente.

Tabela II.1: DCCR 2² para esterificação do ácido oléico.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	α
X1 – RM ácido/álcool	1:1	1:1,6	1:3	1:4,4	1:5
X2 – Temperatura (°C)	30	33	40	47	50

1.3.2. Síntese do palmitato de metila ou etila a partir de palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP)

Para avaliar a capacidade de transesterificação do sólido fermentado foi utilizado a metodologia baseada na transesterificação do *p*NPP, produzindo ésteres de palmitato (adaptado de GOUJARD et al., 2009). À uma solução 1 mmol de *p*NPP em 5mL de *n*-hexano foi adicionado o equivalente à 1 mol de metanol ou etanol e acrescentado 100 mg do sólido fermentado liofilizado (7,2U). Esse sistema foi incubado em shaker à 30°C e 200 rpm durante

1h. Em seguida, foi retirado 1mL da amostra, e adicionado 4mL de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0 e agitado em vórtex por 30s. A fase aquosa resultante foi lida a 412nm. Uma unidade de atividade de transesterificação foi definida como a liberação de 1 μ mol/min de *p*NP por grama de substrato seco (UT/gss). A taxa de conversão do palmitato de *p*-nitrofenila em palmitato de metila ou etila foi calculada considerando o tempo de 1h.

1.4. Métodos analíticos

1.4.1. Determinação de ácidos graxos em ensaios de esterificação

O método espectrométrico descrito por Lowry e Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácidos graxos durante a síntese do oleato de etila e oleato de metila utilizando ácido oleico como substrato. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres, solúveis em fase orgânica.

A conversão em éster foi calculada a partir do consumo do ácido graxo do meio reacional. A concentração de ácido graxo no meio foi relacionada à absorvância por meio da curva de calibração feita com ácido oléico de 20 a 100 mmol/L nas mesmas condições do ensaio.

1.4.2. Análise qualitativa de ésteres alquílicos por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os ésteres obtidos foram analisados por CCD, para verificar a conversão em ésteres alquílicos. A amostra foi aplicada em uma placa cromatográfica de sílica gel 60 (Merck, Alemanha). Como padrão foram empregados os oleatos de metila, etila, butila e octila. A fase móvel utilizada na cuba cromatográfica foi uma mistura de *n*-hexano, acetato de etila e ácido acético na proporção de 100:5,5:2,8, respectivamente. A placa cromatográfica, após eluição, foi revelada com vapor de iodo e o R_f das bandas dos padrões e dos componentes das amostras foi determinado.

1.5. Análises estatísticas

Foram utilizados os softwares estatísticos *OriginPro 8* e *Statistica 8* para análises estatísticas (média, desvio padrão e ANOVA), confecção de gráficos, e análise dos delinamentos fatoriais e das superfícies de resposta.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sólido fermentado liofilizado foi observado em microscópio óptico e apresentou partículas de formas e tamanhos irregulares (Figura II.1), além de ser altamente poroso. Também é possível observar conídios e pedaços do micélio fúngico aderidos às partículas. O tamanho médio das partículas foi entre 0,02 mm e 0,08 mm.

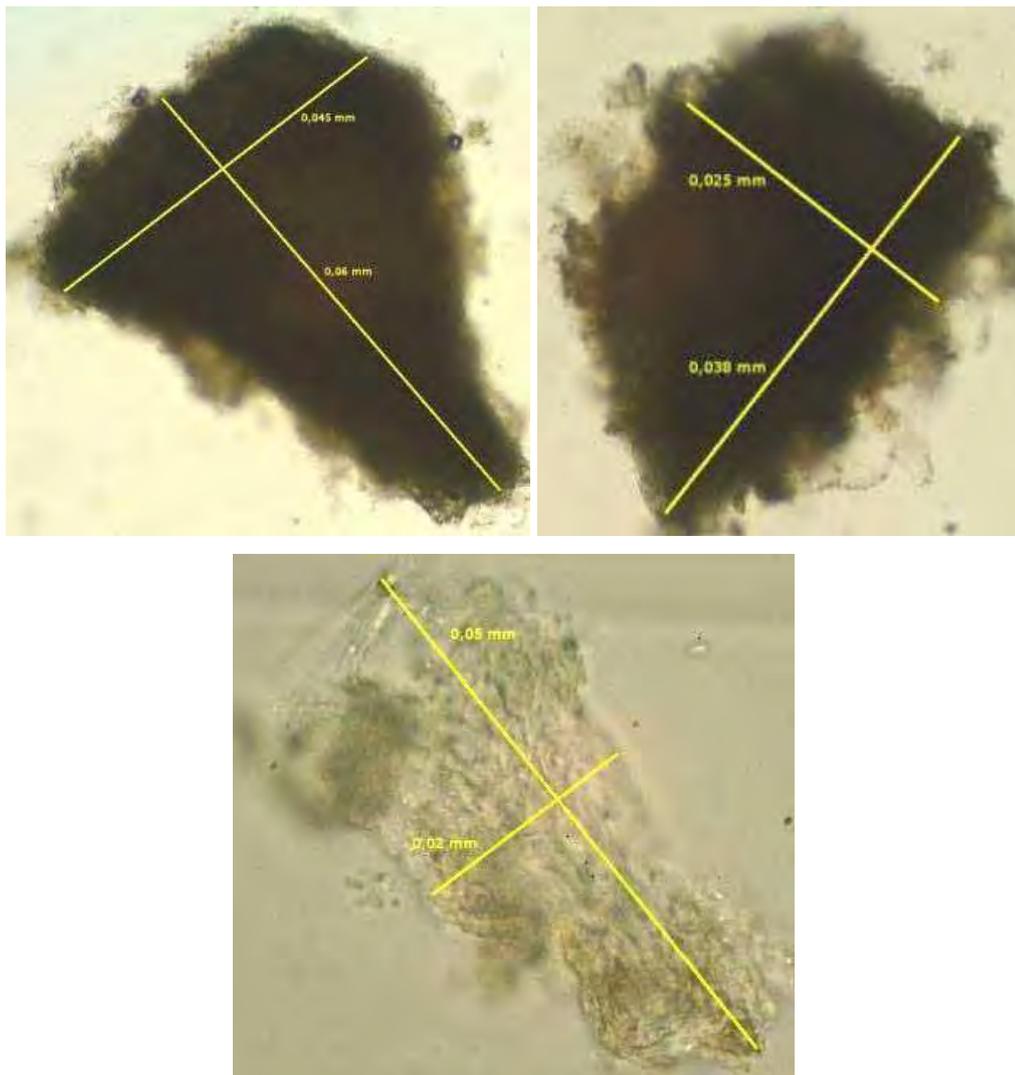


Figura II.1: Partículas do sólido fermentado observado ao microscópio óptico, aumento de 400 vezes.

2.1. Aplicação do sólido fermentado em reações de hidrólise

Ao trabalhar em processos com a aplicação de enzimas prefere-se que elas estejam imobilizadas. Isto faz-se necessário porque a imobilização permite que se recupere a enzima do meio reacional e esta possa ser novamente utilizada, bem como pode aumentar a

estabilidade enzimática frente à temperatura, pH, solventes orgânicos, entre outros (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO E SOLDI, 2004).

Para avaliar a eficiência do uso da enzima imobilizada no próprio meio de fermentação foram realizados ciclos de hidrólise do *p*NPP (Figura II.2). No primeiro ciclo a atividade foi de $71,43 \pm 6,66$ U/gss. No segundo ciclo obteve-se 82% da atividade inicial (57,14 U/gss), e então diminuindo para apenas 30% (21,43 U/gss) no terceiro ciclo, tornando o processo ineficiente a partir desse momento. Essa queda na atividade pode ter sido causada por perda ou desnaturação enzimática. Outra hipótese é de que o Triton X-100 presente na solução do *p*NPP possa, após estes três ciclos, ter extraído a maior parte da enzima aderida ao substrato, conforme discutido em 2.2, Capítulo I. Outros estudos devem ser realizados a fim de elucidar essa hipótese. Ainda sim, dois ciclos podem ser considerados como um rendimento satisfatório, uma vez que nenhum tratamento foi feito para ligar a enzima ao suporte.

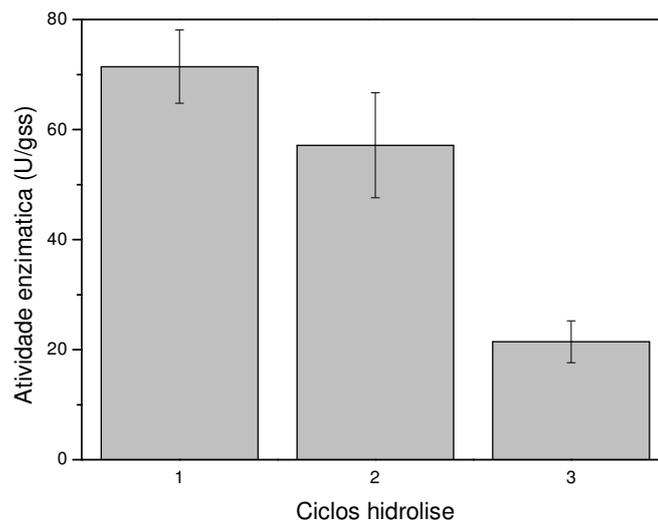


Figura II.2: Atividade lipolítica do sólido fermentado nos ciclos de hidrólise. Ensaio realizado à 37°C, tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0, substrato *p*NPP,

2.2. Aplicação do sólido fermentado em reação de esterificação

2.2.1. Síntese do oleato de metila

Diversos fatores podem influenciar nas reações de esterificação como temperatura, razão molar ácido/álcool, agitação e quantidade de enzima utilizada. Nos estudos apresentados neste trabalho foram avaliadas a influência da temperatura (30°C a 50°C) e a razão molar ácido/álcool (1:1 a 1:5). As variáveis foram analisadas por meio de delineamento

composto central rotacional (DCCR), em dois níveis e os valores codificados estão apresentados na Tabela II.1, em material e métodos.

Após 24 horas de reação, a conversão em éster das amostras foi quantificada pela diminuição do ácido oléico livre no meio, utilizando o método espectrofotométrico de Lowry e Tinsley. Foram utilizados na reação 500 mg de material fermentado, equivalente à 35,7 U, conforme determinado no item 2.1. A conversão em éster ocorreu em todos os ensaios, porém com diferentes taxas (Tabela II.2), sendo que os melhores resultados foram obtidos quando as condições estavam próximas dos pontos centrais (RM 1:3 e 40°C).

Tabela II.2: Delineamento experimental 2², com a avaliação da conversão do ácido oléico em oleato de metila.

Ensaio	X1	X2	Conversão em éster (%)
1	-1	-1	84,8
2	-1	1	27,1
3	1	-1	54,5
4	1	1	74,9
5	- α	0	48,1
6	α	0	52,8
7	0	- α	73,3
8	0	α	56,2
9	0	0	84,8
10	0	0	86,1
11	0	0	88,0

X1: Razão molar ácido/metanol; X2: Temperatura.

A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento é apresentada na Tabela II.3, onde se observou também os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 e o nível de significância. Tanto as variáveis de forma isolada, como a interação entre elas foram estatisticamente significativas para um limite de confiança $p < 0,5$. Nota-se que as variáveis X1 e X2 (RM e temperatura) causam um decréscimo nas taxas de conversão, ou seja, aumentando essas variáveis diminui-se a conversão do ácido em éster. Isto pode ser explicado porque altas concentrações de solvente e temperatura podem desnaturar a lipase. Porém a interação entre as variáveis afetam positivamente a reação, favorecendo a

esterificação do ácido. Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (Figura II.3), que representa a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão, e constitui o valor do efeito padronizado (valor de T_{calc}).

Tabela II.3: Estimativa dos efeitos para taxa de conversão (%) da reação de esterificação metílica do ácido oléico para o DCCR 2².

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	86,2855	1,964943	0,000000	86,2855
X1 (L)	6,0735	2,410170	0,053178	3,0367
X1 (Q)	-34,5888	2,875961	0,000070	-17,2944
X2 (L)	-15,3652	2,410170	0,001405	-7,6826
X2 (Q)	-20,2192	2,875961	0,000899	-10,1096
X1 x X2	39,0648	3,403422	0,000088	19,5324

X1: Razão molar ácido/metanol; X2: Temperatura.

$R^2 = 0,985$; $R = 0,992$.

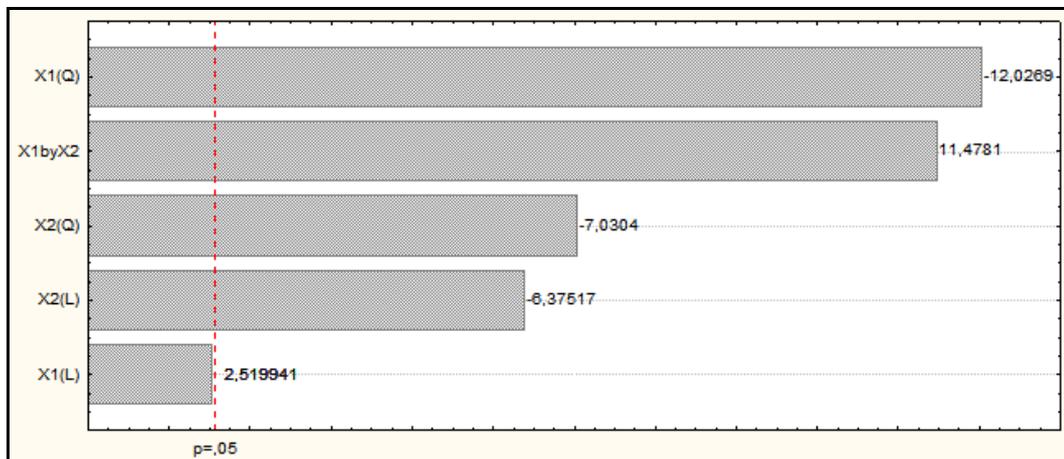


Figura II.3: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2² para esterificação metílica. X1: Razão molar ácido/metanol; X2: Temperatura.

Na Tabela II.4 é possível verificar que o modelo linear proposto é válido, pois para ambas as variáveis, bem como a interação entre elas o valor de $F_{calc} > F_{tab}$ ($F_{tab} = 6,61$). Sendo assim, pode-se calcular empiricamente os modelos matemáticos de conversão em função das variáveis significativas segundo a equação:

$$\text{Taxa de conversão (\%)} = 86,29 - 17,29.(X1)^2 - 7,68.(X2) - 10,11.(X2)^2 + 19,53.(X1).(X2)$$

Tabela II.4: Análise de variância obtida para o DCCR 2² da reação de esterificação metílica.

Fontes de variação	SQ	gl	MQ	F _{calc}	p-Valor
X1 (L)	73,555	1	73,555	6,3501	0,053178
X1 (Q)	1675,468	1	1675,468	144,6454	0,000070
X2 (L)	470,776	1	470,776	40,6427	0,001405
X2 (Q)	572,522	1	572,522	49,4266	0,000899
X1 x X2	1526,060	1	1526,060	131,7468	0,000088
Resíduo	57,916	5	11,583	--	--
Total	3961,160	10		--	--

X1: Razão molar ácido/metanol; X2: Temperatura.

F_{tab} (1; 5; 0,05) = 6,61.

A superfície de resposta (RSM) obtida para o modelo linear é apresentada no gráfico da Figura II.4. Como mencionado anteriormente, as melhores taxas de conversão são observadas próximo dos pontos centrais, logo estas condições (RM 1:3; 40°C) foram escolhidas para os testes de validação do modelo experimental. O valor predito pela equação nas condições determinadas foi de 86,3% ± 5,0 e o valor observado foi de 99,6% ± 0,3, confirmando que o modelo obtido na DCCR foi satisfatório e válido.

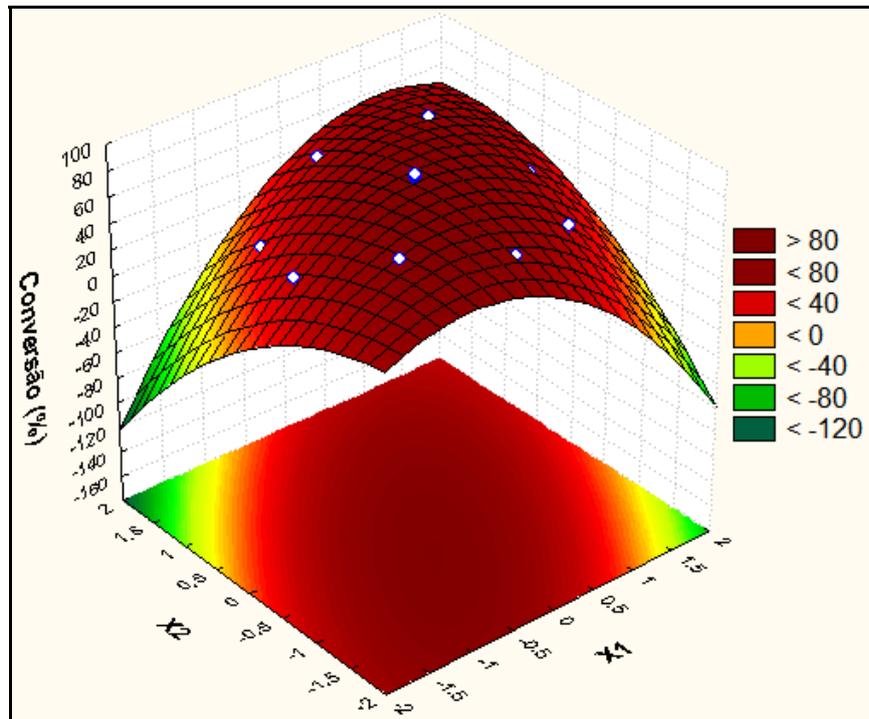


Figura II.4: Superfície de resposta da taxa de conversão (%) em função da razão molar ácido/metanol (X1) e temperatura (X2).

2.2.2. Síntese do oleato de etila

Para os estudos de esterificação do ácido oléico com etanol, foram utilizados 500 mg do sólido fermentado (35,7 U). As variáveis (RM e temperatura) foram avaliadas utilizando DCCR 2² (Tabela II.1). Novamente observou-se a formação de éster em todos os ensaios (Tabela II.5). As melhores taxas de conversão foram obtidas nos ensaios 1, 2 e 8, os quais indicam que a RM ácido/etanol deve ser baixa (entre 1:1,6 a 1:3).

Tabela II.5: Delineamento experimental 2², com a avaliação da conversão do ácido oléico em oleato de etila.

Ensaio	X1	X2	Conversão em éster (%)
1	-1	-1	67,2
2	-1	1	75,5
3	1	-1	46,4
4	1	1	40,5
5	- α	0	57,3
6	α	0	48,3
7	0	- α	58,5
8	0	α	69,9
9	0	0	57,3
10	0	0	63,9
11	0	0	60,1

X1: Razão molar ácido/etanol; X2: Temperatura.

O DCCR deste experimento revelou que apenas a variável X1 (RM) é estatisticamente significativa (Tabela II.6 e Figura II.5), causando efeito negativo sobre a taxa de conversão, ou seja, uma quantidade muito alta de álcool em relação ao ácido prejudica a formação de ésteres, provavelmente porque o solvente age desnaturando a enzima.

Tabela II.6: Estimativa dos efeitos para taxa de conversão (%) da reação de esterificação etílica do ácido oléico para o DCCR 2².

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	60,4968	4,297579	0,000033	60,49677
X1 (L)	-17,2118	5,271348	0,022318	-8,60589
X1 (Q)	-8,2963	6,290090	0,244359	-4,14817
X2 (L)	4,5977	5,271348	0,422997	2,29883
X2 (Q)	3,1517	6,290090	0,637607	1,57584
X1 x X2	-7,0856	7,443714	0,384866	-3,54280

X1: Razão molar ácido/etanol; X2: Temperatura.
R² = 0,750; R = 0,866.

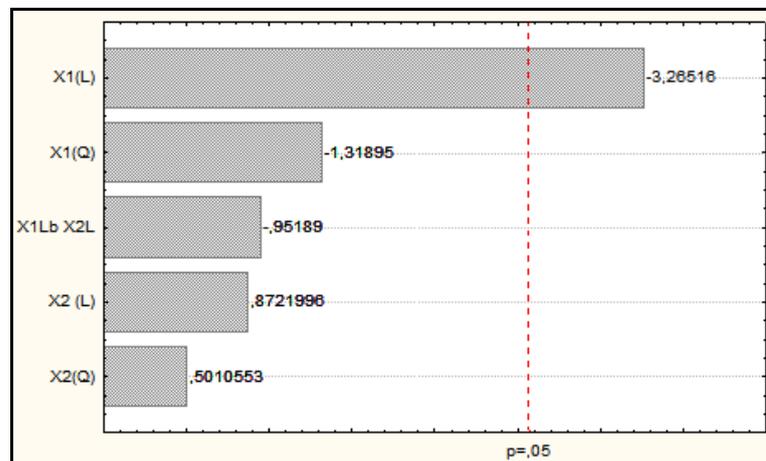


Figura II.5: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2² para esterificação etílica. X1: Razão molar ácido/etanol; X2: Temperatura.

Tabela II.7: Análise de variância obtida para o DCCR 2² da reação de esterificação etílica.

Fontes de variação	SQ	gl	MQ	F _{calc}	p-Valor
X1 (L)	590,728	1	590,7278	10,66125	0,022318
X1 (Q)	96,391	1	96,3914	1,73964	0,244359
X2 (L)	42,151	1	42,1513	0,76073	0,422997
X2 (Q)	13,911	1	13,9108	0,25106	0,637607
X1 x X2	50,206	1	50,2057	0,90610	0,384866
Resíduo	277,044	5	55,4089	--	--
Total	1103,983	10		--	--

X1: Razão molar ácido/etanol; X2: Temperatura.
F_{tab} (1; 5; 0,05) = 6,61.

Conforme a Tabela II.7 o valor de $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ ($F_{\text{tab}} = 6,61$) para a variável X1, portanto a taxa de conversão pode ser estimada segundo o modelo matemático fornecido pela equação:

$$\text{Taxa de conversão (\%)} = 60,50 - 17,21.(X1)$$

De acordo com a RSM (Figura II.6) as maiores taxas de conversão podem ser obtidas quando X1 é mínimo e X2 é máximo (RM 1:1; 50°C). O valor predito em tais condições era de $77,8\% \pm 20,0$ de conversão do ácido oléico em oleato de etila, e o valor observado foi de $65,2\% \pm 2,0$. O resultado obtido apesar de baixo está dentro do valor predito devido ao seu alto desvio padrão. O valor de R^2 obtido no DCCR foi baixo (0,75), indicando que o DCCR não foi muito bom, e que os experimentos necessitavam ser refeitos.

Como já discutido, as melhores taxas de conversão obtidas no DCCR foi para RM entre 1:1 e 1:3 (Tabela II.5), portanto, foi escolhido um valor intermediário de RM 1:2 ácido/álcool. A temperatura não foi estatisticamente importante (Tabela II.6), e por isso foi escolhido uma mais baixa (40°C). Temperaturas mais baixa inclusive protegem a enzima dos efeitos desnaturantes que uma exposição prolongada à temperaturas mais altas pode causar. Novamente foi realizada a validação e a taxa de conversão obtida foi de $88,5\% \pm 3,0$, valor considerado como satisfatório.

Apesar do modelo fornecido pelo delineamento ter se mostrado “insatisfatório” neste caso, o DCCR não deve ser descartado, pelo contrário. A partir da análise das conversões obtidas nos diferentes ensaios do DCCR (Tabela II.5) combinado com a informação de que X1 era a única variável estatisticamente importante no experimento (Tabela II.6) foi possível chegar às condições que puderam fornecer o aumento desejado na síntese do oleato de etila (RM 1:2, 40°C).

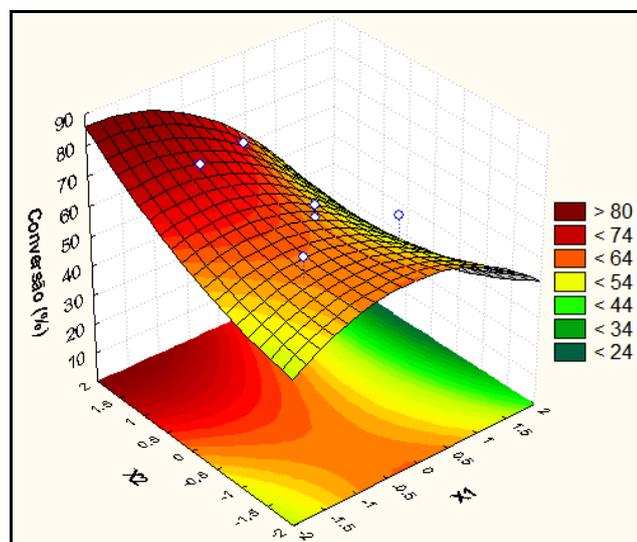


Figura II.6: Superfície de resposta da taxa de conversão (%) em função da razão molar ácido/etanol (X1) e temperatura (X2).

2.3. Avaliação dos ciclos de esterificação pelo sólido fermentado

Durante os ensaios de otimização, a duração da reação de esterificação havia sido fixada em 24h. Contudo, após obtidas as condições otimizadas foi estudada a cinética da reação, visando definir o tempo mínimo necessário para que ocorresse a formação dos produtos desejados. A taxa máxima de conversão (99,6%) para o metanol deu-se após 20h, enquanto que em etanol deu-se após 24h (88,5%; Figura II.7).

Os resultados obtidos neste experimento foram considerados satisfatórios, uma vez que a taxa de conversão foi alta (cerca de 90%) em um tempo relativamente reduzido (24h). Quando comparado à literatura observa-se que este experimento obteve melhor conversão do que o obtido por Pires-Cabral et al. (2010) (80% de conversão em butirato de etila após 36h), Dave e Madamwar (2006) (86% de conversão em hexanoato de etila após 72h) e semelhante ao obtido por Ben Salah et al. (2007) (80% de conversão em acetato de butila após 24h). Por outro lado, alguns autores obtiveram resultados melhores como Zago (2010) (98% conversão em oleato de etila após 3h), Fernandes et al. (2007) (94% de conversão em oleato de etila após 18h) e Salis et al. (2003) (100% de conversão em oleato de butila após 6h).

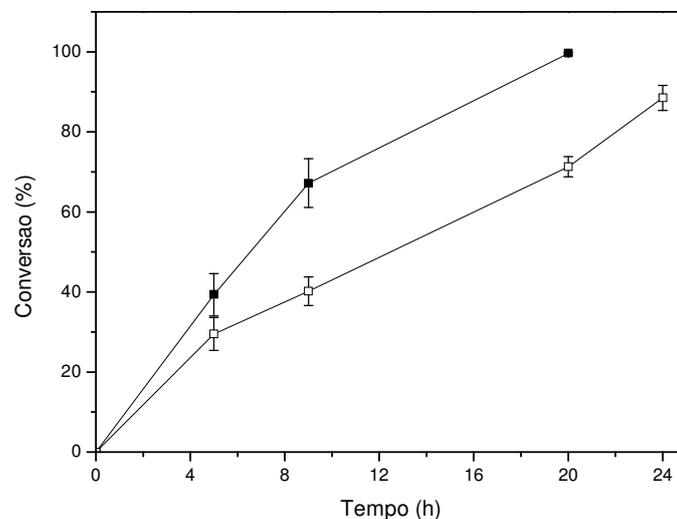


Figura II.7: Conversão do ácido oléico em oleato de metila (■) e etila (□) nas condições otimizadas (RM 1:3, 40°C e RM 1:2, 40°C, respectivamente). Foram utilizados 500 mg (35,7 U) de sólido fermentado liofilizado.

A partir da cinética foi definido que um ciclo de esterificação do ácido oléico em meio contendo metanol duraria 20h, e em meio contendo etanol duraria 24h. Foi definido ainda que os ciclos se repetiriam até que a taxa de conversão ficasse em torno dos 50%, quando a reação se tornaria inviável do ponto de vista industrial. Foram adicionados 500mg de sólido

fermentado liofilizado (35,7 U) como biocatalisador e entre cada ciclo de esterificação, este foi lavado com *n*-hexano para remoção de resíduos lipídicos.

É possível observar que, apesar de nos quatro primeiros ciclos a esterificação ter ocorrido de maneira mais eficiente em meio contendo metanol (Figura II.8), a partir do quinto ciclo a taxa de conversão começa a cair repetidamente, sendo que no sétimo ciclo a eficiência da reação é de menos de 30%. Por outro lado, a esterificação em meio contendo etanol apresenta eficiência um pouco menor nos primeiros ciclos, porém mantém-se mais estável durante os ciclos seguintes, resultando em conversões acima de 80% nos seis primeiros ciclos, e mesmo após oito ciclos a eficiência da reação é de mais de 50%. Se comparado a outros trabalhos, este foi um bom resultado. Para a lipase de *B. cepacia* imobilizada em Accurel foi obtido 100% de conversão em oleato de etila durante 11 ciclos e a meia vida foi atingida somente no 24º ciclo (Salum et al., 2008). A mesma lipase produzida em FES pode ser reutilizada 10 vezes mantendo 97% de conversão e a meia vida foi atingida no 14º ciclo (Fernandes et al. 2007). Ghamgui et al. (2006) estudaram a reutilização da lipase de *Staphylococcus simulans* imobilizada em CaCO₃. A porcentagem de conversão do éster foi estável até 4 reutilizações e a enzima apresentou 50% de sua atividade inicial após ser utilizada por 7 vezes.

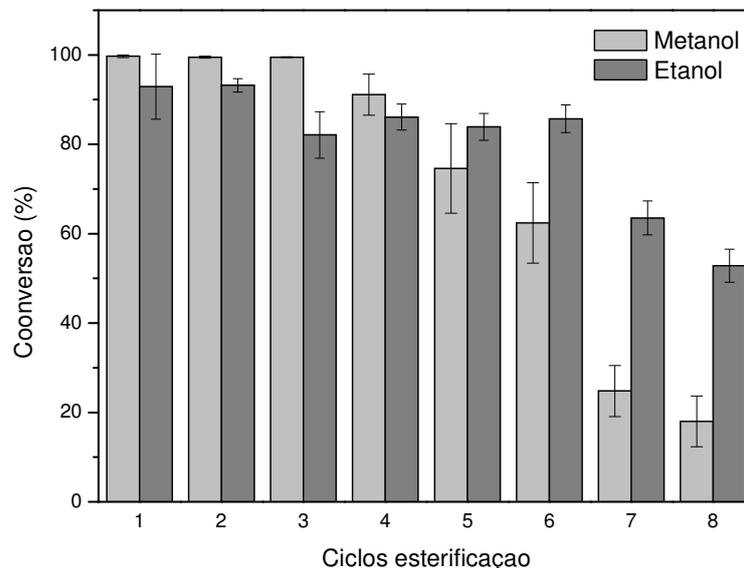


Figura II.8: Avaliação dos ciclos de esterificação metílica e etílica pelo sólido fermentado. Condições: RM 1:3, 40°C (metanol) e RM 1:2, 40°C (etanol). Foram utilizados 500 mg (35,7 U) de sólido fermentado liofilizado.

2.4. Esterificação com redução do volume de co-solvente

Os experimentos conduzidos até aqui utilizaram grande quantidade de *n*-hexano para diluir o ácido oléico em solução, entretanto esta condição não representa as condições reais para uma reação de esterificação em grande escala; ao contrário, esta metodologia foi empregada para facilitar a quantificação das taxas de conversão. A fim de baratear o custo da reação e de facilitar a recuperação do produto, foi conduzido um ensaio diminuindo a quantidade de co-solvente (*n*-hexano). Assim, a solução 100 mmol/L de ácido oléico foi substituída por ácido oléico apenas. A temperatura e RM obtida nas condições otimizadas foram mantidas e acrescentou-se 3% v/v de *n*-hexano como co-solvente. O experimento foi avaliado durante 120h, com retiradas de amostra em 24h, 72h, e 120h. Os resultados estão mostrados na Figura II.9, e a formação dos ésteres durante a reação confirmada por CCD (Figura II.10).

Nota-se que as taxas de conversão em metil e etil ésteres mantiveram-se constantes, não ocorrendo aumento da quantidade de oleatos produzidos ao longo do tempo. Tal fenômeno pode ser decorrente da inibição da atividade da lipase por excesso de algum dos reagentes envolvidos no processo, ou ainda por desnaturação enzimática devido a uma maior quantidade de álcool presente no meio, uma vez que apesar de mantida a RM obtida no DCCR, houve a substituição da solução de ácido oléico pelo substrato concentrado, sendo assim, houve também um aumento na quantidade de álcool para que a RM fosse preservada.

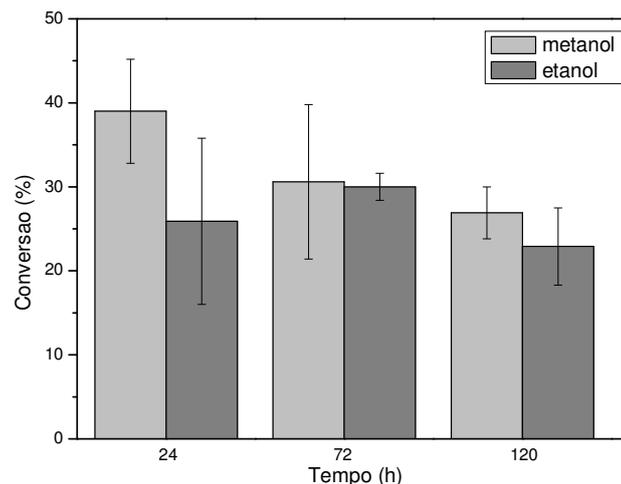


Figura II.9: Conversão em metil e etil ésteres utilizando sólido fermentado por *F. oxysporum* em função do tempo. Condições: RM 1:3, 40°C (metanol) e RM 1:2, 40°C (etanol).

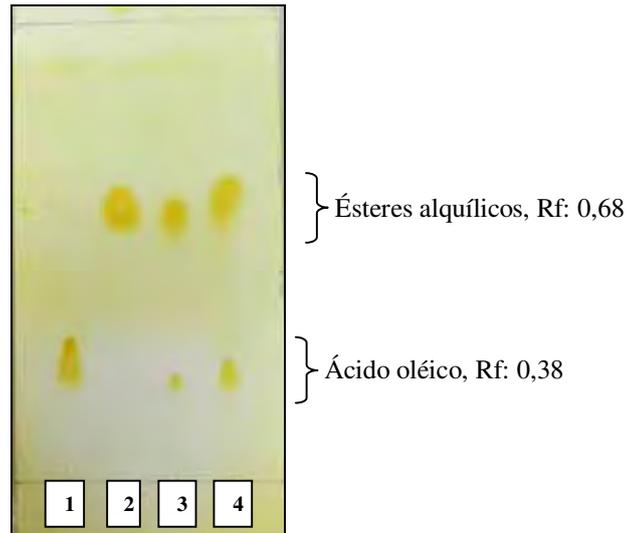


Figura II.10: Cromatografia em camada delgada demonstrando a conversão de ácido oléico em ésteres. 1- controle ácido oléico; 2- padrão oleato de metila; 3- formação do oleato de metila; 4- formação do oleato de etila.

A redução na taxa de conversão após diminuição do volume de co-solvente já era esperada. Por exemplo, Zago (2010) reportou a queda na taxa de conversão de mais de 90% em meio reacional contendo 96% de *n*-heptano, para cerca de 12% em meio livre de co-solvente utilizando o sólido fermentado por *R. microsporus*. Ghamgui et al. (2006) obtiveram um máximo de 64% de conversão em acetato de isoamila após 8h utilizando a lipase de *S. simulans* imobilizada em CaCO_3 . Apesar da diminuição na taxa de conversão de ésteres, ao calcular a quantidade absoluta de éster formado no sistema com baixo teor de co-solvente, observa-se que neste sistema obteve-se mais produto após as 24h de reação (0,148g de éster metílico e 0,155g de éster etílico para o meio contendo 96% de co-solvente, contra 1,01g para o éster metílico e 0,848g para o éster etílico no meio contendo apenas 3% de *n*-hexano).

Quando comparado este sistema com outros sistemas de esterificação que empregam lipases comerciais imobilizadas em suporte sintéticos como resinas ou polímeros, os últimos apresentam melhores rendimentos em tempos menores (CHEN, DU E LIU, 2008; AL ZUHAIR et al., 2006). Contudo ao levar em consideração que este trabalho utilizou uma lipase sem nenhum tipo de tratamento e pouco estudada, o resultado obtido foi considerado satisfatório, embora mais estudos sejam necessários visando elevar a conversão de ácidos graxos em ésteres. O uso de um sistema de re-circulação dos substratos em um reator de leito fixo preenchida com o sólido fermentado pode favorecer a conversão em ésteres (SALUM et al., 2010, ZAGO, 2010), bem como a adição do álcool em etapas; desta forma protege-se a enzima dos efeitos nocivos que uma alta concentração de solventes polares pode causar sobre a enzima, como a desnaturação.

2.5. Aplicação do sólido fermentado em reação de transterificação

2.5.1. Síntese do palmitato de metila e etila a partir de palmitato de *p*-nitrofenila

Foi determinada a atividade de transesterificação do palmitato de *p*-nitrofenila em meio orgânico na presença de metanol e etanol (Tabela II.8). Quando o catalisador adiciona o radical vindo do álcool para formar os ésteres de palmitato, o *p*NP é liberado e pode ser medido por espectrofotometria após extração para meio aquoso. Pela estequiometria da reação, a formação de um mol de éster de palmitato libera um mol de *p*NP; pode-se então calcular a conversão do *p*NPP em ésteres metílico ou etílico. Esta técnica permite também quantificar a “atividade de transesterificação” (UT/gss) da enzima, segundo descrito no item 1.4.1. As taxas de conversão em ésteres metílicos e etílicos, bem como atividade de transesterificação obtidas para o sólido fermentado estão apresentadas na Tabela II.9. O meio reacional continha 1 mmol *p*NPP.

Tabela II.8: Taxa de conversão em ésteres de palmitato e atividade de transesterificação utilizando diferentes alcoóis.

Éster produzido	Conversão após 1h (%)	Atividade transesterificação (UT/gss)
Palmitato de metila	1,30 ± 0,10	0,21 ± 0,02
Palmitato de etila	2,70 ± 0,30	0,44 ± 0,06

A conversão em éster de palmitato, bem como a atividade de transesterificação no meio contendo etanol, foi o dobro do observado para o meio contendo metanol. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que em concentrações de baixa à moderada destes solventes, a enzima mostra-se mais estável frente ao etanol (Tabela I.3). Contudo, estes valores estão muito abaixo do encontrado para as reações de hidrólise (71,43 U/gss) conforme apresentado no item 2.1. No entanto, trata-se de tipos bem distintos de reações: a hidrólise é a reação básica que toda lipase deve realizar, enquanto que reações de síntese em meio orgânico como a esterificação e transesterificação são mais complexas, tanto que algumas dessas enzimas sequer são capazes de catalisá-las.

A lipase da mesma cepa de *F. oxysporum* utilizada neste trabalho, e produzida em FSM apresentou 0,52 UT/g (100 U de atividade hidrolítica) quando liofilizada e 1,81UT/g (28,15 U de atividade hidrolítica) e 0,87UT/g (36 U de atividade hidrolítica) quando imobilizada em polióxido de etileno (PEO) e Celite® 545, respectivamente em meio contendo

metanol como solvente e nas mesmas condições (37°C, 200 rpm, OLIVEIRA, 2012). Apesar de uma atividade de transesterificação menor (0,21 UT/g em meio contendo metanol e 0,44 UT/g em meio contendo etanol), ainda assim o sólido fermentado se torna uma boa alternativa, pois associa a produção da lipase diretamente com sua aplicação, diminuindo tempo e gastos com a extração e imobilização da enzima nestes suportes. Embora a lipase livre liofilizada seja mais ativa em reações de transesterificação do que o sólido fermentado, ela tem a desvantagem de não poder ser recuperada para o re-uso em outros ciclos.

Enquanto que o uso do sólido fermentado resultou em baixas taxas de transesterificação do *p*NPP (Tabela II.8), o uso de lipases comerciais de *Candida antarctica* e *Mucor miehei* apresentaram 560 e 360 UT/g, enquanto que as de *C. rugosa* e *Rhizopus arrhizus* apresentaram somente 18 e 12 UT/g (GOUJARD et al., 2009). As lipases de *C. antarctica*, *Burkholderia sp.* e *P. fluorescens* atingiram altas taxas de conversão em palmitato de etila (entre 45% e 75% após 30 min) de uma solução com 0,5 mmol de *p*NPP; por outro lado as lipases de *Penicillium sp.*, *C. rugosa* e lipase de pâncreas de porco foram incapazes de realizar a etanólise do *p*NPP (TENG e XU, 2007).

Outro fator a se levar em conta ao trabalhar com reações envolvendo enzimas é em relação à especificidade inata que cada lipase possui aos diferentes substratos. Tanto o uso de outros alcoóis como de outros substratos lipídicos pode provocar o aumento ou a queda nas taxas de conversão, bem como na atividade de transesterificação.

Apesar da baixa taxa de transesterificação do sólido fermentado, este se mostra como uma alternativa mais barata em relação aos métodos convencionais, e com mais estudos pode-se aumentar a atividade de transesterificação para níveis mais significativos, tornando esta alternativa industrialmente mais competitiva em relação às demais.

3. CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho permitem concluir que o sólido fermentado pode ser usado para hidrólise do *p*NPP, bem como biocatalisador em reações de esterificação, obtendo conversões de cerca de 90% em ésteres metílicos e etílicos por até 6 ciclos, sem perda de atividade. Pode-se observar que apesar da baixa transesterificação do *p*NPP, ainda assim foi possível a produção de ésteres de palmitato, indicando um a possibilidade no emprego em reações de transesterificação.

CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem algumas conclusões:

- O uso da torta de crambe umedecida com tampão fosfato pH 8,0 demonstrou ser suficiente para a produção da lipase por *F. oxysporum* em FES, sem necessitar de suplementação com óleo ou sais minerais.
- As soluções testadas para extração da enzima não foram eficazes, pois a recuperação enzimática foi baixa (20%), indicando que a enzima está fortemente ligada ao substrato, ou seja, pronta para uso via adição do sólido fermentado nas reações de biocatálise;
- O extrato lipolítico estudado apresentou maiores atividades em 40°C e pH 8,0. Foi estável em ampla faixa de pH e em temperaturas de até 37°C.
- A enzima foi estável em baixas concentrações de solventes orgânicos polares e muito estável em apolares.
- Em surfactantes não-iônicos foi mantida a estabilidade enzimática, enquanto que em catiônicos a atividade foi aumentada em até 200%. A lipase, entretanto, não foi estável em surfactantes aniônicos.
- A hidrólise dos diferentes substratos confirmou tratar-se de uma lipase verdadeira.
- O sólido fermentado pode ser usado em por dois ciclos de hidrólise do *p*NPP.
- O uso do sólido fermentado como biocatalisador em reações de esterificação mostrou-se possível, obtendo conversões de cerca de 90% em ésteres metílicos e etílicos.
- O sólido fermentado pode ser utilizado em até 6 ciclos de esterificação, sem perda significativa de atividade pelo mesmo.
- A transesterificação do *p*NPP pelo sólido fermentado foi muito abaixo da atividade hidrolítica, contudo, ainda assim foi possível a produção de ésteres de palmitato, mesmo que em baixa porcentagem.

Os resultados obtidos sugerem que uma continuidade nos estudos das reações de síntese são necessários, pois se as taxas de conversão em ésteres puderem ser maximizadas, e o sólido apresentar capacidade de transesterificação de óleos, a metodologia empregada neste

trabalho pode ser muito interessante por utilizar resíduos agroindustriais como meio fermentativo para a produção de lipase por *F. oxysporum* aliado diretamente à sua aplicação em processos industriais, sem necessidade de etapas de extração, purificação, concentração e imobilização enzimática. Todas essas vantagens refletem uma considerável redução de custos durante o processo, podendo torná-lo mais competitivo do ponto de vista econômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL AND AGRICULTURAL CHEMISTRY. **Official Methods of Analysis**. 12^a ed., Washington, D.C.: AOAC International, 1993, 1094 p.
- ADHAM, N.Z.; AHMED, E.M. Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3; production, partial purification and properties. **Indian Journal of Microbiology**, v.49, p.77–83, 2009.
- AL-ZUHAIR, S.; JAYARAMAN, K.V.; KRISHNAN, S.; CHAN, W.H. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 212-217, 2006.
- ANTHONISEN, D.G.; SILVA, S.D.A.; JÚNIOR, A.C. Perfil de ácidos graxos de óleos vegetais com potencial para a produção de biodiesel. In: Simpósio Estadual de Agroenergia e 1^a Reunião Técnica Anual de Agroenergia – Embrapa Clima Temperado, 2007, Pelotas. **Anais do Simpósio Estadual de Agroenergia e 1^a Reunião Técnica Anual de Agroenergia – Embrapa Clima Temperado**, Pelotas: 2007, 4 p.
- AZEVEDO, A.M.; PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S.; FONSECA, L.P. Stability of free and immobilized peroxidase in aqueous-organic solvents mixtures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.15, p.147-153, 2001.
- BADENES, S.M.; LEMOS, F.; CABRAL, J.M.S. Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. **Biotechnology Letters**, v.32, p. 399-403, 2010.
- 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, pp. 9-14, 2010.
- BEN SALAH, R.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.
- BENJAMIN, S. e PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, p. 213- 221, 2001.
- BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biociencia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2005. p. 247-276.
- BICAS, J.L. QUADROS, C.P.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Integrated process for co-production of alkaline lipase and R-(+)- α -terpineol by *Fusarium oxysporum*. **Food Chemistry**, v. 120, p. 452–456, 2010.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S. GOTT, K.P.; BACKHOUSE, D. **Laboratory Manual for *Fusarium* Research**, Sydney: University of Sydney, 1994. 133 p.

CAMARGO-DE-MORAIS, M.M.; MAIA, M.M.D., BORBA, F.F.S.; MELO, K.G.; SANTOS, C.M.S.O.; REIS, E.R.A.; MORAIS JÚNIOR., M.A.; LIMA-FILHO, J.L. Oil/mineral-salts medium designed for easy recovery of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.17-20, 2003.

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

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

CENTENARO, G. S.; FURLAN, V. J. M.; SOARES, L. A. S. Gordura de frango: alternativas tecnológicas e nutricionais. In: Seminário de Ciências Agrárias, 2008, Londrina/PR. **Anais do Seminário de Ciências Agrárias**, v. 29, n.3, p. 619-630, jul./set., 2008.

CHEN, X., DU, W. E LIU, D. Effect of several factors on soluble lipase-mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2097-2102, 2008.

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

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

CRUZ, M.; CHRISTEN, P. Medium optimization by a fractional design for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Journal of Fermentation & Bioengineering**, v. 76, p.94-97, 1993.

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

DAVE, R.; MADAMWAR, D. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 951-955, 2006.

DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v.25, p.1225-1229, 2003.

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

- FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.
- FREIRE, D.M.A; CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) **Enzimas em Biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506 p.
- FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.81, p. 48-56, 2000.
- FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BON, E.P.S.; SANT'ANNA Jr., G.L. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, v.28, p. 6-12, 1997.
- FUNGARO, M.H.P., MACCHERONI, J.R. **Recursos genéticos e melhoramento – Melhoramento genético para a produção de enzimas aplicadas à indústria de alimentos**. 1ª ed., Embrapa, São Paulo: 2002, 427-453.
- GANDHI, N.N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 621-634, 1997.
- GHALY, A.E; DAVE, D.; BROOKS, M.S; BUDGE, S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 54-76, 2010.
- GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; BEZZINE, S.; MILED, N.; GARGOURI, Y. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 788–794, 2006.
- GOMBERT, A.K.; PINTO, A.L., CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, p.85-90, 1999.
- GOMES JUNIOR, S. B. **Avaliação técnica e econômica da aplicação de óleo vegetal de crambe como isolante elétrico em comparação com óleo de soja**. Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento, Curitiba/PR, 2010. 80F. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado Profissional em Desenvolvimento de Tecnologia) – Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento e Instituto de Engenharia do Paraná, Curitiba. 2010.
- GOUJARD, L.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; LECOMTE, J.; PINA, M.; CLAUDE, S.; LE PETIT, J.; FERRÉ, E. A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p. 161-167, 2009.
- GULATI, R.; BHATTACHARYA, A.; PRASAD, A.K.; GUPTA, R.; PARMAR, V.S. Biocatalytic potential of *Fusarium globulosum* lipase in selective acetylation/deacetylation reactions and in ester synthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 609-613, 2001.

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

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; SUZUKI, Y.; YOSHIDA, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Preparation and comparative characterization of immobilized *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase for enzymatic biodiesel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.81, p.637-645, 2008.

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

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.

HOSHINO, T.; SASAKI, T.; WATANABE, Y.; NAGASAWA, T.; YAMANE, T. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.56, p. 660-664, 1992.

JAEGER, K. E.; RANSAK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p. 29-63, 1994.

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

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

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

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

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

KIRAN, K.R.; KRISHNA, S.H.; BABU, C.V.S.; KARANTH, N.G.; DIVAKAR, S. An esterification method for determination of lipase activity. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1511-1514, 2000.

KNIGHT, K.; PIMENTEL, M.C.B.; CAMARGO-DE-MORAIS, M.M.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L.; MAIA, M.M.D. Immobilization of lipase from *Fusarium solani* FS1. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 31, p. 220-222, 2000.

KODA, R.; NUMATA, T.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NAKASHIMA, K.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Ethanolysis of rapeseed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by *Fusarium heterosporum* lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, p.101–104, 2010.

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

LIMA, V. M. G. ; KRIEGER, N. ; MITCHELL, D. A. ; BARATTI, J.C. ; FILLIPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potencial for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 31, p. 53-61, 2004 a.

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

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

LOU, Z.Y.; LI, M.; SUN, Y.N.; LIU, Y.; LIU, Z.; RAO, Z.H. **Cristal structure of lipase from *Gibberella zeae***. Protein Data Bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3NGM>>. Acesso em: 10/02/2012.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS Jr., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, v.30, p304-309, 1999.

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M.M.C.; MELO, E.H.M., MORAIS Jr., M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology** v.76, p. 23-27, 2001.

MALA, J.G.S.; EDWINOLIVER, N.G.; KAMINI, N.R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, p. 247–253, 2007.

MANESSE, M.L.M.; COX, R.C.; KOOPS, B.C.; VERHEIJ H.U.; HAAS, G.H. EGMOND, M.R.; VAN DER HIJDEN H.T.W.M.; VLIEGS, J. Cutinase from *Fusarium solani pisi* hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. **Biochemistry**, v.34, p. 6400-6407, 1995.

- MASE T.; MATSUMIYA Y.; AKIBA T. Purification and characterization of a new lipase from *Fusarium* sp. YM-30. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.56, p. 1771–2, 1995.
- MATEOS DIAZ, J.C.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIEIE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 1042–1050, 2006.
- MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; GUIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n.2, p.213-234, 2011.
- MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF: A complex interaction of phenomena. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. (Coord.) **Solid State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006.
- MOREIRA, A.B.R.; PEREZ, V.H.; ZANIN, G.M. & CASTRO, H.F. Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol Using Lipases from Several Sources Immobilized on Silica–PVA Composite. **Energy Fuels**. v. 21, p. 3689-94, 2007.
- MU, Y.; XIAU, Z.L. E ZHANG, D.J. A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 537-541, 2008.
- NAGAO, T.; SHIMADA, Y.. SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Expression of lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: High-level production and purification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 488-492, 1996.
- NAGAO, T.; SHIMADA, Y., SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Amino acid residues contributing to stabilization of *Fusarium heterosporum* lipase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 5, p. 446-450, 2000.
- NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; MURATA, A.; KOMEMUSHI, S.; TOMINAGA, Y. Use of thermostable *Fusarium heterosporum* lipase for production of structured lipid containing oleic and palmitic acids in organic solvent-free system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 2, p. 167-172, 2001.
- NAGAO, T.; SHIMADA, Y., SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Increase in stability of *Fusarium heterosporum* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 125–132, 2002.
- OGINO, H.; NAKAGAWA, S.; SHINYA, K.; MUTO T.; FUGIMURA, N.; YASUDA M.; ISHIKAWA, H. Purification and characterization of organic solvent stable lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, p.451-457, 2000.

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

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

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v.18, p. 37-45, 2003.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74 , p.69-80, 2000.
PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.81-84, 2003.

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

PASTORE, G.M.; COSTA, V.N.R.; KOBLITZ, M.G. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p.125-140, 2003.

PIMENTEL, S. A.; TAKEMOTO, E.; KUMAGAI, E. E.; CANO, C. B. Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo e CN 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. **Química Nova**, v.31, n. 1, p.31-34, 2007.

PINHEIRO, T.L.F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI-LUCCIO, M.; FREIRE, D.M.G. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 444-450, 2008.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 246-252, 2010.

PITA, M. C. G.; NETO, E. P.; CARVALHO, P. R.; JUNIOR, C. X. M. Efeito da suplementação de linhaça, óleo de canola e vitamina E na dieta sobre as concentrações de ácidos graxos poliinsaturados em ovos de galinha. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.925-931, 2006.

PRAZERES, J.N.; CRUZ, J.A.B.; PASTORE, G.M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.505-509, 2006.

QUADROS, C.P.; BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Producing alkaline lipase by *Fusarium oxysporum* using unconventional medium components. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 6, 4 p., 2009.

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

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, 2005.

RAPP, P. Production , regulation, and some properties of a lipase activity from *Fusarium oxysporum sp. vasinfectum*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 17, p. 832-838, 1995.

RIBEIRO, B.D.; CASTRO, A.M.; COELHO, M.A.Z.; FREIRE, D.M.G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, 16 p., 2011.

RIFAAT, H.M.; MAHALAWY, A.A.; MENOFY, H.A.; DONIA, S.A. Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v.5, p.39-53, 2010.

ROCHA, D.Q.; BARROS, D.K.; COSTA, E.J.C.; SOUZA, K.S.; PASSOS, R.R.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; CHAAR, J.S. Determinação da matéria-prima utilizada na produção de biodiesel adicionado ao diesel mineral, através de monitoramento seletivo de íons. **Química Nova**, v.31, n.5, p. 1062-1066, 2008.

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS DIAZ, 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.

SAAD, M.M.; KANSOH, A.L.; GADALLAH, M.A. Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*. **Arab Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 19-28, 2005.

SALIS, A. Characterisation of Accurel MP 1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 24-25, p. 75-82, 2003.

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

SALUM, T.F.C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C.I.; CÔCCO, L.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB1. **Process Biochemistry** v. 45, pp.1348–1354, 2010.

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

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p.1 - 18, 2003.

SCHMID, A.; HOLLMANN, F.; PARK J.B.; BÜHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 359 –366, 2002.

SEBRAE. **Biodiesel**. Brasília, 2010. 65 p. Disponível em:

<[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/D170D324C7521915832572B200470F63/\\$File/NT00035116.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/D170D324C7521915832572B200470F63/$File/NT00035116.pdf)>. Acesso em: 20/02/2012.

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

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p.627–662, 2001.

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.; TSUNASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel solvent tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 349 - 352, 1993.

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

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1070 - 1074, 1986.

SUN, S.; LI, P.; LIU, B.; LIU, D.; LI, Z. Solid state fermentation of rice chaff for fibrinolytic enzyme production by *Fusarium oxysporum*. **Biotechnology Letters**, v.19, n.5, p. 465-467, 1997.

SUN, S.; LIU, B.; LI, P.; LIU, D.; LI, Z. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum*. **Process Biochemistry**, v. 33, n.4, p. 419-422, 1998.

TENG, Y.; XU, Y. A modified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 363, p. 297–299, 2007.

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

VOIGT, C.A.; SCHÄFER, W.; SALOMON, S. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal*, v. 42, p. 364–375, 2005.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glicogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A.M. The effect of water on enzyme action in organic media. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 8017-8021, 1988.

ZAGO, E.C. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido**. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.

ZALIHA, R.N.; RAHAMAN, R.A.; BAHARUM, M.B.; SALLEH, A.B. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas sp.* strain S5. **Analytical Biochemistry**, v. 341, p. 267-274, 2005.