



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Janaina Pires Borges

Produção de lipases por fungos termofílicos e mesofílicos e uso na
produção de biodiesel etílico

São José do Rio Preto
2012

Janaina Pires Borges

Produção de lipases por fungos termofílicos e mesofílicos e uso na
produção de biodiesel etílico

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração – Química Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Boscolo

São José do Rio Preto
2012

Janaina Pires Borges

Produção de lipases por fungos termofílicos e mesofílicos e uso na
produção de biodiesel etílico

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração – Química Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Adriane Milagres
USP – Escola de Engenharia de
Lorena

Prof. Dr. João Cláudio Thomeo
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 23 de março de 2012

Dedico este trabalho

Dedico esta conquista a todos que acreditaram em mim, me deram apoio nas horas que mais precisei e souberam me entender nos dias em que tudo parecia dar errado.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar, me inspirar e me ajudar em todos os momentos.

Aos meus pais, Lindineide e Waldyr, por tudo que fizeram por mim a vida inteira, por confiarem em mim, por me apoiarem e por me ajudarem a tornar meus sonhos realidade.

A minha irmã, Andreia, pela amizade, companheirismo, descontração e principalmente por me ajudar a encarar com mais fibra os problemas.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Roberto da Silva e Prof. Dr. Mauricio Boscolo, pelas oportunidades concedidas durante o mestrado, pela atenção, ensinamentos e principalmente pela valiosa amizade.

À Profa. Dra. Eleni Gomes e Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, pela ajuda, colaboração e valiosas sugestões.

Aos Professores Débora de Oliveira, José Vladimir de Oliveira, Helen Treichel e Marco Di Luccio e suas alunas Marceli e Sheila, que dividiram suas experiências, me ajudando em um dos momentos mais difíceis nestes 2 anos.

Ao aluno de Doutorado Rafael Hatanaka pertencente ao Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (Cempeq) pelas análises de estabilidade oxidativa.

Aos meus grandes amigos Ana Lúcia Ferrarezi e Thiago Ohe, por tudo que passamos juntos, desde as dificuldades encontradas durante o desenvolvimento deste projeto, as risadas e momentos tão especiais que tive com vocês.

Aos meus alunos de IC, Bárbara São José, Pedro Henrique Vendramini, Marcos Rechi Siqueira e Jéssica Fernanda Alves do Santos, e aos alunos do

programa de microbiologia Rafaela Rodrigues de Brito e Diego Monteiro, por toda a ajuda e apoio no desenvolvimento desse projeto e pela amizade que tantas vezes foi o que me manteve firme para realizar esta pesquisa.

Aos meus amigos, Ticiane da Silva Magalhães, Amanda Jordano, Amanda Panza, Felipe Mariano, Danilo Rezende, Olavo Perrone, Ariane Movio, Ariane Zanchetta, Tássia Egea, Josiane Pereira, Victor Zanard, Viviane Shiota, José Carlos Junior e todo o pessoal do laboratório pelas risadas, choros e desabafos, valeu mesmo.

Aos professores, técnicos e todos do departamento, especialmente a Rita Beatriz pelo auxílio, dedicação e atenção.

A FAPESP, pelo imprescindível apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

“O mais importante e bonito do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas - mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam, verdade maior. É o que a vida me ensinou..”

Guimarães Rosa

RESUMO

O biodiesel é uma alternativa ao diesel convencional que pode ser produzido a partir da reação de transesterificação entre triglicerídeos presentes em óleos vegetais ou gordura animal e alcoóis, como o metanol ou etanol. Uma rota promissora desta reação é a catálise enzimática, utilizando lipases. Este trabalho teve objetivo de selecionar cepas fúngicas com capacidade de produzir enzimas lipolíticas com propriedade de transesterificação e a imobilização destas enzimas para produção de biodiesel etílico. Para selecionar as linhagens com atividade lipolítica, foram realizados zimogramas com corante Rodamina B. Foram selecionadas três cepas fúngicas termofílicas e dezoito mesofílicas. As atividades hidrolíticas das linhagens fúngicas selecionadas foram confirmadas com substrato cromogênico, *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP). As linhagens pré-selecionadas foram submetidas ao teste de transesterificação com óleo de soja e etanol, e os produtos desta reação foram analisados por GC-FID. Uma cepa fúngica identificada como *Fusarium sp* P24 foi selecionada para dar continuidade ao trabalho. A lipase bruta produzida a partir do bagaço de cana de açúcar foi concentrada por ultrafiltração e apresentou atividade hidrolítica ótima a 35°C. O processo de imobilização mais eficiente para a realização de síntese foi aquele em que se utilizou as hifas do fungo *Fusarium sp* P24 crescidas no próprio farelo de trigo como suporte. A análise de variância para os experimentos mostrou que entre as variáveis estudadas (temperatura de reação, razão molar óleo/álcool, concentração enzimática e razão v/v óleo/hexano), somente a concentração enzimática como variável significativa e indicou a concentração de 10 % de hifas imobilizadas como ponto ótimo. Entretanto, experimentalmente, o melhor rendimento de biodiesel foi 15,95 %, utilizando-se 7,75 % de hifas imobilizadas, a 31,25°C, numa razão molar óleo/álcool de 1:7,5 e razão v/v óleo/solvente de 1:1,5, obtendo uma conversão de 0,17 g de éster / g de óleo. O uso do ultrassom nas reações aumentou em 64 % o rendimento das sínteses. O biodiesel produzido apresentou estabilidade oxidativa de 4,62 horas não atingindo o valor preconizado pela ANP de 6 horas.

Palavras-chave: Biodiesel etílico. Lipase. Transesterificação.

ABSTRACT

Biodiesel is an alternative to conventional diesel, which can be produced from the transesterification reaction of triglycerides found in vegetable oils or animal fat and alcohols such as methanol or ethanol. A promising route to this reaction is the enzymatic catalysis using lipases. This work aimed at selecting fungal strains capable of producing lipolytic enzymes with property of transesterification and immobilization of such enzymes for the production of ethylic biodiesel. In order to select strains with lipolytic activity, zymograms using dye Rhodamine B were performed. Three thermophilic and eighteen mesophilic fungal strains were selected. The hydrolytic activities of the selected fungal strains were confirmed by using chromogenic substrate *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP). The pre-selected strains were then submitted to transesterification test with ethanol and soybean oil, and the products of such a reaction were analyzed by GC-FID. Only the fungal strain identified as *Fusarium* sp P24 was selected to carry out the work. The crude lipase produced from sugar cane bagasse was concentrated by ultrafiltration and showed optimal hydrolytic activity at 35°C. The most efficient immobilization process in order to carry out synthesis was the one in which hyphae of the fungus *Fusarium* sp P24 was used, they grown on wheat bran as support. Analysis of variance for the experiments showed that among the studied variables (reaction temperature, molar ratio of oil/alcohol, enzyme concentration and ratio v/v oil/hexane), only the enzymatic concentration as a significant variable and indicated a concentration of 10% of immobilized hyphae as an optimum point. However, experimentally speaking, the best biodiesel yield was 15.95%, using 7.75% immobilized hyphae, at 31.25°C, with 1:7.5 oil/alcohol molar ratio and 1:1.5 oil/solvent v/v ratio, obtaining a conversion of 0.17g ester/g oil. The use of ultrasound in the reactions increased the yield of the syntheses in 64%. The biodiesel produced presented 4.62 hours of oxidative stability, not reaching the 6-hour value set by ANP.

Keywords: Biodiesel ethylic. Lipase. Transesterification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Transesterificação de triglicerídeos (SINGH; SINGH, 2010).....	03
Figura 2	Mecanismo de transesterificação alcalina homogenia de óleos vegetais (SCHUCHARDT, 1998).....	05
Figura 3	Mecanismo de transesterificação por catalise ácida de óleos vegetais (SCHUCHARDT, 1998).....	07
Figura 4	Mecanismo de reação de transesterificação proposto para a lipase Cal A com indicação das etapas envolvidas (ERICSSON et al, 2008).....	10
Figura 5	Representação esquemática da reação de hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil palmitato catalisada por lipase.....	22
Figura 6	Representação esquemática da reação de esterificação.....	23
Figura 7	Esquema de reator para síntese de biodiesel etílico com irradiação de ultrassom utilizando sonda ultrassônica.....	28
Figura 8	Detecção de atividade lipolítica de enzimas de fungos mesofílicos em placa de Petri.....	35
Figura 9	Detecção de atividade lipolítica de enzimas de fungos termofílicos em placa de Petri.....	36
Figura 10	Cromatogramas dos padrões palmitato, linoleato, linolenato e oleato de etila, da síntese realizada com enzimas livres da linhagem fúngica <i>Fusarium</i> sp P24 e do óleo de soja.....	40
Figura 11	Atividade enzimática hidrolítica em função do substrato sólido utilizado na fermentação em estado sólido.....	43
Figura 12	Atividade enzimática hidrolítica em função de tempo do tempo de fermentação em bagaço de cana de açúcar e em farelo de soja da linhagem fúngica <i>Fusarium</i> sp P24.....	45
Figura 13	Atividade hidrolítica das enzimas produzidas pelo fungo <i>Fusarium</i> sp P24 do extrato bruto, do extrato concentração e do extrato descartado na concentração.....	47

Figura 14	Efeito da temperatura na atividade hidrolítica das enzimas produzidas pelo fungo <i>Fusarium sp</i> P24 em função da temperatura.....	49
Figura 15	Atividade hidrolítica das enzimas produzidas pelo fungo <i>Fusarium sp</i> P24 presente no extrato bruto antes da imobilização e depois da imobilização em quitosana e em alginato.....	51
Figura 16	Cromatogramas dos padrões palmitato, linoleato, linolenato e oleato de etila e das sínteses realizadas com a hifa imobilizada em farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana de açúcar.....	54
Figura 17	Rendimento das sínteses realizadas utilizando-se enzimas das hifas imobilizadas em farelo de soja, farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar.....	55
Figura 18	a) Curvas de contorno e b) superfície de resposta para o rendimento das síntese de biodiesel etílico utilizando as enzimas das hifas imobilizadas do fungo <i>Fusarium sp</i> P24 em função da concentração enzimática e razão molar óleo/álcool.....	59
Figura 19	Ponto ótimo obtido através do planejamento fatorial de realização de transesterificação.....	60
Figura 20	Cinética de produção de biodiesel pelas lipases de hifas do fungo <i>Fusarium sp</i> P24 imobilizadas em farelo de trigo.....	61
Figura 21	Rendimento da transesterificação em função da quantidade de água presente no meio reacional utilizando-se enzimas das hifas imobilizadas em farelo de trigo do fungo <i>Fusarium sp</i> P24.....	62
Figura 22	Rendimento da síntese de biodiesel utilizando-se enzimas das hifas imobilizadas em farelo de trigo do fungo <i>Fusarium sp</i> P24 com emprego de ultrassom.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estrutura química dos ácidos graxos mais comuns (SINGH; SINGH, 2010).....	03
Tabela 2	Relação das espécies fúngicas testadas para seleção de microrganismos produtores de lipase.....	18
Tabela 3	Valores utilizados no DCCR para a produção de biodiesel.....	27
Tabela 4	Detecção de atividade lipolítica em placa de petri (zimograma).....	32
Tabela 5	Relação de linhagens fúngicas testadas em substrato cromogênico e atividades hidrolíticas de suas enzimas.....	37
Tabela 6	Relação de linhagens fúngicas testadas quanto à atividade de transesterificação.....	41
Tabela 7	Precipitação do extrato bruto enzimático produzido por <i>Fusarium</i> sp. P24 em 72 horas de fermentação.....	48
Tabela 8	Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com os rendimentos das reações de transesterificação com a enzima das hifas imobilizadas <i>Fusarium</i> sp P24.....	56
Tabela 9	Coeficientes de regressão estimados para o rendimento.....	57
Tabela 10	Coeficientes de regressão estimados para o rendimento para o novo modelo.....	58

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	02
2.1. Biodiesel.....	02
2.2. Lipases e reações de biotransesterificação na produção de biodiesel.....	08
2.3. Imobilização de enzimas.....	12
2.4. Otimização da catálise enzimática.....	14
3. OBJETIVO.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Seleção dos Microrganismos produtores de lipase.....	18
4.2. Meio de manutenção (repiques periódicos).....	19
4.3. Meios de cultura.....	19
4.4. Testes da atividade lipolítica (zimograma).....	19
4.5. Fermentação em estado sólido (FES).....	20
4.6. Proteína total.....	20
4.7. Precipitação de proteínas.....	20
4.8. Concentração do extrato enzimático bruto.....	21
4.9. Determinação de atividade enzimática.....	21
4.9.1. Atividade de lipase hidrolítica em substrato cromogênico.....	21
4.9.2. Atividade esterificante.....	23
4.9.3. Atividade de transesterificação.....	24
4.10. Síntese de biodiesel.....	24
4.11. Imobilização da enzima.....	25
4.11.1. Alginato.....	25
4.11.2. Quitosana.....	25

4.11.3 Imobilização de hifas utilizando substrato de crescimento como supote.....	26
4.12. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	26
4.13. Síntese de biodiesel com irradiação de ultrassom.....	27
4.14. Quantificação dos ésteres etílicos.....	28
4.15. Análise de estabilidade oxidativa.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Seleção de microrganismos produtores de lipase...	31
5.1.1. Teste de atividade lipolítica (Zimograma).....	31
5.1.2. Atividade hidrolítica de lipase em substrato cromogênico.....	37
5.1.3. Atividade de lipase de transesterificação.....	39
5.2. Produção enzimática do fungo <i>Fusarium</i> sp P24 em diferentes fontes de carbono.....	41
5.3. Produção enzimática do fungo <i>Fusarium</i> sp P24 em função do tempo.....	44
5.4. Concentração e Precipitação de Proteínas produzidas pelo fungo <i>Fusarium</i> sp P24.....	46
5.5. Temperatura ótima de atividade hidrolítica enzimática do fungo <i>Fusarium</i> sp P24.....	48
5.6. Atividade de Esterificação de lipase do fungo <i>Fusarium</i> sp P24.....	50
5.7. Imobilização de lipase.....	51
5.8. Síntese de biodiesel.....	55
5.8.1. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	55
5.8.2. Cinética de produção de biodiesel.....	60
5.8.3. Efeito da quantidade de água na produção do biodiesel.....	61
5.8.4. Efeito da irradiação de ultrassom na produção do biodiesel.....	63
5.9. Análise de estabilidade oxidativa.....	64

6. CONCLUSÕES.....	66
7.CRONOGRAMA DESENVOLVIDO DURANTE O PROJETO	68
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento do consumo do petróleo nas ultimas décadas, a necessidade de buscar fontes alternativas de energia como etanol e biodiesel tem crescido, uma vez que além de serem provenientes de material renovável, esses produtos poluem menos que os derivados de petróleo.

O biodiesel é considerado um possível substituto para o diesel convencional, visto que é energeticamente compatível ao derivado de petróleo. Ele é composto por metil ou etil ésteres que podem ser produzidos a partir de triacilgliceróis presentes em óleos vegetais por reações de transesterificação com metanol ou etanol na presença de um catalisador.

Os óleos vegetais, como o de soja, milho, algodão e palma já foram testados como combustíveis, porém a alta viscosidade e a baixa volatilidade em clima frio levaram à investigação de seus derivados como forma de contornar estes inconvenientes. Por meio da reação de transesterificação foi possível diminuir a viscosidade dos óleos vegetais e melhorar suas propriedades carburantes. O uso do etanol (derivado da cana de açúcar) e não do metanol (derivado do petróleo), associado a catalise enzimática (lipase) é uma das rotas mais promissoras de se produzir biodiesel, por propiciar uma cadeia completa de insumos renováveis. Este campo da biotecnologia ainda carece de muitos estudos, mas resultados publicados por diferentes autores vêm demonstrando que é uma tecnologia viável (CHEN et al., 2008). O sucesso neste campo de pesquisa terá um impacto imediato em toda a cadeia de produção de biocombustíveis, pois terá reflexos positivos na redução de custos de produção e benefícios ao meio ambiente. O objetivo do presente trabalho foi selecionar e aplicar lipases fúngicas em processos de obtenção de biodiesel a partir de óleo de soja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biodiesel

O nome biodiesel foi introduzido em 1992 nos Estados Unidos pela National Soy Diesel Development Board, que foi pioneira na comercialização deste produto. Este combustível pode ser utilizado em misturas com diesel, pois ambos apresentam características físicas muito similares, porém com emissões menos poluentes, sendo biodegradável, não tóxico e essencialmente livre de enxofre e aromáticos (SINGH; SINGH, 2010, VYAS et al, 2010).

Nos últimos 20 anos o desenvolvimento de tecnologias para se produzir biodiesel tem avançado rapidamente devido à promessa de ser uma fonte renovável de combustível, sendo composto de metil ou etil ésteres produzidos pela alcoólise (reação de transesterificação utilizando-se álcool) de triglicerídeos, presentes em gordura animal e em óleos vegetais (WANGA; ZHANG, 2010).

Apesar de possuírem características físicas semelhantes, o diesel tem estrutura química diferente dos óleos vegetais e de seus ésteres, sendo que o primeiro contém apenas átomos de carbono e de hidrogênio arranjados em cadeia linear ou estruturas da cadeia ramificada. Em sua composição também pode haver hidrocarbonetos insaturados, mas estes não estão presentes em quantidade suficiente para causar problemas de oxidação aos motores. Em geral a fórmula para o óleo diesel é $C_{12}H_{23}$, podendo variar entre $C_{10}H_{20}$ e $C_{15}H_{28}$. Já os óleos vegetais contêm triacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, fosfatídeos, carotenóides e traços de água. Os ácidos graxos mais encontrados em óleos vegetais são o esteárico, o palmítico, o oléico, o linoléico e o linolênico (SINGH; SINGH, 2010). A Tabela 1 mostra a composição química de alguns ácidos graxos encontrados nos óleos vegetais.

Tabela 1: Estrutura química dos ácidos graxos mais comuns (SINGH; SINGH, 2010).

Ácido graxo	Nome químico do ácido graxo	Estrutura	Fórmula
Láurico	Dodecanóico	12:0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
Mirístico	Tetradecanóico	14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Palmítico	Hexadecanóico	16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Estearico	Octadecanóico	18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Oléico	Cis-9 -octadecenóico	18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Linoléico	Cis-9,12-Octadecadienóico	18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Linolênico	Cis-9,12,15- octadecatrienóico	18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Araquídico	Eicosanóico	20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
Beénico	Docosanóico	22:0	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Erúcico	Cis-13-docosenóico	22:1	C ₃₂ H ₄₂ O ₂
Lignocérico	Tetracosanóico	24:0	C ₂₄ H ₄₈ O ₂

O método mais comum para a produção de biodiesel envolve a transesterificação de triglicerídeos na presença de catalisadores químicos ou enzimáticos como mostra a figura Figura 1. Os processos químicos de produção de biodiesel proporcionam conversões elevadas de triglicerídeos em seus ésteres correspondentes em tempos reduzidos de reação, porém apresentam muitas desvantagens (WANGA; ZHANG, 2010).

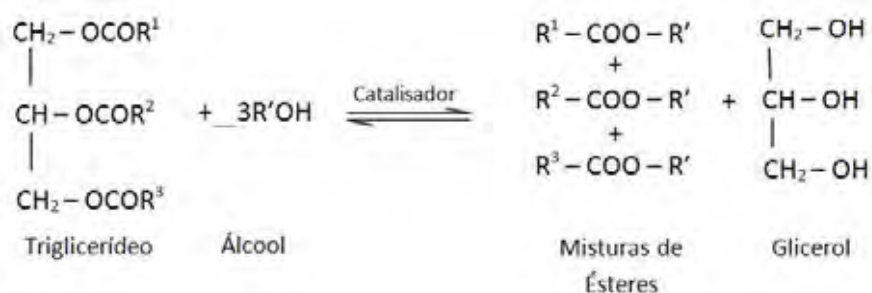


Figura 1: Transesterificação de triglicerídeos (SINGH; SINGH, 2010).

A transesterificação ocorre em uma série de reações consecutivas e reversíveis nas quais os triglicerídeos são convertidos em etapas a diglicerídeos,

monoglicerídeos e finalmente a glicerol. Acredita-se que a formação do alquil éster a partir do monoglicerídeo seja a etapa que determina a taxa de reação, uma vez que o monoglicerídeo é o intermediário mais estável produzido. Esta reação é um processo de equilíbrio e a transformação ocorre essencialmente pela mistura dos reagentes em uma estequiometria que requer 1 mol de triglicerídeo e 3 mols de álcool, no entanto é utilizado um excesso de álcool para deslocar o equilíbrio e consequentemente aumentar o rendimento dos ésteres, permitindo assim a separação de fases a partir do glicerol formado (DEMIRBAS, 2005).

A transesterificação alcalina homogênea de óleos e gorduras é a principal tecnologia utilizada no mundo para a produção de biodiesel, porém este processo requer matérias primas de alta pureza, ou seja, com baixa concentração de ácidos graxos livres, fosfatídeos e água (SUAREZ et al, 2009). Os catalisadores alcalinos mais comumente usados são NaOH, CH_3ONa e KOH e o processo geralmente ocorre a temperatura de 60°C (VYAS et al, 2010).

O mecanismo da transesterificação alcalina foi formulado em quatro etapas, como mostra a Figura 2, sendo o primeiro passo a reação do catalisador (base) com o álcool, formando um alcóxido e a base protonada. O alcóxido realiza um ataque nucleofílico ao grupamento carbonila do triglicerídeo, produzindo um intermediário tetraédrico, a partir do qual será formado o alquil éster e o ânion correspondente do diglicerídeo. Os diglicerídeos e monoglicerídeos são convertidos pelo mesmo mecanismo a uma mistura de alquil ésteres e glicerol (DEMIRBAS, 2005).

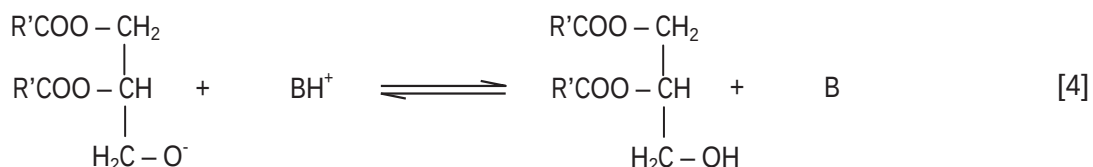
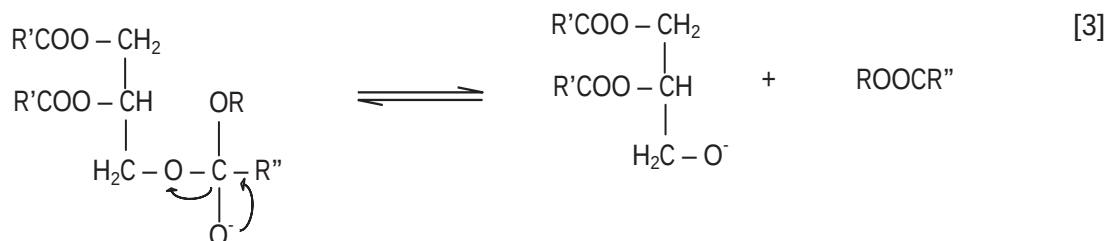
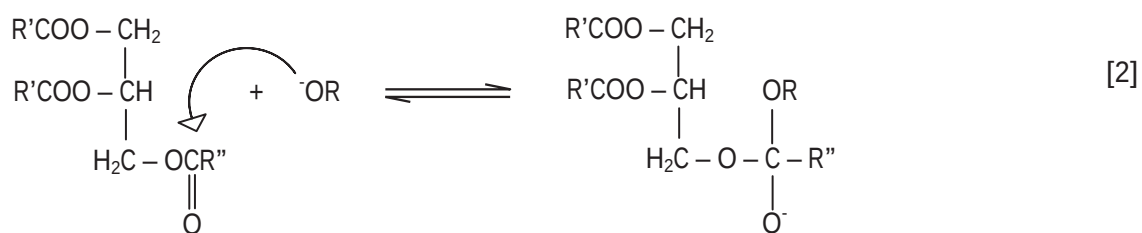


Figura 2: Mecanismo de transesterificação alcalina homogênea de óleos vegetais (SCHUCHARDT, 1998).

Atualmente, o metanol é o álcool mais empregado para produção de biodiesel, devido principalmente ao fato de ser comercializado com alto teor de pureza e não ser higroscópico. Entretanto, é tóxico e de origem petroquímica.

O etanol também pode ser utilizado para a produção de biodiesel, porém o maior obstáculo neste processo está no fato que a presença de água no etanol hidratado favorece a formação de sabão durante a reação de transesterificação por catálise alcalina, o que provoca a emulsificação do glicerol e dificulta consideravelmente sua separação dos ésteres alquílicos produzidos (ANTCZAK et al, 2009). Em função disso, etapas extras de purificação devem ser adicionadas ao processo, elevando assim os custos de produção para que o produto final tenha as características comerciais regulamentadas pela Agência Nacional de Petróleo.

O uso de etanol anidro também é dificultado pela sua higroscopicidade, pois

absorve rapidamente cerca de 2 % de água quando exposto às condições atmosféricas, podendo chegar até 4 % devido às suas propriedades azeotrópicas.

Além do consumo de hidróxido de sódio em larga escala na catálise alcalina, outro ponto importante a ser considerado é o balanço energético da produção de biodiesel. Processos que envolvem aquecimento necessitam de quantidades considerável de energia, independentemente de sua fonte, seja ela elétrica, biomassa ou petroquímica, o que faz com que o combustível ainda não atinja sua finalidade maior de ser uma fonte plenamente sustentável de combustível líquido (BAJAJ et al, 2010).

Outra forma de obtenção do biodiesel é a catálise ácida com ácido sulfúrico ou sulfônico, mas a corrosão que estes catalisadores provocam nos equipamentos faz com que não sejam comercialmente empregados (RANGANATHAN et al., 2008).

O processo ácido tem rendimentos elevados de ésteres alquílicos, porém suas reações são lentas comparadas ao processo alcalino e requerem temperaturas acima de 100°C. A reação de transesterificação acontece por meio da protonação do grupo carbonila do éster, formando um carbocátion, que por sua vez recebe um ataque nucleofílico do álcool, produzindo um intermediário tetraédrico. Após esta etapa a ligação entre o éster e o glicerol é rompida regenerando o catalisador (Figura 3). De acordo com este mecanismo, os ácidos graxos podem ser formados pela reação do carbocátion com a água presente na mistura, portanto a transesterificação deve ser realizada na ausência de água (DEMIRBAS, 2005).

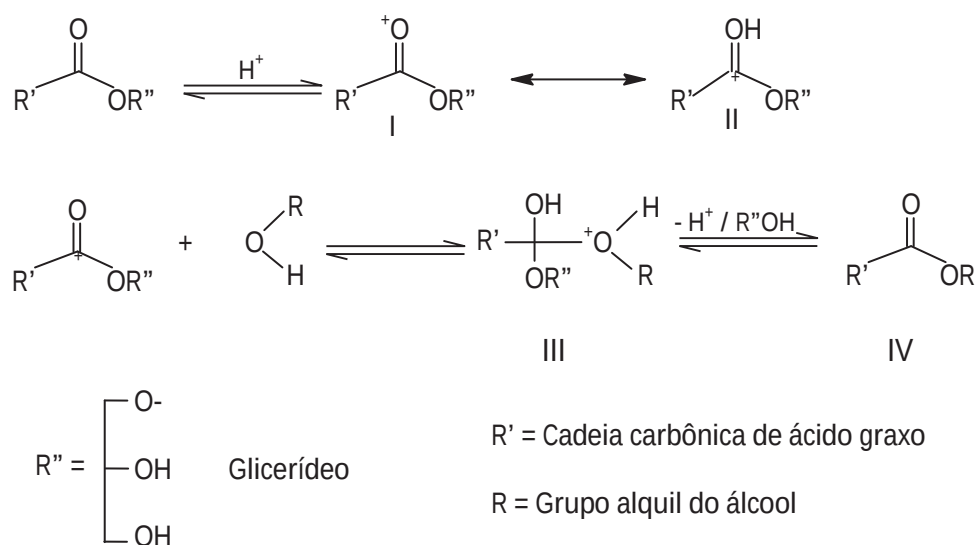


Figura 3: Mecanismo de transesterificação por catalise ácida de óleos vegetais (SCHUCHARDT, 1998).

A reação de transesterificação também pode ser realizada por catálise ácido-básica, com a utilização de excesso de etanol. Este processo é uma junção dos dois esquemas descritos anteriormente e apresenta uma alta produtividade, porém tem muitas desvantagens, como por exemplo, os custos extras devido à recuperação do glicerol, à remoção de sais inorgânicos e ao tratamento de águas residuais (BAJAJ et al, 2010). O processo é dividido em duas etapas. Na primeira etapa, o catalisador ácido é utilizado para converter os ácidos graxos livres em éster por meio de esterificação, quando a quantidade de ácidos graxos livres reduz para 0,5 a 1 % do peso, a transesterificação dos triacilgliceróis pode ser realizada utilizando-se um catalisador básico. Embora esse processo apresente um alto rendimento, a reação de esterificação dos ácidos graxos é relativamente lenta, sendo necessária a adição de mais catalisador ácido para acelerar a taxa de reação, aumentando os custos da produção de biodiesel (LAM et al, 2010)

Outro fator muito importante que encarece a catalise química é o fato do glicerol, subproduto na síntese de biodiesel, apresentar grandes quantidades de

impurezas e mesmo depois do processo de purificação, ainda conter de 5 a 10 % de água e de 4 a 8 % de catalisador (MEDEIROS et al, 2010).

Também é possível processar a reação de transesterificação através da catalise enzimática utilizando-se biocatalisadores, que além de sintetizarem alquil ésteres específicos, realizam a transesterificação de óleos com alto teor de ácido graxo livres. A síntese do biodiesel é realizada por lipases em meio aquo-restrito (BAJAJ et al, 2010). Neste processo não é necessária uma recuperação complexa do glicerol, que possui melhor qualidade devido as condições brandas de reação (JACHMANIÁN et al, 2010). Outra vantagem da transesterificação enzimática é a possibilidade de utilizar alcoóis contendo uma pequena quantidade de água, como por exemplo, o etanol (RANGANATHAN et al., 2008).

A possibilidade do uso do etanol na produção do biodiesel é uma grande vantagem, uma vez que este possui uma produção consolidada no Brasil, além de ser consideravelmente menos tóxico e produzir biodiesel com maior lubricidade e maior número de cetano que o metanol (LÔBO, et al., 2009).

2.2. Lipases e reações de biotransesterificação na produção de biodiesel

As lipases (glicerol éster hidrolase E.C. 3.1.1.3) são enzimas da classe das hidrolases que atuam sobre ligações ésteres de acilgliceróis liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Normalmente são ativadas por uma interface água-óleo e apresentam quimioseletividade, regioseletividade e estereoseletividade (SHARMA et al., 2001, TREVISAN, 2004, TREICHEL et al, 2010).

Essas proteínas podem ser de origem microbiana, vegetal ou animal, porém a via microbiana apresenta maior versatilidade que as enzimas derivadas de plantas e

animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, ao alto rendimento de obtenção das enzimas, à facilidade de manipulação genética, à não dependência da sazonalidade e ao rápido crescimento microbiano (NWUCHE; OGBONNA, 2011).

No campo industrial as lipases são largamente utilizadas no processamento de óleos e gorduras, como componentes de detergentes, na síntese de fármacos e cosméticos, de produtos derivados do leite e outros (RUBIN; DENNIS, 1997, KAZLAUKAS; BORNSCHEUER, 1998). Podem ser usadas também para acelerar a degradação de resíduos de gordura e derivados (SHARMA et al., 2001), sendo aplicadas principalmente em biorreatores, constituindo importante ferramenta em tratamento de resíduos domésticos e industriais (BALCÃO et al., 1996, SHARMA et al., 2001, NYBROE et al., 1992).

Além de catalisarem reações de hidrólise, também realizam reações de síntese em meio aquo-restrito como reações de esterificação e transesterificação (JAEGER; EGGERT, 2002). Lipases produzidas por *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia* vêm sendo estudadas na produção de biodiesel (RANGANATHAN et al., 2008).

As características mais procuradas nas lipases para a utilização na síntese de biodiesel são: capacidade de utilizar mono, di e triglicerídeos, bem como ácidos graxos livres na transesterificação, baixa inibição pelo produto, alta atividade, menor tempo de reação, reutilização da enzima e resistência à temperatura e ao álcool (BAJAJ et al, 2010).

O sítio catalítico da lipase é formado pela tríade serina (Ser184), aspartato (Asp334) e histidina (His366), o qual opera pelo mecanismo característico das

serinas hidrolases, que é semelhante tanto para as reações de hidrólise quanto para as reações de síntese.

Na primeira etapa da síntese, o éster se liga ao sítio ativo da enzima através de um ataque nucleofílico pela Serina à carbonila da ligação éster do substrato. A Serina é ativada pela retirada de um próton pelo par Histidina/Aspartato. Nesta etapa é formado um intermediário tetraédrico que é estabilizado por ligações de hidrogênio com uma Glicina (Gly185) e pela cadeia protonada de um outro resíduo de Aspartato (Asp95). Na segunda etapa a Histidina cede um próton para a liberação de um álcool, tornando o intermediário tetraédrico instável (complexo acil-enzima). Na etapa 3, o complexo acil-enzima sofre um ataque nucleofílico (água na hidrólise e álcool nas reações de esterificação e transesterificação) para formar um novo intermediário tetraédrico, o qual, em seguida colapsa para liberação dos produtos e regeneração da enzima (ERICSSON et al, 2008). Na Figura 4 é mostrado o mecanismo proposto de transesterificação realizado pela lipase de *Candida antarctica*, Cal A.

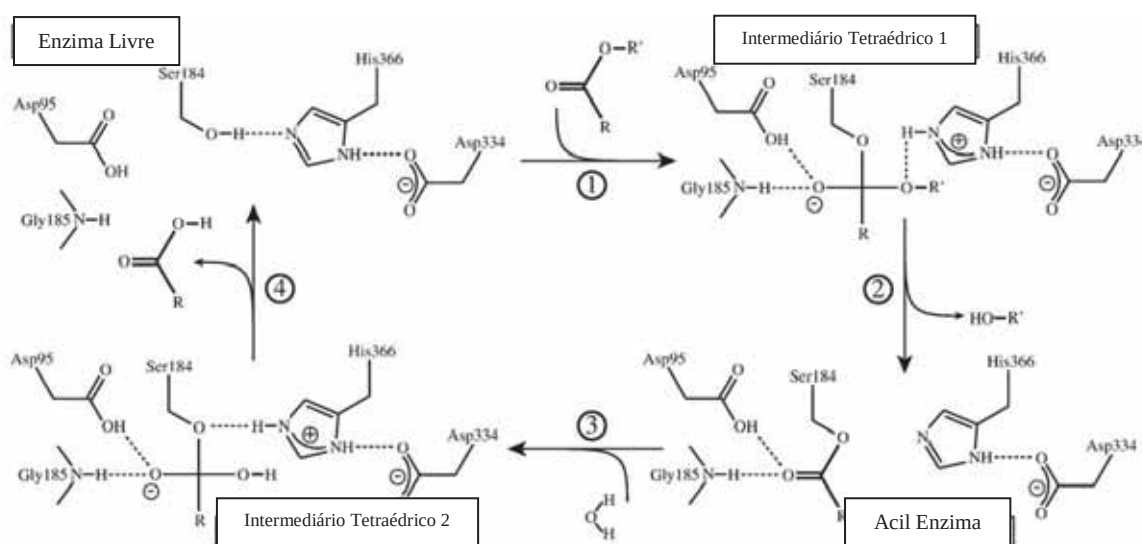


Figura 4: Mecanismo de reação de transesterificação proposto para a lipase Cal A com indicação das etapas envolvidas (ERICSSON et al, 2008).

Em geral, as lipases atuam em condições suaves (menor consumo de

energia), com óleos de diferentes origens, incluindo óleos usados (com acidez elevada), uma vez que estas enzimas catalisam a transesterificação de triacilgliceróis e também de ácidos graxos livres. Se a enzima for imobilizada, ela pode ser facilmente separada da mistura por filtração, e a separação e purificação subsequente do biodiesel são mais fáceis do que com catalisadores alcalinos, que precisam ser eliminados utilizando-se uma grande quantidade de água (MEDINA et al, 2009).

Os microrganismos produtores de lipases tem sido encontrados em diversos habitats, como resíduos de indústrias de óleos vegetais e laticínios, em solos contaminados com óleo, em sementes oleaginosas e alimentos em decomposição (TREVISAN, 2004). No Brasil existem alguns grupos de pesquisa desenvolvendo excelentes trabalhos na busca por cepas fúngicas selvagens produtoras de lipases (BERNARDES et al., 2007, VIEIRA et al, 2006, CASTRO-OCHOA et al., 2005, SUAREZ et al, 2009, TREICHEL et al, 2010).

As lipases obtidas de microrganismos mesofílicos atuam geralmente entre 25 e 45°C, permitindo que reações sejam realizadas a temperatura ambiente e as fermentações para produções das enzimas podem ocorrer sem a necessidade de aquecimento. Alguns microrganismos mesofílicos também podem produzir lipases termoestáveis (HASAN et al., 2006).

Lipases produzidas por microrganismos termofílicos tem sido cada vez mais utilizadas, pois também podem apresentar termoestabilidade, além de outras propriedades intrínsecas que conferem a elas estabilidade a agentes desnaturantes e a maiores variações de pH (GOMES et al., 2007).

Devido à alta estabilidade, as lipases termoestáveis podem ser usadas livremente em solução, imobilizadas covalentemente ou adsorvidas em resinas de

troca iônica, cavidades fibrosas ou ligadas a cristais (ANDERSCH et al., 1997).

O tipo e a concentração da enzima utilizada, a razão molar álcool/óleo/água, temperatura, pH, íons metálicos e ácidos graxos livres são fatores importantes que influenciam a reação de transesterificação. As lipases têm sido muito utilizadas neste tipo de processo, pois são razoavelmente tolerantes a solventes orgânicos e temperaturas elevadas, não requerem o uso de coenzimas, além de serem consideradas altamente específicas. Desse modo, é importante estabelecer as condições ótimas de transesterificação tendo em vista as características desejadas do produto para aplicação industrial específica (SCHUCHARDT et al., 1998, SUAREZ et al., 2009).

Dois fatores que têm inibido a implementação da biocatálise na produção de biodiesel em escala industrial são o custo elevado das enzimas e número reduzido de fabricantes destes biocatalisadores (DABDOUB; BRONZEL, 2009).

2.3. Imobilização de enzimas

Muitos estudos tem sido realizados no desenvolvimento de biocatalizadores com propriedades superiores e também na elucidação de técnicas que permitam os seus usos repetidos ou em processos contínuos. Biocatalizadores imobilizados são enzimas ou células fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, podendo ser reutilizadas (CARVALHO et al., 2006).

A técnica de imobilização tem grande importância porque, além de permitir a reutilização de biocatalizadores, também permite uma fácil e eficiente separação destas moléculas do meio reacional, e oferece uma melhor estabilidade à enzima em presença de determinados solventes, inibidores e outros agentes desnaturantes, e

estabilidade em faixas mais amplas de pH e temperatura (CARVALHO et al., 2006, CORCORAN, 1985). Além disso, foi relatado que alguns métodos de imobilização como o de ligações covalentes (MATEO et al., 2000, PETZELBAUER et al., 2002), o de encapsulação em microcápsulas inorgânicas (MATSUMOTO; KONDO, 2001) e o aprisionamento em géis de alginato (SHARMA et al, 2001) podem aumentar a termoestabilidade da enzima.

A técnica de adsorção é a mais utilizada para imobilização de enzimas, o processo se dá por meio de interações fracas, como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, entre a superfície do suporte e a proteína (RANGANNATHAN et al., 2008; TAN et al., 2010). As enzimas também podem ser imobilizadas através de ligações covalentes irreversíveis, sendo que por meio deste método a enzima não é liberada em condições adversas (TREVAN, 1988).

Outro método de imobilização muito usado é a encapsulação da proteína por uma matriz polimérica. Apesar deste método ser rápido e mais viável, só pode ser utilizado quando o substrato apresenta baixa massa molar, uma vez que substratos maiores não conseguem se difundir pelos poros do polímero (RANGANNATHAN et al., 2008; TAN et al., 2010).

Muitas lipases imobilizadas estão comercialmente disponíveis, sendo que as mais utilizadas são a Novozym 435, enzima de *Cândida antártica* imobilizada em uma resina acrílica macroporosa, a Lipozyme IM RM, enzima de *Rhizomucor miehei*, imobilizada em uma resina de troca iônica e a Lipozyme TL IM, enzima de *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada sobre gel de sílica granulado.

A imobilização das enzimas é essencial para a aplicação industrial, uma vez que permite a sua reutilização, diminuindo os custos de produção, além de facilitar a recuperação do catalisador. O custo da lipase compreende mais de 90 % do custo

total de produção dos ésteres, isso se deve ao tipo de suporte utilizado para imobilização. Portanto suportes mais viáveis, como sílica gel, celite e kaolite estão sendo testados, em alternativa as resinas orgânicas. A quitosana também tem sido utilizada como matriz para imobilização de lipase devido a sua versatilidade (pó, gel, fibras, cápsula e membranas), baixo custo, alta afinidade por proteínas e ausência de toxicidade (AMORIM, et al., 2003).

Outra maneira para reduzir o custo das lipases é empregar células imobilizadas (biomassa fúngica) no substrato no próprio processo de produção, evitando as etapas de recuperação e purificação a partir do caldo de fermentação (MEDINA et al, 2009).

2.4. Utilização de ultrassom na catálise enzimática

Um sistema básico de ultrassom consiste de um transdutor electro-mecânico e de uma fonte de alimentação de alta frequência elétrica. A fonte de alimentação converte o sinal elétrico disponível em sinal elétrico de alta frequência o qual é utilizado para acionar o transdutor electro-mecânico. Os transdutores são tipicamente compostos de elementos eletrostrictivos que mudam de dimensões físicas em resposta a um campo elétrico ou magnético (SOHO, 1975).

Efeito eletrostrictivo (conversão tensão elétrica em deformação mecânica) é uma propriedade de todos os não-condutores elétricos que faz com que eles mudem de forma sob a aplicação de um campo elétrico. A partir deste conhecimento, pulsos de ultrassom são gerados por cristais especiais (como o quartzo puro), que podem vibrar quando percorridos por uma corrente elétrica conveniente. Dessa forma, é possível gerar pulsos de ultrassom com frequências de vários MHz e com duração de apenas alguns milionésimos de segundo (SOHO, 1975). As ondas de ultrassom

se propagam da mesma maneira que as ondas sonoras audíveis. Elas sofrem todos os fenômenos de reflexão, refração, difração e interferência, como todas as ondas.

O ser humano normal consegue distinguir, ou ouvir, sons na faixa de frequência que se estende de 20Hz a 20.000Hz aproximadamente. Acima deste intervalo, os sinais são conhecidos como ultrassons. Assim pode-se definir o Ultrassom como um som a uma frequência superior àquela que o ouvido do ser humano pode perceber, aproximadamente 20.000 Hz (LYNNWORTH, 1975).

Enviando-se um pulso de ultrassom para dentro de um material, ele será parcialmente refletido ao encontrar qualquer descontinuidade no meio, como uma mudança na densidade ou defeitos no próprio material. Se enviarmos uma onda de ultrassom para dentro de uma barra de ferro que possua uma falha interna em virtude de um defeito de fabricação, esta onda será parcialmente refletida na descontinuidade e pode ser detectada por um receptor (SOHO, 1975; LYNNWORTH, 1975). Esse sistema de medida é utilizado industrialmente para detectar fissuras em tubulações de aço, em partes de motores e estruturas de edifícios e pontes. Na medicina, o ultrassom é muito utilizado para diagnóstico de doenças cardíacas e em exames preventivos em gestantes. Com o auxílio de um computador, o sistema transmite ondas de ultrassom em todas as direções e detecta o sinal refletido nos diversos tipos de tecidos e ossos. Dessa forma, é possível obter a imagem de um feto (NOVELLINE, 1997).

De forma similar à limpeza ultrassônica, as células biológicas, incluindo as bactérias podem ser desintegradas. O ultrassom de alta potência produz cavitações que facilitam as desintegrações de partículas ou provoca reações. Isto tem sido usado em ciências biológicas para fins analíticos ou químicos (sonicação e sonoporação) e para matar bactérias em esgoto. Recentemente também, foi relatado

que ultrassom de alta potência pode desintegrar pasta de milho e aumentar a liquefação e sacarificação para a produção de etanol em plantas de moagem de milho (NEIS, et al., 2000; LEEUWEN, et al., 2006).

O efeito de ultrassom no isolamento de hemiceluloses de sabugo de milho e outros materiais vegetais tem sido reportado (LI, et al., 2012; SUN, et al., 2004). Acredita-se que o efeito químico e mecânico do ultrassons para acelerar a extração de compostos orgânicos de materiais de plantas seja a ruptura das paredes das células e da melhora da transferência de massa dos conteúdos da célula.

O emprego de ultrassom para auxiliar a reação de transesterificação tem se mostrado muito eficaz na catálise enzimática. A irradiação contínua ou intermitente de ondas sonoras de alta frequência favorece a ação de diferentes enzimas em sistemas monofásicos e bifásicos (SHAH; GUPTA, 2008, ROKHINA et al., 2009, BABICZ et al., 2010). Essa tecnologia é reconhecida como um método eficaz para aumentar a taxa de transferência de massa entre líquidos imiscíveis, sendo amplamente utilizada em várias reações químicas e biológicas para melhorar o rendimento da reação em um tempo mais curto.

A utilização do ultrassom na transesterificação não só reduz o tempo de reação, como também minimiza a razão molar álcool/óleo e reduz o consumo de energia em comparação com o método mecânico convencional de agitação (LAM et al, 2010).

3. OBJETIVOS

Geral:

- Selecionar enzimas lipolíticas com propriedade de transesterificação e aplicá-las na produção de biodiesel etílico.

Específicos

- Testar atividades lipásicas (hidrolítica, esterificação e transesterificação) a partir de isolados fúngicos obtidos de resíduos gordurosos e plantações de cana de açúcar.
- Imobilizar a enzima com melhor performance em suporte inerte. Testando polímeros à base de quitosana e alginato, além do próprio substrato utilizado na fermentação sólida como fonte de carbono.
- Avaliar os parâmetros físico-químicos, tempo, quantidade de água, temperatura e irradiação de ultrassom no processo de produção de biodiesel;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos Microrganismos produtores de lipase

Os testes de produção enzimática foram realizados em linhagens fúngicas termofílicas e mesofílicas isoladas a partir de resíduos gordurosos de frigoríficos e laticínios e também de plantação de cana de açúcar. Os isolados fazem parte da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UNESP do Câmpus de São José do Rio Preto-SP (Tabela 2). As linhagens fúngicas selecionadas foram estocadas sob congelamento a - 80°C em glicerol. Algumas já foram identificadas até o gênero.

Tabela 2: Relação das espécies fúngicas testadas para seleção de microrganismos produtores de lipase

Linhagens fúngicas termofílicas	Linhagens fúngicas mesofílicas
<i>Aspergillus</i> sp T 3.3.1	<i>Cunninghamella</i> sp1
M 6.2	<i>Cunninghamella</i> sp2
F 5.9	<i>Cunninghamella elegans</i>
M 8.1 B	<i>Fusarium</i> sp1
M 6.10	<i>Fusarium</i> sp2
Esterco 2	<i>Fusarium</i> sp3
T 1.3	<i>Fusarium</i> sp4
T 3.3.2	<i>Fusarium</i> sp5
T 1.1.1	<i>Fusarium</i> sp6
M 7.6	<i>Trichoderma</i> sp1
M 6.4	<i>Trichoderma</i> sp2
M 6.12	<i>Trichoderma</i> sp3
M 8.1 A	<i>Mucor hiemalis</i>
T 6.2	<i>Aspergillus nigri</i> sect
T 5.1.1	<i>Aspergillus flavus</i> sect
<i>Thermomyces</i> sp T 4.2.1	<i>Paecilomyces</i> sp
M 4.10	<i>Absidia cylindrospora</i>
F 5.10	<i>Fusarium</i> sp P24
F 2.1.2	

4.2. Meio de manutenção (repiques periódicos).

Para manutenção das linhagens fúngicas foi utilizado o meio Sabouraud-dextrose-agar, constituído de (g/L): 10 de peptona, 40 de dextrose e 15 de agar.

4.3. Meios de cultura

Para a seleção e crescimento das cepas fúngicas foi utilizado o meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) (% em m/m): 0,1 peptona; 1,0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,0 KH_2PO_4 ; 0,05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 CaCl_2 ; 6,0 óleo de soja; 1,0 de emulsificante (goma arábica, Triton X-100 ou Tween 80); 0,5 de solução de elementos traços (2,2 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,1 de H_3BO_3 ; 0,5 de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16 de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,16 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,11 de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5,0 de EDTA); 3,0 de agar (microrganismos termofílicos) ou 2,0 de agar (microrganismos mesofílicos) e pH 6,0.

4.4. Testes da atividade lipolítica (zimograma)

O meio nutriente descrito em 4.3 foi acrescido de 0,001 % de Rodamina B e 0,4 % de NaCl. As placas contendo o meio foram demarcadas em quatro partes iguais com caneta heliográfica, sendo inoculadas em cada uma das partes, por meio de picada, uma cultura isolada. A incubação foi realizada a 28 e a 45°C para microrganismos mesofílicos e termofílicos respectivamente, durante 48 h, e a produção de lipase foi identificada por um halo laranja em torno das colônias visualizado por luz UV a 350 nm, indicando a presença da atividade lipolítica extracelular (CASTRO-OCHOA et al., 2005).

4.5. Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada em sacos de polipropileno (26,5 cm x 15 cm) contendo 5 g de bagaço de cana, farelo de soja, farelo de trigo ou semente de mamona moída. O pré-inóculo foi realizado a partir do cultivo dos fungos em erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL do meio citado no item 4.3. Para obtenção do inóculo, 100 mL de água foram adicionados aos frascos de cultivo dos fungos ressuspensando os esporos e micélios pela raspagem suave da superfície dos meios de cultivos. Os esporos suspensos ($9,0 \cdot 10^8$) foram quantificados e transferidos juntamente com a solução nutriente (2 % peptona, 0,2 % K_2HPO_4 , 0,05 % $MgSO_4$ e 2 % óleo de oliva) para os sacos de polipropileno para a obtenção de uma umidade de 70 %. A umidade foi obtida a partir da análise de peso seco dos substratos. O substrato foi incubado a 28 e a 45°C para fungos mesofílicos e termofílicos respectivamente e por tempos variados dependendo da produção de cada fungo. As amostras foram extraídas com 50 mL de água destilada para os ensaios enzimáticos, imobilização ou secagem por liofilização.

4.6. Proteína total

A determinação dos teores de proteínas totais da solução enzimática bruta e do biodiesel etílico foi realizada através do método de Bradford (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

4.7. Precipitação de proteínas

O extrato bruto enzimático foi precipitado com álcool comercial a -10°C em concentrações de 50, 67, 75 e 80 % sob repouso em câmara fria por 24 horas. O

precipitado foi separado por centrifugação (10.000·g por 20 minutos a 5°C) e ressuspenso em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0.

Os testes de atividade de lipase do sobrenadante e do precipitado foram realizados conforme descrito no item 4.9.1 e a quantificação de proteína total conforme descrito no item 4.6.

4.8. Concentração do extrato enzimático bruto

A concentração do extrato bruto foi realizada por ultrafiltração usando-se sistema QuixStand™ Benchtop da Amersham Bioscience com uma membrana de corte limite de 10 KDa em massa molecular.

4.9. Determinação de atividade enzimática

4.9.1. Atividade de lipase hidrolítica em substrato cromogênico

A atividade foi determinada conforme proposto por Krieger (1995) utilizando-se o *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) como substrato (Figura 5). Foram preparadas duas soluções: solução A :*p*-NPP em isopropanol na concentração de 3 mg/mL; solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L com pH 7,0. Em seguida 1 mL da solução A foi misturada com 9 mL da solução B lentamente sob contínua agitação. Em seguida 0,9 mL desta mistura foi incubada a 37 e a 45°C para microrganismos mesofílicos e termofílicos, respectivamente, durante 1 minuto, para equilibrar a temperatura. Então, 0,1 mL da solução enzimática foi adicionada e iniciada a cronometragem do tempo de reação (1 minuto). A absorbância foi lida em um espectrofotômetro UV-VIS Cary 100 Varian em comprimento de onda de 410 nm. Como referência utilizou-se como controle 0,9 mL da mistura (A + B) + 0,1 mL de água destilada.

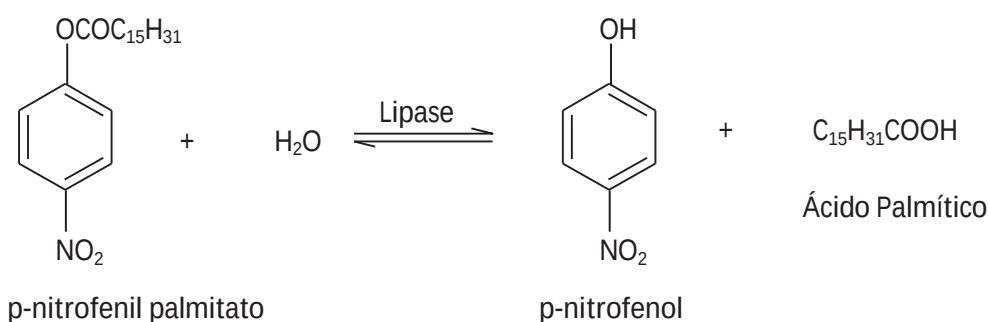


Figura 5: Representação esquemática da reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato catalisada por lipase.

Ao final do tempo de reação (1 minuto), 1 mL de solução de NaOH 0,1 M foi adicionado para paralisar a reação.

Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol de *p*-NP (*p*-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de absortividade molar do *p*-NP utilizado foi $8 \times 10^3 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$ (LIMA et al., 2004). Para o cálculo da atividade de hidrólise lipolítica seguiu-se a seguinte Equação 1:

$$\text{Atividade hidrolítica (U/g de substrato)}: \frac{(Abs_a - Abs_e) \cdot Va \cdot F}{8,03 \cdot 10^3 \cdot Ve \cdot t} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

Abs_a : absorbância da solução;

Abs_e : absorbância do extrato enzimático;

Va : volume da solução (1 mL);

F : fator de correção para fermentação sólida (quantidade de solução de extração em mL/quantidade de substrato em g);

Ve : volume de extrato enzimático (0,1 mL);

t : tempo de reação (1 min).

4.9.2. Atividade esterificante

O ensaio de esterificação foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Smaniotto (2010). Adicionou-se 0,1 g de extrato bruto liofilizado aos substratos reacionais (4,2 g de ácido oleico e 0,7 g de etanol) (Figura 6).

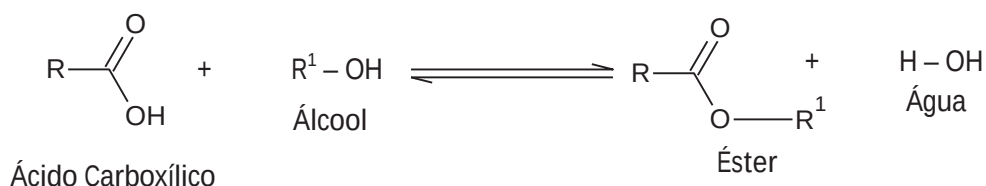


Figura 6: Representação esquemática da reação de esterificação.

A mistura foi incubada durante 40 minutos a 40°C sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, foram retiradas alíquotas (triplicata) de 500 µL e a reação foi interrompida com adição de 20 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona:etanol anidro. Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,035 mol/L. As dosagens de atividade lipásica de esterificação foi definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas, determinada por meio da Equação 2.

$$\text{Atividade de esterificação (U/g de extrato liofilizado)} = \frac{(Vb-Va).M.1000.Vt}{t.Val.m} \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

Va: volume de NaOH gasto na titulação da amostra

Vb: volume de NaOH gasto na titulação do branco

M: molaridade da solução de NaOH padronizada

Vt: volume reacional total (5,6 mL)

t: tempo de reação (40 min)

Val: volume da alíquota (0,5 mL)

m: massa de sólidos liofilizada (0,1 g).

4.9.3. Atividade de transesterificação

O ensaio padrão de transesterificação foi realizado através da metodologia modificada de Castro (2005), utilizando 4,1 mL de óleo de soja e 1,5 mL álcool etílico 99 %, na razão molar 1:6 (óleo/álcool) e 10 % de catalisador em relação ao meio reacional, totalizando 5,0 g de meio, sob agitação de 150 rpm. As reações foram realizadas a 37°C utilizando n-hexano como solvente da reação na proporção v/v 1:1,5 óleo/n-hexano. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e analisado por cromatografia gasosa (CG-FID).

4.10. Síntese de biodiesel

As reações de transesterificação para síntese de biodiesel foram realizadas em frascos de 50 mL em uma mini incubadora com agitador orbital a 150 rpm.

Foram estudados alguns fatores que interferem no rendimento do biodiesel, como temperatura, razão molar óleo:álcool, quantidade de catalisador, quantidade de solvente, através de um planejamento fatorial e a quantidade de água e irradiação de ultrassom utilizando as melhores condições obtidas no planejamento. Os níveis adotados para cada uma das variações são apresentados no item 4.12.

4.11. Imobilização da enzima

4.11.1. Alginato

As esferas de alginato de cálcio foram preparadas segundo Betiger et al. (2002), utilizando-se alginato de sódio 3 % e CaCl_2 0,05 M. As soluções de alginato, CaCl_2 e o extrato enzimático foram preparados em tampão fosfato 0,05 M pH 7. Uma mistura do polímero e do extrato foi realizada, sendo posteriormente gotejada na solução de CaCl_2 com o auxílio de uma bomba peristáltica. Após a formação das esferas, estas foram lavadas com água destilada para a remoção das enzimas não imobilizadas e secas à temperatura ambiente em dessecador com vácuo até que atingissem massa constante.

O cálculo do rendimento da imobilização foi realizado seguindo a Equação 3:

$$\text{Rendimento da imobilização (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde, A se refere à atividade do extrato enzimático que foi utilizado para a imobilização; B é a atividade do extrato enzimático após o tempo de imobilização; $A - B$ é a atividade da enzima teoricamente imobilizada (ROMDHANE et al., 2011).

4.11.2. Quitosana

A quitosana (0,18 g; 85 % desacetilada obtida da Polymar, Fortaleza - CE) foi solubilizada em 6 mL de ácido acético 1 % em volume e em seguida precipitada em solução de NaOH 1 M (12 mL) por gotejamento com auxílio de uma bomba peristáltica. A solução do meio ácido foi gotejada a uma altura de 1,5 cm na solução alcalina e mantida sob agitação suave (90 rpm) em agitador orbital por 24 horas à temperatura ambiente (CHIOU; WU, 2004). As microesferas gelificadas foram

lavadas com água destilada e submetidas à ativação com uma solução de 1 % de glutaraldeído por 1 hora a 90 rpm.

Depois de ativadas, as esferas foram lavadas com água destilada e adicionadas à 12 mL de solução enzimática. Nesta etapa, com duração de 4 horas a 4°C e agitação de 90 rpm, ocorre a ligação da enzima com o suporte. Em seguida, as esferas foram lavadas com água destilada para remoção de enzimas não imobilizadas e secas à temperatura ambiente em dessecador com vácuo até que atingissem massa constante. O cálculo do rendimento da imobilização também foi realizado segundo a Equação 3.

4.11.3 Imobilização de hifas utilizando substrato de crescimento como suporte

A imobilização de hifas foi realizada através da FES descrita no item 4.5 sem a etapa de extração da solução enzimática, utilizando bagaço de cana de açúcar, farelo de soja e farelo de trigo (triturados e homogeneizados em peneiras com abertura de 1 mm). Após 72 horas de fermentação a 28°C o fermentado sólido foi seco em um liofilizador Thermo Scientific RVT 4104 durante 48 horas.

4.12. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Neste trabalho, aplicou-se o DCCR 2⁴ na síntese de biodiesel utilizando-se a biomassa fúngica com as hifas do microrganismo *Fusarium sp* imobilizadas em farelo de trigo com 8 ensaios axiais e 7 repetições no ponto central, totalizando 31 ensaios, e otimização dos parâmetros temperatura, razão molar óleo:álcool, concentração de enzima e quantidade de solvente foram escolhidos como variáveis independentes, e o rendimento na produção de ésteres etílicos como variável

dependente. O planejamento fatorial foi criado e analisado pelo software Minitab® 16. A faixa experimental e os níveis das variáveis independentes para a produção de biodiesel são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores utilizados no DCCR para a produção de biodiesel.

Variáveis	Faixas e Níveis				
Independentes	-2	-1	0	1	2
Temperatura (°C)	25	31,2	37,5	43,7	50
Razão Molar (óleo:álcool)	1:3	1:4,5	1:6	1:7,5	1:9
Solvente (óleo:hexano)	0	1:0,5	1:1	1:1,5	1:2
Quantidade de enzima (%)	1,00	3,25	5,50	7,75	10,00

4.13. Síntese de biodiesel com irradiação de ultrassom

O processo de obtenção de biodiesel por catálise enzimática com irradiação de ultrassom foi conduzido em reator de vidro de aproximadamente 45 mL, provido de camisa de circulação de água termostatizada e agitação magnética. A temperatura do reator foi mantida através de um banho termostático.

Uma sonda ultrassônica “Sonic Dismembrator 50” (F50, Fisher Scientific com 50 watts de potência e 22 kHz de frequência) foi utilizada como fonte de irradiação de ultrassom. A potência do ultrassom foi ajustada em 10 % e irradiada durante 10 segundos em intervalos de 15 minutos. A mistura reacional foi composta de óleo de soja, etanol anidro, n-hexano e biomassa fúngica (farelo de trigo). A Figura 7 representa o esquema utilizado para o experimento.

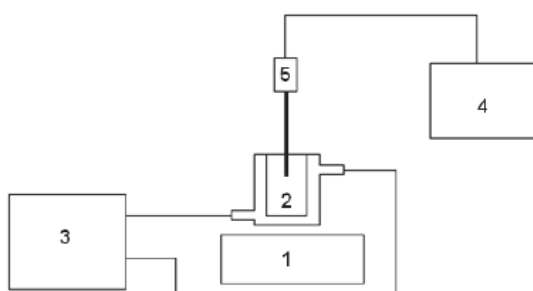


Figura 7: Esquema de reator para síntese de biodiesel etílico com irradiação de ultrassom utilizando sonda ultrassônica. (1) Agitador magnético, (2) reator de vidro, (3) banho térmico, (4) fonte de ultrassom e (5) sonda ultrassônica.

4.14. Quantificação dos ésteres etílicos

A quantificação dos ésteres etílicos foi realizada por cromatográfica gasosa utilizando detector de ionização de chama (GC-FID). 1 µL de cada amostra centrifugada e diluída foi injetado em um Cromatógrafo HP 5890 serie II e coluna SPB-35 (SUPELCO), usando o software Totalchrom (Perkin Elmer). A programação térmica foi de 160 a 180°C, mantendo uma taxa de aquecimento de 4°C por minuto, e de 180 a 235°C a 6°C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram iguais a 250°C, utilizando-se o gás nitrogênio como gás de arraste (split 1:30, pressão cabeça da coluna: 100 kPa).

A curva de calibração foi construída utilizando ésteres com pureza acima de 98 % (Sigma-Aldrich), como o linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de etila e estearato de etila. O calculou-se o rendimento das reações de sínteses segundo proposto por Urioste et al. (2008).

Para o cálculo do rendimento da síntese de biodiesel foi utilizada a Equação 5:

$$R (\%) = \frac{M_t}{M_e} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde Me é a massa teórica esperada de ésteres produzidos e Mt é a massa obtida dos ésteres, calculada de acordo com a curva de calibração feita com os padrões analíticos.

Para o cálculo do Me da Equação 5, foi necessário usar a Equação 6:

$$Me = \frac{Mo \times MMe}{MMA} \quad (\text{Equação 6})$$

E a Equação 7:

$$Mo = Ca \times Mi \quad (\text{Equação 7})$$

Onde Mo é a massa inicial dos ácidos graxos presente no óleo, MMA é a massa molecular de cada ácido graxo, MMe é a massa molecular de cada éster correspondente, Ca é a concentração de cada ácido graxo e Mi é a massa inicial de óleo.

Pelas Equações 6 e 7, os valores de Me e o Mo de cada ácido graxo foram calculados e somados para a obtenção da massa teórica esperada do óleo, em seguida aplicada na Equação 5 para o cálculo, em porcentagem, do rendimento da síntese de biodiesel. A concentração de cada ácido graxo presente no óleo foi obtida de acordo com a metodologia proposta por Lanças (1993).

Utilizando-se essas equações também foi possível calcular a massa de ésteres produzida por grama de óleo utilizada na reação (Equação 8):

$$g \text{ de éster} / g \text{ de óleo} = \frac{Mt}{Mi} \quad (\text{Equação 8})$$

4.15. Análise de estabilidade oxidativa

Para determinação da estabilidade oxidativa do biodiesel foram realizadas análises no equipamento Rancimat® à temperatura de 110°C e taxa de insuflação de

ar de 10 L/h. A oxidação foi induzida pela passagem de ar pela amostra, mantida à temperatura constante. Os produtos voláteis da reação difundidos no ar, foram coletados em água destilada e determinados pela mudança na condutividade elétrica desta. Tais compostos foram expressos através de uma curva na qual o período de indução pode ser calculado pela intersecção de duas linhas: a tangente de inclinação e a outra tangente nivelada à curva (FERRARI; SOUZA, 2009).

A estabilidade oxidativa do biodiesel esta diretamente ligada ao grau de insaturação e a posição das duplas ligações presentes na cadeia carbônica, ou seja, quanto maior o número de insaturações presentes na molécula, mais susceptível ela será a degradação tanto térmica quanto oxidativa, formando produtos insolúveis que podem se depositar e entupir os sistema de injeção de combustível do motor. O grau de insaturação de alquilésteres varia de acordo com a matéria prima utilizada na produção do biodiesel (LÔBO, et al., 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de microrganismos produtores de lipase

5.1.1. Teste de atividade lipolítica (Zimograma)

Os ácidos graxos são liberados pela hidrólise dos triacilglicerois presente no óleo utilizado como fonte de carbono no meio de cultura. A Rodamina B ao se complexar com os ácidos graxos produz uma coloração laranja fluorescente observada sob luz UV (MESSIAS et al, 2009). Este procedimento foi realizado para pré-selecionar linhagens fúngicas com atividade lipolítica.

Foram testadas 51 linhagens fúngicas, das quais 34 já possuíam seu gênero identificado. Apesar de na literatura consultada todos os fungos com gêneros identificados serem relatados como produtores de lípases, os zimogramas indicaram resultado divergente, sendo que os gêneros *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Absidia*, *Thermomyces* e *Aspergillus* apresentaram isolados nos quais não foi possível a identificação de produção de lipase pelo método utilizado. É conhecido que tanto a produção quanto o nível de expressão enzimática pode variar dentro das mesmas espécies, e também a produção varia em função das condições de fermentação, tais como o tipo de substrato, forma de fermentação, agitado ou estático, dentre outros.

A espécie *Cunninghamella verticillata* apresentou halo fluorescente no estudo realizado por Gopinath et al. (2002) utilizando-se Rodamina B como substrato e a espécie *Mucor hiemalis* também foi relatada como produtora de lipase apresentado halo fluorescente no estudo realizado por Alves et al. (2002).

Das 51 linhagens fúngicas testadas (32 mesofílicas e 19 termofílicas), foram selecionados 3 fungos termofílicos e 18 fungos mesofílicos produtores de lipase, totalizando 21 cepas pré-selecionadas (Tabela 4).

Tabela 4: Detecção de atividade lipolítica em placa de petri (zimograma).

Linhagens fúngicas termofílicas	Detecção de lipase	Linhagens fúngicas mesofílicas	Detecção de lipase
<i>Aspergillus</i> sp T 3.3.1	_____	<i>Cunninghamella</i> sp1 G01	_____
M 6.2	_____	<i>Cunninghamella</i> sp1 P08	_____
F 5.9	_____	<i>Cunninghamella</i> sp1 F19	_____
M 8.1 B	_____	<i>Cunninghamella</i> sp1 B18	_____
M 6.10	_____	<i>Cunninghamella</i> sp2 B16	_____
Esterco 2	_____	<i>Cunninghamella elegans</i> B06	_____
T 1.3	X	<i>Fusarium</i> sp1 F01	X
T 3.3.2	_____	<i>Fusarium</i> sp1 B02	X
T 1.1.1	_____	<i>Fusarium</i> sp1 B19	X
M 7.6	_____	<i>Fusarium</i> sp1 G24	X
M 6.4	_____	<i>Fusarium</i> sp2 B26	X
M 6.12	_____	<i>Fusarium</i> sp3 F25	_____
M 8.1 A	_____	<i>Fusarium</i> sp4 G02	X
T 6.2	X	<i>Fusarium</i> sp5 F13	_____
T 5.1.1	_____	<i>Fusarium</i> sp6 F10	_____
<i>Thermomyces</i> sp T 4.2.1	_____	<i>Trichoderma</i> sp1 G03	X
M 4.10	_____	<i>Trichoderma</i> sp1 G06	X
F 5.10	_____	<i>Trichoderma</i> sp1 G28	X
F 2.1.2	X	<i>Trichoderma</i> sp1 P20	X
		<i>Trichoderma</i> sp2 G17	X
		<i>Trichoderma</i> sp3 G22	X
		<i>Mucor hiemalis</i> P03	_____
		<i>Mucor hiemalis</i> B22	_____
		<i>Aspergillus nigri</i> sect G08	X
		<i>Aspergillus nigri</i> sect B21	X
		<i>Aspergillus flavus</i> sect B20	X
		<i>Aspergillus flavus</i> sect G25	X
		<i>Aspergillus flavus</i> sect P22	X
		<i>Paecilomyces</i> sp P07	_____
		<i>Absidia cylindrospora</i> P18	_____
		<i>Absidia cylindrospora</i> F27	_____
		<i>Fusarium</i> sp P24	X

X: Presença de halo laranja fluorescente

Na Figura 8 é possível observar os halos dos respectivos fungos mesofílicos produtores de lípases correspondentes às espécies *Fusarium* sp1, *Fusarium* sp2, *Fusarium* sp4, *Trichoderma* sp1, *Trichoderma* sp2, *Trichoderma* sp3, *Aspergillus nigri* sect, *Aspergillus flavus* sect e *Fusarium* sp. Os halos produzidos pelas cepas fúngicas de *Fusarium* sp P24 e *Trichoderma* sp2 G17 apresentaram-se maiores que os halos produzidos pelas demais cepas, sendo espécies de *Acremonium* conhecidas por produzir várias enzimas hidrolíticas (OKEKE; OKOLO, 1990).

O resultado do fungo *Fusarium* sp apresentar um dos maiores halos contraria relatos divulgados por Otero et al (2005), que em seu estudo sobre a ação hidrolítica de lípases não comerciais obtiveram uma das menores atividades hidrolítica para este gênero de fungo, tendo com um dos melhores produtores o fungo *Fusarium oxysporum*. Nwuche e Ogbonna (2011) obtiveram em seus estudos o gênero *Trichoderma* como um dos melhores produtores de lipase com atividade hidrolítica. Venkatesagowda et al. (2012) também relataram a produção de enzimas com atividade lipolítica por fungo dos gêneros *Fusarium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* isolados a partir de semente de plantas oleaginosas. Tais relatos corroboram a constatação, em relação à produção de enzima microbiana, que há uma grande variabilidade quanto à produção dos diferentes microrganismos em estudo, e cada caso é um caso diferente.

Os fungos termofílicos não apresentaram produção de lípases significativa em relação aos fungos mesofílicos. Foram selecionadas as linhagens fúngicas termofílicas F 2.1.2, T 6.2 e T 1.3 para posterior estudo de identificação, as quais apresentaram pequenos halos fluorescentes (Figura 9).

As linhagens fúngicas que não apresentaram o halo fluorescente foram estocadas para posteriores estudos do grupo de pesquisa. Cumpre informar que

algumas cepas não usadas neste projeto, já foram testadas quanto sua atividade de transesterificação e dentre elas, o microrganismo *Mucor hiemalis* apresentou lipase com potencial para produção de biodiesel.

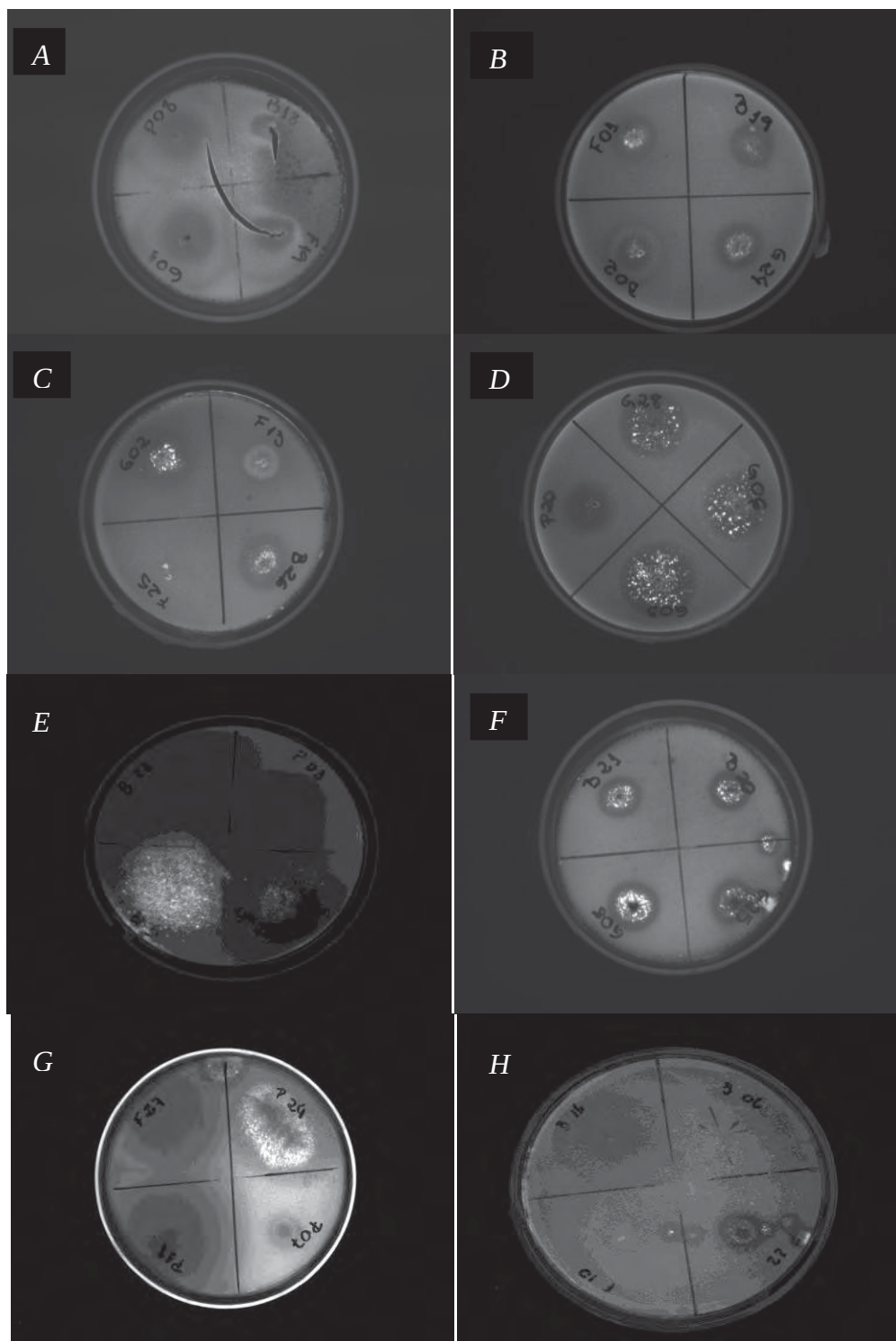


Figura 8: Detecção de atividade lipolítica de enzimas de fungos mesofílicos em placa de Petri: A) *Cunninghamella* sp1 G01, *Cunninghamella* sp1 P08, *Cunninghamella* sp1 F19, *Cunninghamella* sp1 B18; B) *Fusarium* sp1 F01, *Fusarium* sp1 B02, *Fusarium* sp1 B19, *Fusarium* sp1 G24; C) *Fusarium* sp2 B26, *Fusarium* sp3 F25, *Fusarium* sp4 G02, *Fusarium* sp5 F13; D) *Trichoderma* sp1 G03, *Trichoderma* sp1 G06, *Trichoderma* sp1 G28, *Trichoderma* sp1 P20; E) *Trichoderma* sp2 G17, *Trichoderma* sp3 G22, *Mucor hiemalis* P03, *Mucor hiemalis* B22; F) *Aspergillus nigri* sect G08, *Aspergillus nigri* sect B21, *Aspergillus flavus* sect B20, *Aspergillus flavus* sect G25; G) *Paecilomyces* sp P07, *Absidia cylindrospora* P18, *Absidia cylindrospora* F27, *Fusarium* sp P24; H) *Cunninghamella elegans* B06, *Cunninghamella* sp2 B16, *Fusarium* sp6 F10, *Aspergillus flavus* sect P22.

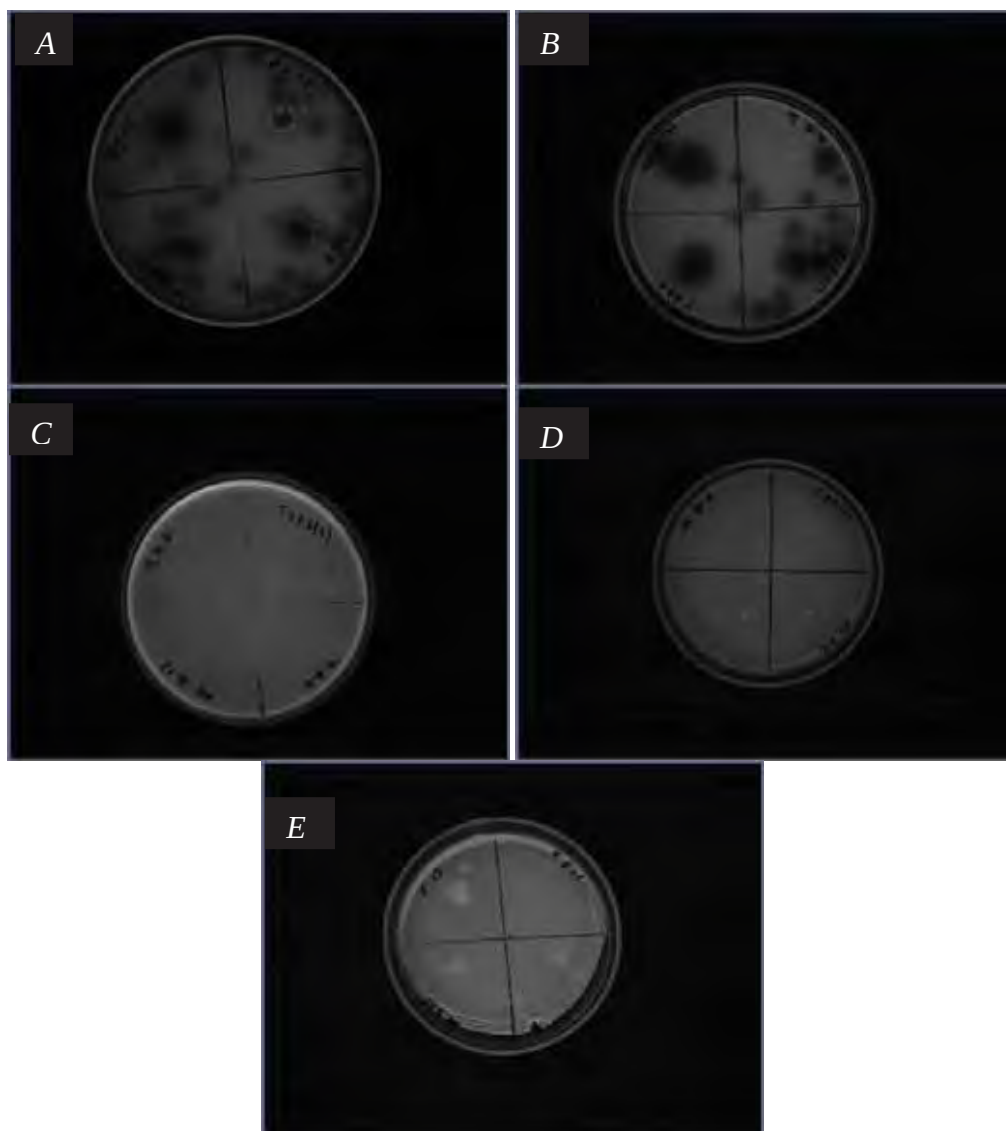


Figura 9: Detecção de atividade lipolítica de enzimas de fungos termofílicos em placa de Petri: A) F2.1.2, T 6.2, T 5.1.1, F 5.10; B) T 1.3, T 3.3.2, Esterco 2, M 6.10; C) M 6.12, M 7.6, M 6.4, T 1.1.1; D) M 8.1.B, F 5.9, M 6.2; E) *Aspergillus sp* T 3.3.1, M 8.1.A, M 4.10, *Thermomyces sp* T 4.2.1.

Uma linhagem fúngica de cada espécie pré-selecionada dos fungos mesofílicos e as três linhagens termofílicas selecionadas foram submetidas à fermentação em estado sólido (FES) para posterior teste de suas enzimas com substrato cromogênico para comprovação da atividade lipolítica e quantificação da atividade hidrolítica.

5.1.2. Atividade hidrolítica de lipase em substrato cromogênico

O método em substrato cromogênico baseia-se na reação de hidrólise do *p*-NPP (*p*-nitrofenil palmitato), produzindo o *p*-NP (*p*-nitrofenol) e o ácido palmítico. O produto desta reação, o *p*-NP, produz uma cor característica amarelada, podendo ser quantificado por luz visível, sendo possível calcular a atividade hidrolítica da enzima.

As linhagens fúngicas pré-selecionadas foram pré-inoculadas em meio sólido inclinado durante o tempo necessário para a esporulação de cada uma. Em seguida foram inoculadas bagaço de cana durante 72 horas para extração de suas enzimas e verificação da atividade hidrolítica das mesmas.

Das 21 linhagens fúngicas pré-selecionadas, apenas o extrato bruto enzimático de nove cepas mesofílicas (uma linhagem de cada espécie de fungos mesofílicos escolhidas pelo tamanho do halo) e as 3 linhagens termofílicas foram testados para comprovação da atividade lipolítica e sua quantificação. Na Tabela 5 estão relacionadas as linhagens fúngicas testadas e as respectivas atividades hidrolíticas de suas enzimas.

Tabela 5: Relação de linhagens fúngicas testadas em substrato cromogênico e atividades hidrolíticas de suas enzimas.

Linhagens fúngicas termofílicas	Atividade hidrolítica (U/g)	Linhagens fúngicas mesofílicas	Atividade hidrolítica (U/g)
F 2.1.2	3,16 ± 0,03	<i>Fusarium</i> sp1 F01	9,03 ± 0,39
T 6.2	1,41 ± 0,01	<i>Fusarium</i> sp2 B26	5,80 ± 1,05
T 1.3	2,49 ± 0,29	<i>Fusarium</i> sp4 G02	3,29 ± 0,21
		<i>Trichoderma</i> sp1 G03	7,49 ± 0,03
		<i>Trichoderma</i> sp2 G17	6,62 ± 0,32
		<i>Trichoderma</i> sp3 G22	3,12 ± 0,20
		<i>Aspergillus nigri</i> sect G08	2,15 ± 0,08
		<i>Aspergillus flavus</i> sect B20	18,6 ± 0,80
		<i>Fusarium</i> sp P24	7,57 ± 0,24

Conforme os resultados encontrados verificou-se que todas as linhagens fúngicas testadas apresentaram atividade hidrolítica confirmando o resultado em placa do teste com corante Rodamina B. A baixa produção de lípases pelos fungos termofílicos também foi confirmada neste teste, sendo a atividade hidrolítica entre 1,41 e 3,16 U/g.

A maior atividade hidrolítica observada para as linhagens fúngicas termofílicas (F 2.1.2) representou apenas 17 % do valor encontrado para a maior atividade hidrolítica das linhagens fúngicas mesofílicas (*Aspergillus flavus* sect B20).

O extrato enzimático bruto que apresentou melhor atividade hidrolítica foi da linhagem fúngica *Aspergillus flavus* sect B20, contrariando o resultado obtido nos zimogramas, que apontava como melhores produtores as cepas fúngicas *Fusarium* sp P24 e *Trichoderma* sp2 G17. Estas cepas apresentaram atividades de 42 e 36 % respectivamente em relação à cepa de *Aspergillus flavus* sect B20. As cepas fúngicas de *Fusarium* sp1 F01, *Fusarium* sp2 B26 e *Trichoderma* sp1 G03 também mostraram atividade hidrolítica intermediárias em relação à melhor cepa (51, 32 e 41 %, respectivamente). As cepas *Fusarium* sp4 G02, *Trichoderma* sp3 G22 e *Aspergillus nigri* sect G08 apresentaram baixa atividade em relação ao *Aspergillus flavus* sect B20 (18, 17 e 12 %, respectivamente), essas linhagens fúngicas apresentaram atividades hidrolítica tão baixas quanto às atividades dos fungos termofílicos avaliados.

A variação do valor da atividade hidrolítica de cepas fúngicas do mesmo gênero novamente pode esta atribuída ao fato de serem cepas de espécies diferentes como ocorre no caso do *Aspergillus nigri* sect e *Aspergillus flavus* sect.

Aspergillus flavus já foi relacionado como produtor de lipase utilizando-se fermentação submersa e apresentou atividade hidrolítica de 7 U/g de substrato

quando cultivado por fermentação em estado sólido (PAU; OMAR, 2004). Neste trabalho a linhagem fúngica *Aspergillus flavus* sect B20 cultivada por fermentação em estado sólido apresentou atividade hidrolítica de 18,6 U/g.

Esse teste mostrou que os zimogramas utilizando a Rodamina B como corante foram eficientes para pré-seleção de linhagens fúngicas produtoras de lipase, confirmando a atividade hidrolítica das cepas pré-selecionadas. Porém a atividade hidrolítica das enzimas não pode ser comparada à atividade de síntese, devido ao fato das propriedades físico-químicas dos solventes terem um grande impacto sobre a estrutura da enzima, atividade enzimática e especificidade do substrato (GOUJARD et al, 2009).

5.1.3. Atividade de lipase de transesterificação

As linhagens fúngicas pré-selecionadas foram submetidas a uma nova seleção pra se verificar a atividade de transesterificação. Os extratos enzimáticos brutos destas linhagens foram liofilizados e utilizados na forma de enzima livre na síntese de ésteres.

Os produtos obtidos destas sínteses foram evaporados a pressão reduzida para a retirada do n-hexano utilizado como solvente e analisados por GC-FID. Os cromatogramas obtidos foram comparados aos cromatogramas do óleo de soja e dos padrões ésteres palmitato, oleato, linoleato e linolenato de etila para a verificação da produção deste ésteres durante a síntese (Figura 10).

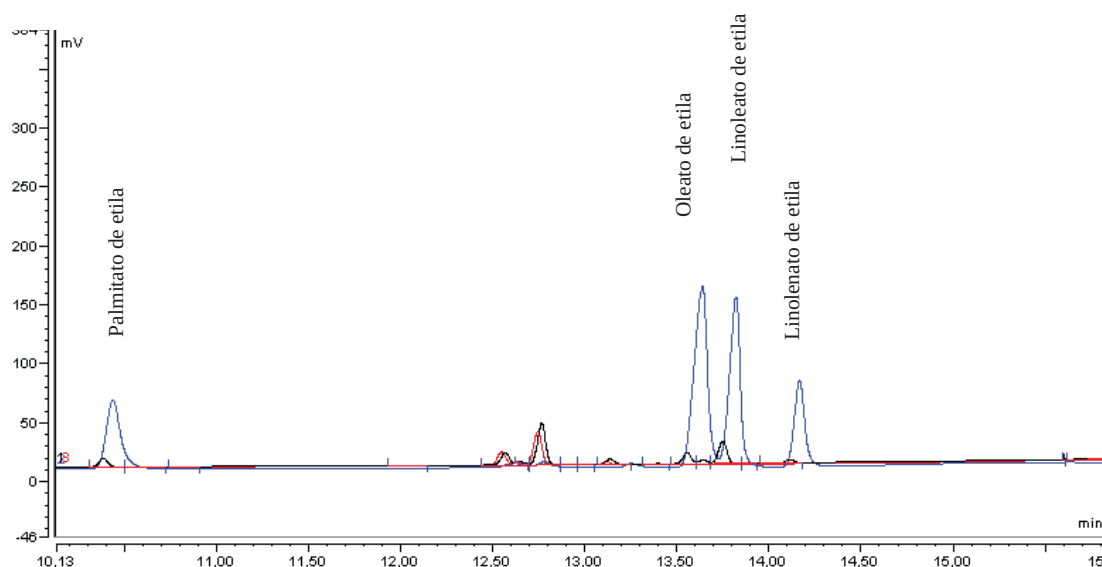


Figura 10: Cromatogramas dos padrões palmitato, linoleato, linolenato e oleato de etila (azul), da síntese realizada com enzimas livres da linhagem fúngica *Fusarium sp* P24 (preto) e do óleo de soja (vermelho).

Os ácidos palmítico, oléico, linolênico, linoléico são os mais representativos na composição do óleo de soja, formando os ésteres palmitato, oleato, linoleato e linolenato de etila na síntese do biodiesel etílico. Porém os ésteres oleato, linoleato e linolenato de etila possuem em suas cadeias 18 carbonos, sendo diferenciados apenas pelo número de insaturações. Portanto o tempo de retenção desses ésteres são muito próximos na coluna cromatográfica utilizada, dificultando a identificação destes nas sínteses, que também possuem reagentes não consumidos na reação.

Das linhagens fúngicas testadas apenas a enzima produzida pelo fungo *Fusarium sp* P24 apresentou atividade de transesterificação (Tabela 6), nas condições utilizadas para análise. A atividade enzimática em síntese orgânica pelo fungo *Achremonium murorum* foi relatada pela primeira vez por Cardenas et al. (2001), que também relatou as espécies *Fusarium poae*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, como produtoras de lipase com atividade de esterificação em meio orgânico.

O uso da enzima livre nas reações de transesterificação pode ter dificultado a síntese dos ésteres pelas lipases das outras linhagens testadas, uma vez que as proteínas podem ser sensíveis ao solvente e mesmo ao etanol utilizado na reação como reagente.

Poucas lipases encontradas na natureza mostram-se capazes de uma eficiente síntese de biodiesel e somente algumas delas são capazes de catalisar a reação em sistemas com solvente orgânico. A maioria das enzimas utilizadas são preparações de enzimas comerciais (ANTCZAK et al., 2009).

Diante dos resultados obtidos no ensaio de transesterificação, a linhagem do *Fusarium sp* P24 foi, portanto, escolhida para dar continuidade ao trabalho.

Tabela 6: Relação de linhagens fúngicas testadas quanto à atividade de transesterificação.

Linhagens fúngica termofílicas	Atividade de transesterificação	Linhagens fúngicas mesofílicas	Atividade de transesterificação
F 2.1.2	ND	<i>Fusarium</i> sp1 F01	ND
T 6.2	ND	<i>Fusarium</i> sp2 B26	ND
T 1.3	ND	<i>Fusarium</i> sp4 G02	ND
		<i>Trichoderma</i> sp1 G03	ND
		<i>Trichoderma</i> sp2 G17	ND
		<i>Trichoderma</i> sp3 G22	ND
		<i>Aspergillus nigri</i> sect G08	ND
		<i>Aspergillus flavus</i> sect B20	ND
		<i>Fusarium sp</i> P24	DC

ND: não detectável nas condições. DC: detectado pelo cromatograma

5.2. Produção enzimática do fungo *Fusarium sp* P24 em diferentes fontes de carbono

A cepa fúngica *Fusarium sp* P24, selecionada com produtora de lipase com atividade transesterificante, foi submetida novamente à fermentação em estado

sólido (FES) utilizando-se substratos diferentes como fonte de carbono para verificar o efeito do meio de cultivo sobre a produção de lipase.

A cepa fúngica foi cultivada durante 72 horas utilizando-se bagaço de cana de açúcar, farelo de soja, farelo de trigo e semente de mamona moída como fonte de carbono. As fermentações foram realizadas em repetições para verificar a repetitividade dos eventos. A atividade enzimática hidrolítica foi avaliada de acordo com a metodologia 4.9.1., por ser o método mais rápido de quantificação.

A Figura 11 mostra que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas pela lipase produzida em bagaço de cana de açúcar e em farelo de soja atingindo a 9,3 e 6,9 U/g de substrato, respectivamente. O dado obtido de que o extrato enzimático produzido pela fermentação em bagaço de cana de açúcar ter apresentado o melhor resultado foi inusitado. Era esperado que fontes de carbono com maior quantidade de lípidios estimulassem a produção de lipase.

Uma explicação pode estar associado ao fato da linhagem fúngica ter utilizado o bagaço de cana como um suporte mais eficiente para seu crescimento, melhorando assim a produção enzimática. Por sua vez o extrato enzimático produzido pela fermentação em semente de mamona apresentou a menor atividade enzimática (0,5 U/g), mostrando que fontes de carbono com alto teor de lípidios não teve muita influência sobre a atividade enzimática. Silva et al. (2011) apresentaram ótimos resultados em relação a atividade hidrolítica do fungo *Penicillium brevicompactum* cultivado em farelo de mamona, comparado à atividade obtida no cultivo em torta de babaçu, a cepa fúngica utilizada mostrou maior eficiência quando cultivada em farelo de mamona, que apresentou maior teor de lípidios em sua composição.

Kamini et al. (1998) estudaram o efeito de vários substratos na fermentação em estado sólido do fungo *Aspergillus niger*. Entre os substratos utilizados, encontram-se farelo de trigo, semente de mamona e bagaço de cana. O extrato bruto enzimático obtido a partir do farelo de trigo fermentado durante 96 horas apresentou melhor atividade hidrolítica (65,9 U/g) entre esses três substratos, enquanto o extrato bruto enzimático produzido a partir de bagaço de cana obteve apenas 3,7 U/g com 96 horas de fermentação. O extrato bruto enzimático produzido a partir de farelo de trigo, apesar de atingir uma atividade 52,6 U/g em 72 horas de fermentação, apresentou somente 25,6 U/g em 96 horas.

Falony et al (2006) relataram em seus estudos uma das maiores atividades enzimáticas encontradas na literatura para o fungo *Aspergillus niger* fermentado em farelo de trigo. Não houve relatos do fungo *Acremonium*, entretanto neste projeto o extrato bruto enzimático do isolado *Fusarium sp* P24 produzido a partir do substrato de farelo de trigo apresentou apenas 1,8 U/g de substrato.

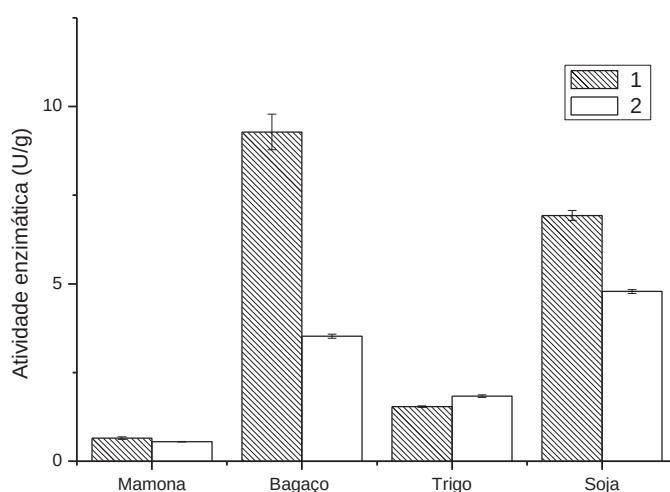


Figura 11: Atividade enzimática hidrolítica em função do substrato sólido utilizado na fermentação em estado sólido (foram realizadas repetições (1 e 2) para verificar a reprodutibilidade dos eventos)

Experimentos posteriores em que foi novamente utilizado os bagaço de cana de açúcar e farelo de soja apresentaram resultados de atividades enzimáticas muito próximas. Portanto alguns dos experimentos de produção enzimática foram realizados empregando o bagaço de cana e o farelo de soja.

5.3. Produção enzimática do fungo *Fusarium sp* P24 em função do tempo

Para a verificação da atividade enzimática em função do tempo, a linhagem fúngica selecionada foi submetida a fermentação sólida em bagaço de cana e em farelo de soja durante 216 horas, fazendo-se extração enzimática a cada 24 horas.

A fermentação em sacos de polipropileno, foi realizada a partir da inoculação de $1,8 \cdot 10^8$ esporos/g de bagaço de cana de açúcar e foram realizados dois experimentos independentes para cada substrato, sendo os resultados expressos como média das triplicatas das análises. A determinação da atividade hidrolítica dos extratos brutos enzimáticos em função do tempo foram analisados conforme descrito o item 4.9.1.

Conforme mostra a Figura 12, em 72 horas de fermentação em bagaço de cana, a linhagem fúngica atingiu o máximo de sua atividade enzimática igual a 20,2 U/g.

Não foi possível produzir a curva de crescimento microbiano do *Fusarium sp* P24 devido a dificuldade de obter a biomassa produzida por fermentação sólida, porém de acordo com observação visual do aumento de micelio e esporulação ao longo dos experimentos, é possível supor que a produção enzimática começou durante a fase de crescimento exponencial e se estendeu até a fase estacionária (72 horas) podendo então, inferir que a produção enzimática estava associada à fase log de crescimento. Nesta fase, as células microbianas geralmente encontram-se mais

viáveis, sendo utilizadas para estudos enzimáticos (MADIGAN et al, 2004). Após as 72 horas, a produção enzimática começa a cair, e após 120 horas de fermentação a atividade estabilizou em níveis próximos a 5 U/g. Portanto, para os próximos procedimentos a fermentação em bagaço de cana de açúcar do fungo *Fusarium sp* será realizada somente durante 72 horas. Kamini et al. (1998) estudando a curva de crescimento do fungo *Aspergillus Níger* também apresentou maior atividade hidrolítica após 72 horas de fermentação em torta de gengibre.

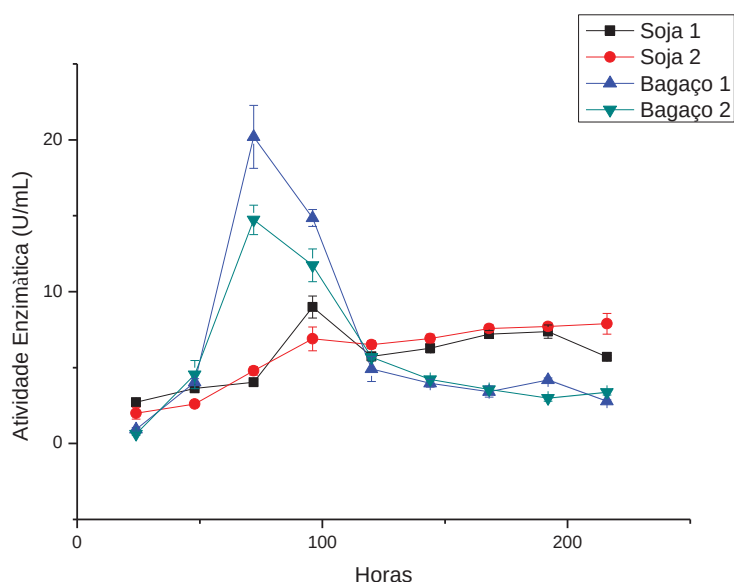


Figura 12: Atividade enzimática hidrolítica em função do tempo de fermentação em bagaço de cana de açúcar e em farelo de soja, pela linhagem fúngica *Fusarium sp* P24 (1 e 2 representam repetições dos experimentos).

A fermentação da linhagem P24 em farelo de soja apresentou um perfil um pouco diferente do obtido em bagaço de cana. É possível observar que a produção de lipase em farelo de soja segue um padrão diferente do apresentado durante a fermentação com bagaço de cana, e o pico de produção enzimática ocorre em 96 horas de cultivo, atingindo atividade de 9 U/g. Após esse pico a atividade cai e se mantém em torno de 7 U/g até 216 horas.

Dantas e Aquino (2010) mostraram diferentes perfis de produção enzimática do fungo *Aspergillus niger* fermentado em torta de mamona, torta de babaçu, sementes de abóbora, casca de abacate e borra de café e constataram que o tempo de fermentação variava significativamente com o tipo de substrato utilizado. Coradi et al. (2009) também mostraram esta variação no tempo de fermentação para os microrganismos dos gêneros *Trichoderma* sp e *Fusarium* sp fermentados em torta de mamona, torta de cana-de-açúcar, tortas de mamona e mandioca (proporção 1:2), torta de mamona e palha de milho (proporção 1:2) e tortas de mamona e cana-de-açúcar (proporção 1:2).

5.4. Concentração e Precipitação de Proteínas produzidas pelo fungo *Fusarium* sp P24

Após a determinação do tempo de cultivo o fungo *Fusarium* sp P24, foi cultivado durante 72 horas em bagaço de cana e 96 horas em farelo de soja para a produção de 1 L de extrato enzimático bruto em cada fermentação. Os extratos enzimáticos brutos foram concentrados 10 vezes por ultrafiltração utilizando-se o sistema QuixStand™ Benchtop e as atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com o item 4.9.1.

A Figura 13 mostra a atividade hidrolítica dos estratos enzimáticos brutos após a concentração (58,9 U/g, bagaço de cana e 19,4 U/g, farelo de soja) e dos descartes das filtrações (para a verificação da eficiência do método). Como pode ser observado, os descartes das filtrações apresentaram atividade enzimática desprezível, confirmando a eficiência do método.

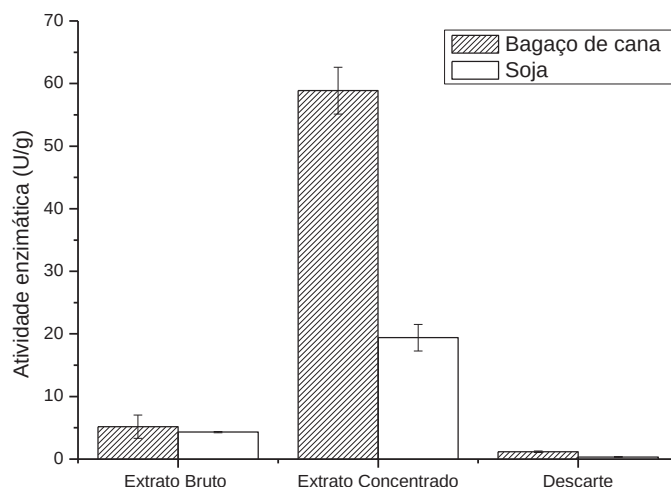


Figura 13: Atividade hidrolítica das enzimas produzidas pelo fungo *Fusarium sp* P24 do extrato bruto, do extrato concentração e do resíduo da ultrafiltração.

A concentração do extrato enzimático bruto produzido a partir do fermentado de bagaço de cana de açúcar aumentou a atividade hidrolítica em 11,3 vezes, passando de 5,2 para 58,9 U/g. Já a concentração do extrato bruto produzido a partir do fermentado de farelo de soja teve um pequeno aumento de 4,5 vezes, passando de 4,3 para 19,4 U/g, esta atividade representa apenas 33 % da atividade obtida pelo extrato concentrado produzido pelo bagaço de cana.

A precipitação de proteínas foi realizada apenas para o extrato enzimático produzido por fermentação em bagaço de cana de açúcar, uma vez que este apresentou uma atividade muito maior do que o extrato produzido pela fermentação em farelo de soja.

O extrato enzimático bruto fermentado em cana de açúcar foi precipitado em álcool para concentrar as enzimas. A concentração foi acompanhada determinando-se atividade específica hidrolítica (U/ μ g proteína) e proteína total. Há vários métodos de precipitação de enzima, como a utilização de sais, mudanças de temperatura e pH, e utilização de solventes orgânicos. O último método foi escolhido para as

precipitações realizadas neste projeto, levando-se em consideração a presença de óleo no extrato bruto enzimático, o qual seria eliminado neste procedimento.

Na Tabela 7 é possível observar que a melhor concentração de álcool para precipitar a enzima foi de 50 %, com fator de purificação de 2,15 e atividade específica de 343 U/μg. Porém o fator de purificação apresentou-se muito baixo em relação aos fatores observado por Ferrarezi (2010) e Ohe (2011), que obtiveram fatores de purificação de 13,37 para as enzimas produzidas pelo microrganismo *Thermomucor indicae-seudaticae* e 71,0 por *Thermomyces lanuginosus* TO-05 respectivamente.

O melhor rendimento foi obtido utilizando-se etanol 80 %, porém não houve diferença significativa em relação às precipitações realizadas com etanol 50 %, sendo a atividade específica maior nesta concentração.

Tabela 7: Precipitação do extrato bruto enzimático produzido por *Fusarium sp.* P24 em 72 horas de fermentação em estado sólido.

Concentração de etanol (%)	Proteína total (μg)	Atividade hidrolítica total (U)	Atividade específica (U/μg)	Fator de purificação	Rendimento
0 (Extrato bruto)	0,033	5,20	159	1,00	100
50	0,004	1,22	343	2,15	23,2
67	0,004	1,10	281	1,76	20,9
75	0,005	1,25	266	0,78	23,7
80	0,007	1,33	186	1,17	25,3

5.5. Temperatura ótima de atividade hidrolítica enzimática do fungo *Fusarium sp* P24

Após a concentração do extrato bruto produzido a partir do fermentado em cana de açúcar, foi realizado um estudo da temperatura ótima de atuação da lipase produzida pela cepa *Fusarium sp* P24.

Como pode ser visto na Figura 14, a atividade enzimática hidrolítica da lipase foi analisada de 20 a 60°C, atingindo seu máximo em 35°C (100 %), o que era esperado para um microrganismo mesofílico. Porém estas estenderam suas atividades até 50°C (80 %), caracterizando ação em ampla faixa de temperatura, tornado possível seu uso em temperaturas moderadas. Após 50°C a atividade hidrolítica caiu drasticamente chegando a 13 U/g, mostrando que estas enzimas são sensíveis a temperaturas mais altas.

A lipase produzida por *Aspergillus niger* (KAMINI, et al., 1998) também apresentou temperatura ótima de atuação em 35°C, porém ela não manteve uma atividade enzimática razoável a temperaturas mais altas, caindo drasticamente em 45°C, enquanto no estudo realizado por Falony (2006) esta mesma espécie de fungo apresentou atividades ótimas na faixa de temperatura de 40 a 70°C. Já a lipase termoestável produzida pelo fungo *Penicillium simplicissimum* obteve sua maior atividade a 50°C, mantendo uma boa faixa de atuação de 45 a 55°C (GUTARRA, et al., 2009).

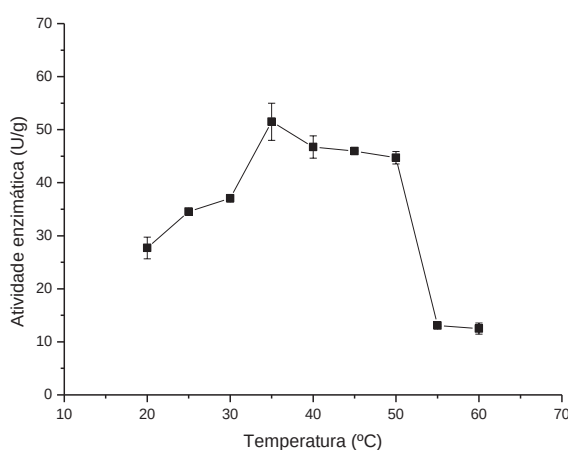


Figura 14: Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase produzida pelo fungo *Acremonium* sp P24.

5.6. Atividade de Esterificação de lipase produzida pelo fungo *Fusarium sp* P24

Para medir a atividade de esterificação da lipase produzida por *Fusarium sp* P24 cultivado em bagaço de cana de açúcar, o extrato enzimático foi liofilizado e utilizado na forma de enzima livre na reação entre o ácido oléico e o etanol anidro.

A lipase apresentou atividade enzimática esterificante de $79,8 \pm 16,8$ U/g, porém a determinação da atividade de esterificação apresentou um grande desvio padrão, indicando alta variabilidade dos experimentos. Uma das prováveis explicações se relaciona ao acúmulo de ácido graxo na ponte salina do eletrodo, dificultando a mobilidade iônica do sistema. Entretanto, através desse método foi possível comprovar a presença de lipase com atividade de esterificação, já que o fato da cepa fúngica produzir enzimas com atividade hidrolítica, não necessariamente indica que ela produzirá enzimas com atividade de esterificação e de transesterificação.

Silva et al. (2011), utilizando a mesma metodologia usada neste projeto, obtiveram em torno de 244 U/g de atividade de esterificação para a lipase produzida pelo fungo *Penicillium brevicompactum*.

Carvalho et al. (2005) estudando a atividade hidrolítica e de esterificação dos fungos *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium solitum*, mostraram que todas as cepas apesar de apresentarem uma ótima atividade de hidrólise, não apresentaram altas taxas de conversão em éster durante a reação de esterificação, obtendo no máximo 20 % de conversão. Porém Ferraz et al. (2006) utilizando preparações comerciais de *Pseudomonas sp*, *Mucor javanicus*, *Pancreática do porco* e *Cândida rugosa* alcançaram conversões de 77 % de ácido láurico em laurato de propila usando as enzimas de *Pseudomonas sp*.

5.7. Imobilização da lipase do fungo *Fusarium sp* P24

A enzima concentrada foi imobilizada em alginato e em quitosana conforme procedimento descrito nos itens 4.11.1 e 4.11.2. A imobilização em quitosana apresentou um rendimento de 96,6 %, imobilizando quase toda a enzima presente no extrato enzimático, já a imobilização em alginato não foi tão eficiente, apresentando um rendimento de 70,7 %. A Figura 15 mostra a atividade hidrolítica do extrato enzimático concentrado antes da imobilização (58,9 U/g) e após a imobilização em quitosana (2,0 U/g) e em alginato (17,3 U/g).

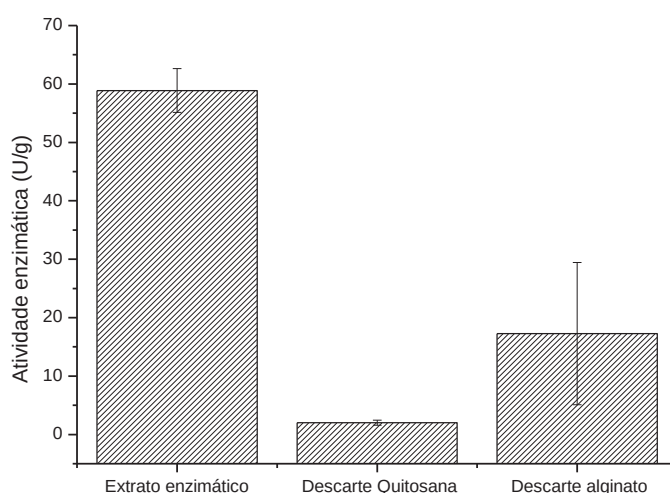


Figura 15: Atividade hidrolítica das enzimas produzidas pelo fungo *Fusarium sp* P24 presente no extrato bruto antes da imobilização e depois da imobilização em quitosana e em alginato.

Entretanto estas enzimas após imobilização não apresentaram atividade hidrolítica no meio reacional descrito em 4.9.1. Ao invés de se observar a coloração amarela característica da formação de *p*-nitrofenol em solução, notou-se que a mistura ficou esbranquiçada, impossibilitando a quantificação da atividade hidrolítica pelo método espectrofotométrico. Tal resultado pode indicar que os suportes ou não

foram suficientemente estáveis ou interferiram diretamente com o resultado da análise enzimática empregado.

Da mesma forma também não foi possível avaliar a atividade enzimática de transesterificação nas condições utilizadas no GC-FID, impossibilitando o uso desses suportes na continuidade do projeto. As reações de transesterificação foram realizadas e quantificadas de acordo com os itens 4.9.3. e 4.14.

Uma das possíveis explicações para a baixa atividade da enzima produzida pela cepa fúngica P24 imobilizada em quitosana são os impedimentos estéricos causados pela interação entre o glutaraldeído e a proteína, evitando o deslocamento da tampa existente na conformação da lipase e consequentemente reduzindo sua ação catalítica (ROMDHANE, 2011).

Utilizando-se o alginato de sódio, a imobilização da proteína é realizada por encapsulamento, o que pode ter dificultado a interação de moléculas grandes, como triglicerídeos, com o sítio ativo da enzima.

Também foi realizada a imobilização das hifas da cepa fúngica *Fusarium sp* P24, utilizando-se como suporte os substratos sólidos das fermentações. Foram utilizados como suporte o bagaço de cana de açúcar, o farelo de soja e o farelo de trigo.

Ao contrário da lipase imobilizada em suporte polimérico, o uso da hifa imobilizada na reação teve produção de biodiesel significativa, isso pode ter ocorrido porque a utilização da hifa possibilitou o uso de todas as lipases presentes na membrana do microrganismo, diferente do que ocorre quando se extrai as enzimas extracelulares.

Ban et al. (2001) obtiveram rendimentos de até 90 % de metanólise com óleo de oliva utilizando cepas de *Rhizopus oryzae* imobilizadas em poliuretana, mostrando que esse tipo de imobilização é muito promissor. Tamalampudi et al. (2008) também estudaram a atividade de esterificação de cepas de *Rhizopus oryzae* imobilizadas em poliuretana e mostraram que a conversão do óleo de jatropa em ésteres foi maior utilizando-se a cepas imobilizadas do que a conversão em ésteres utilizando-se a enzima 435 da Novozym.

O uso da hifa imobilizada tem várias vantagens em relação à outros métodos, em termos de aplicação industrial, uma vez que não é necessário o uso de aditivos químicos, não há necessidade de pré-produção de células e há uma taxa grande de transferência de massa de substrato (XIAO et al., 2009).

Na Figura 16 são apresentados os cromatogramas obtidos a partir das sínteses realizadas com as hifas imobilizadas em farelo de soja, farelo de trigo e bagaço de cana, comparados ao cromatograma produzido pelos padrões palmitato, oleato, linoleato e linolenato de etila. A melhor produção de ésteres foi obtida na síntese realizada utilizando-se o substrato sólido da fermentação em farelo de trigo, seguido pelo substrato sólido da fermentação em bagaço de cana de açúcar. Já na síntese utilizando-se farelo de soja não houve bom rendimento, sendo que o pico produzido pelo linolenato de etila não pode ser visto no cromatograma.

Ao contrário dos resultados obtidos nos testes de atividade hidrolítica, a fermentação realizada em farelo de trigo apresentou melhor atividade de transesterificação.

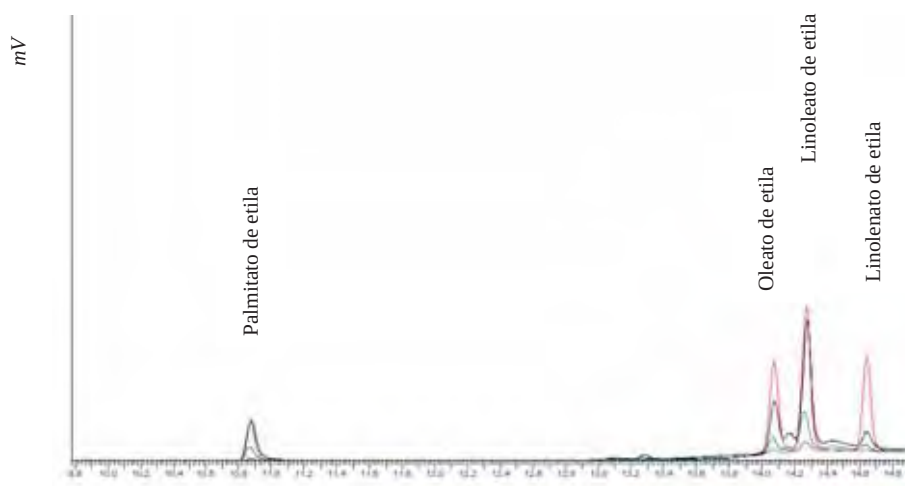


Figura 16: Cromatogramas dos padrões palmitato, linoleato, linolenato e oleato de etila (vermelho) e das sínteses realizadas com a hifa imobilizada em farelo de trigo (preto), farelo de soja (azul) e bagaço de cana de açúcar (verde).

Por meio destes cromatogramas foi possível calcular o rendimento das sínteses e a conversão do óleo em ésteres utilizando-se as hifas imobilizadas em farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar (Figura 17). A síntese utilizando-se as hifas imobilizadas em farelo de trigo apresentaram um rendimento de 10,8 % e uma taxa de conversão de 0,12 g de éster/g de óleo utilizado na reação. Já a síntese utilizando-se hifas imobilizadas em bagaço de cana de açúcar resultou em um rendimento de 6 % e uma taxa de conversão de 0,07 g de éster/g de óleo utilizado na síntese.

Embora o resultado não seja de um rendimento muito expressivo comparado ao biodiesel produzido por catálise química ou mesmo pela catálise enzimática utilizando-se enzimas comerciais, estes resultados são promissores, uma vez que é raro encontrar cepas selvagens que produzam lipases capazes de realizar a reação de transesterificação com eficiência.

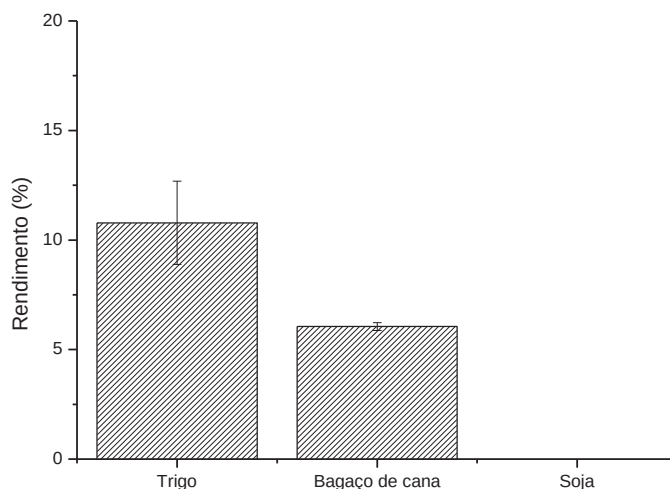


Figura 17: Rendimento das sínteses de biodiesel realizadas utilizando-se enzimas das hifas imobilizadas em farelo de soja, farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar.

Como as hifas imobilizadas em farelo de trigo apresentaram melhor rendimento nas reações de síntese, este foi o método escolhido de imobilização para dar continuidade ao projeto e realizar o planejamento fatorial para a melhoria das condições de reação.

5.8. Síntese de biodiesel

5.8.1. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

O delineamento experimental fatorial, DCCR 2^4 composto de 8 ensaios axiais e 7 repetições no ponto central, totalizando 31 ensaios, foi realizado com o intuito de maximizar os parâmetros temperatura, razão molar óleo:álcool, quantidade de enzima em relação ao meio reacional e quantidade de solvente na síntese de ésteres etílicos utilizando como catalisador as enzimas produzidas pela cepa fúngica imobilizada em trigo do fungo *Fusarium sp* P24. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos com o planejamento experimental para a síntese de biodiesel etílico.

Tabela 8: Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com os rendimentos das reações de transesterificação com a enzima das hifas imobilizadas *Fusarium sp* P24.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão Molar (óleo:álcool)	Enzima (%)	Solvente (óleo:hexano)	Rendimento (%)
1	31,25 (-1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	10,95
2	43,75 (1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	7,84
3	31,25 (-1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	7,53
4	43,75 (1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:0,5 (-1)	7,74
5	31,25 (-1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	11,32
6	43,75 (1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	10,59
7	31,25 (-1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	14,48
8	43,75 (1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:0,5 (-1)	13,74
9	31,25 (-1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	7,58
10	43,75 (1)	1:4,5 (-1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	7,26
11	31,25 (-1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	7,15
12	43,75 (1)	1:7,5 (1)	3,25 (-1)	1:1,5 (1)	6,75
13	31,25 (-1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	11,62
14	43,75 (1)	1:4,5 (-1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	10,91
15	31,25 (-1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	15,95
16	43,75 (1)	1:7,5 (1)	7,75 (1)	1:1,5 (1)	7,36
17	25,00 (-2)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:1 (0)	5,47
18	50,00 (2)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:1 (0)	11,35
19	37,50 (0)	1:3 (-2)	5,50 (0)	1:1 (0)	10,02
20	37,50 (0)	1:9 (2)	5,50 (0)	1:1 (0)	9,42
21	37,50 (0)	1:6 (0)	1 (-2)	1:1 (0)	5,90
22	37,50 (0)	1:6 (0)	10 (2)	1:1 (0)	8,69
23	37,50 (0)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:0 (-2)	6,71
24	37,50 (0)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:2 (2)	6,46
25	37,50 (0)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:1 (0)	6,39
26	37,50 (0)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:1 (0)	7,87
27	37,50 (0)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:1 (0)	7,80
28	37,50 (0)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:1 (0)	6,15
29	37,50 (0)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:1 (0)	9,40
30	37,50 (0)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:1 (0)	6,99
31	37,50 (0)	1:6 (0)	5,50 (0)	1:1 (0)	6,04

Com os resultados do planejamento fatorial foi possível determinar o coeficiente de regressão e construir a curva de nível e a superfície de resposta para

o rendimento das reações de síntese de biodiesel etílico, verificando-se qual a melhor faixa de trabalho pra a produção dos ésteres.

A Tabela 9 mostra que o único fator estudado que apresentou variação estatisticamente significativa no planejamento fatorial foi a concentração enzimática utilizada nas reações, obtendo-se um valor de P igual a 0,006, combinada com um pequeno efeito quadrático da razão molar, onde P obteve um valor de 0,059. Para que um fator tenha variação estatística significativa, é preciso que ele apresente um valor de P menor que 0,05.

Tabela 9: Coeficientes de regressão estimados para o rendimento.

Termos	Coeficientes de regressão do modelo	Desvio do coeficiente	T	P
Constante	7,15286	0,9534	7,502	0,000
Temperatura	-0,11625	0,5149	-0,226	0,824
Razão molar	0,05958	0,5149	0,116	0,909
Concentração enzimática	1,64792	0,5149	3,200	0,006
Solvente	-0,42875	0,5149	-0,833	0,417
Temperatura*Temperatura	0,62293	0,4717	1,321	0,205
Razão molar*Razão molar	0,95918	0,4717	2,033	0,059
Concentração enzimática*Concentração enzimática	0,34043	0,4717	0,722	0,481
Solvente*Solvente	0,15918	0,4717	0,337	0,740
Temperatura*Razão molar	-0,29312	0,6306	-0,465	0,648
Temperatura*Concentração enzimática	-0,45437	0,6306	-0,721	0,482
Temperatura*Solvente	-0,35812	0,6306	-0,568	0,578
Razão molar*Concentração enzimática	0,73312	0,6306	1,163	0,262
Razão molar*Solvente	-0,18813	0,6306	-0,298	0,769
Concentração enzimática*Solvente	0,06313	0,6306	0,100	0,922

Este modelo apresentou um coeficiente de regressão linear de 54,34 %, mostrando grande dispersão dos pontos, e Lack-of-Fit de 0,019, sendo que este deve ser maior que 0,05 para que o modelo seja aceito. Portanto foi realizada uma

nova análise dos dados para ajustar o modelo aos pontos, utilizando-se apenas as variáveis significativas estatisticamente. A Tabela 10 mostra os valores dos coeficientes de regressão para o novo modelo.

Tabela 10: Coeficientes de regressão estimados para o rendimento para o novo modelo.

Termos	Coeficientes de regressão do modelo	Desvio do coeficiente	T	P
Constante	8,09816	0,5147	15,733	0,000
Razão molar	0,05958	0,4580	0,130	0,897
Concentração enzimática	1,64792	0,4580	3,598	0,001
Razão molar*Razão molar	0,86071	0,4136	2,081	0,047

A nova análise de dados apresentou valor de P de 0,001 e de 0,047 para a concentração enzimática e para o efeito quadrático da razão molar respectivamente, mostrando que estes fatores realmente apresentam variação estatística significativa, porém o coeficiente de regressão linear apresentou um valor de 39,04 %, mostrando maior dispersão dos dados, entretanto o valor de *Lack-of-Fit* foi igual a 0,059, indicando este modelo como o mais adequado para ser utilizado.

A curva de nível e a superfície de resposta (Figura 18) mostram uma faixa de trabalho com maiores rendimentos utilizando-se concentrações enzimáticas entre 6,5 e 10 % de hifas imobilizadas em relação à massa total da reação. O fato de a quantidade de solvente, a temperatura e a razão molar não terem influenciado muito no rendimento das reações não era esperado, uma vez que esses são os principais fatores que interferem na produção do biodiesel (XIAO, et al., 2009; ANTCZAK, et al., 2009). Porém, como foi mostrado no item 5.2.4, a lipase produzida pelo fungo *Fusarium sp* P24 mantém a atividade enzimática alta em uma faixa ampla de temperatura (30 a 50°C), explicando o fato da temperatura não ter influenciado

significativamente o rendimento das reações. A faixa de variação de solvente utilizada no planejamento fatorial foi pequena e talvez devido a isso a quantidade de solvente utilizado na reação não tenha apresentado variação significativa nos resultados obtidos.

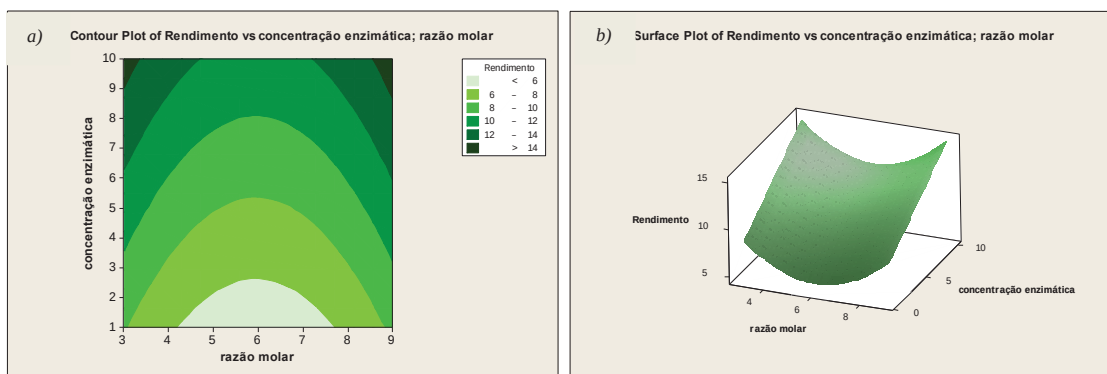


Figura 18: a) Curvas de contorno e b) superfície de resposta para o rendimento das síntese de biodiesel etílico utilizando as enzimas das hifas imobilizadas do fungo *Fusarium sp* P24 em função da concentração enzimática e razão molar óleo/álcool.

Através do planejamento fatorial foi possível obter o ponto ótimo de trabalho (Figura 19), no qual as transesterificações seriam realizadas utilizando-se razão molar 1:9 óleo/álcool e concentração enzimática de 10 % de fermentado sólido com hifas imobilizadas, porém estes valores talvez não fossem viáveis, uma vez que é necessário altas proporções de enzimas e de álcool.

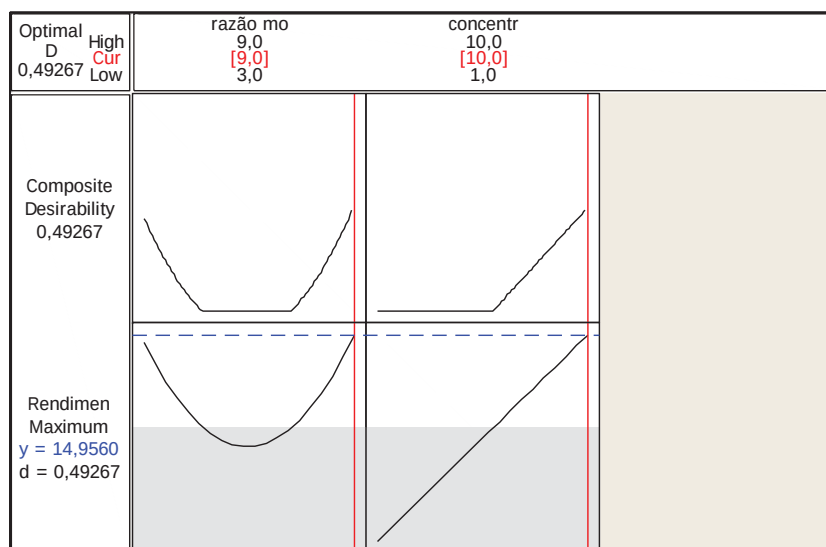


Figura 19: Ponto ótimo obtido através do planejamento fatorial de realização de transesterificação

A síntese que apresentou melhor rendimento (15,95 %) foi processada com 7,75 % de substrato sólido com hifas imobilizadas, a 31,25°C, com razão molar 1:7,5 óleo/álcool e razão v/v 1:1,5 óleo/solvente, obtendo-se uma conversão de 0,17 g de éster / g de óleo. Portanto essas foram as condições escolhidas para a continuidade do projeto.

5.8.2. Cinética de produção de biodiesel

Após a determinação das melhores condições para a síntese dos ésteres etílicos, a cepa fúngica P24 foi fermentada novamente em farelo de trigo e utilizada para a determinação da cinética de produção do biodiesel.

A Figura 20 mostra a evolução da síntese de biodiesel durante 240 horas, e foi possível observar que nas primeiras horas de reação não há uma produção significativa dos ésteres de etila, sendo que com 24 horas de reação foi obtido apenas 0,6 % de rendimento na transesterificação. Entretanto entre 24 e 96 horas, ocorreu aumento significativo na quantidade de ésteres produzidos atingindo um rendimento de 7,8 % em 96 horas, tendo novamente um pico de produção de

ésteres em 168 horas, possivelmente causado pela degradação de hifas e liberação de enzimas intracelulares, seguido de diminuição na taxa de reação para em torno de 7 % até o final do experimento.

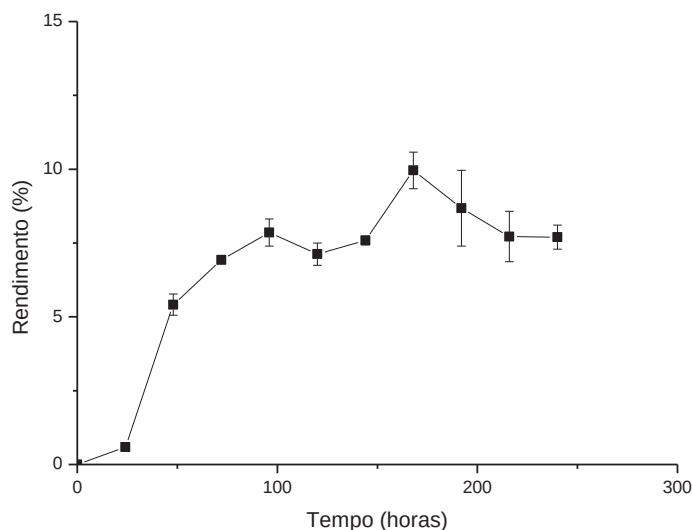


Figura 20: Cinética de produção de biodiesel pela hifas do fungo *Fusarium sp* P24 imobilizadas em farelo de trigo.

5.8.3. Efeito da quantidade de água na produção do biodiesel

Também foi realizado o estudo do efeito da quantidade de água presente na reação (método de atividade de transesterificação, item 4.9.3) uma vez que a transesterificação utilizando-se lipase dever ser realizada em meio aquo-restrito, lembrando-se que uma pequena quantidade de água deve estar presente para que a enzima possa atuar. Determinar o teor ótimo de água na transesterificação é necessário, pois geralmente todos os óleos contêm resíduos de água. No teor ótimo de água, a hidrólise das ligações éster é mantida a um nível mínimo e isto assegura o maior grau de transesterificação. Vários estudos mostraram que a adição de uma pequena alíquota de água à mistura reacional aumentou a taxa de síntese de ésteres de ácidos graxos (ANTCZAK, et al., 2009).

Foram realizadas transesterificações utilizando-se 0, 1, 5 e 10 % de água em relação à massa do meio reacional. A Figura 21 mostra a queda do rendimento da reação em relação quantidade de água, utilizando-se como referência uma reação de transesterificação realizada somente com a umidade presente no óleo (0,07 %) e no etanol (0,01 %), considerado-se esta reação como contendo 0 % de água. A reação com 0 % de água apresentou rendimento de 5,7 % de produção de biodiesel, entretanto quando adicionado 1 % de água à reação, esse rendimento caiu apenas 0,1 %, não representado uma queda significativa, e sendo este o nível de água aceitável na reação. Este resultado é de extrema importância para o uso de etanol na reação, devido a sua higroscopicidade. A presença de 5 e 10 % de água no meio reacional fez com que a reação caísse abruptamente para o rendimento em torno de 0,5 % de conversão em biodiesel.

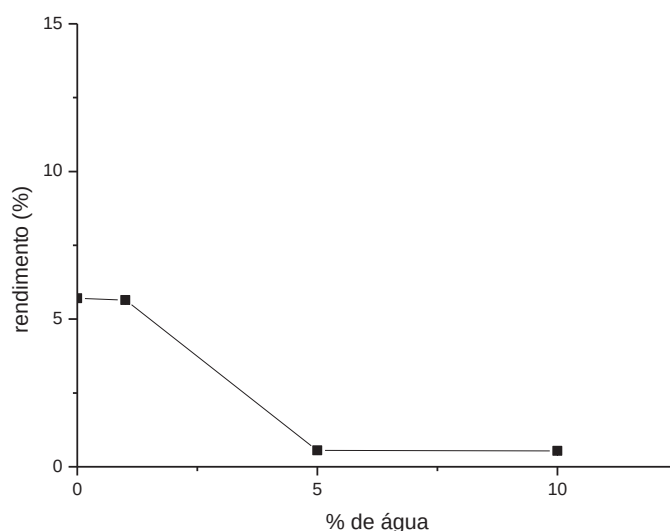


Figura 21: Rendimento da transesterificação em função da quantidade de água presente no meio reacional utilizando-se enzimas das hifas imobilizadas em farelo de trigo do fungo *Fusarium* sp P24.

Estes resultados contrariam os estudos realizados por Foresti et al. (2007), onde a adição de até 20 % de água ao meio aumentou a produção de ésteres

etílicos nas primeiras horas de esterificação do ácido oléico utilizando-se as enzimas comerciais *Cândida rugosa* (AY lipase), *Pseudomonas fluorescens* (AK lipase) e *Cândida antarctica* (Novozyme 435). Os resultados obtidos por Oliveira et al. (2004) mostraram que a adição de até 10 % de água ao meio reacional contendo óleo de mamona também manteve um rendimento de 100 % na reação de síntese utilizando-se as enzimas comerciais Lipozyme IM (*Mucor miehei*).

5.8.4. Efeito da irradiação de ultrassom na produção do biodiesel

A avaliação da influência da irradiação de ultrassom foi realizada utilizando-se a sonda de ultrassom durante 10 segundos a cada 15 minutos com uma potência de 10 %. Foi utilizado 10 % de irradiação de ultrassom devido à resultados observados no grupo de pesquisa, que mostrou que o aumento da irradiação poderia degradar o suporte utilizado para imobilização das hifas (OHE, 2011).

A Figura 22 apresenta o rendimento atingido na reação de transesterificação com a utilização da sonda ultrassônica (9,4 %), comparado ao rendimento da reação sem a utilização da sonda (5,7 %). Esse aumento de 64 % no rendimento da síntese de ésteres quando foi utilizado a sonda ultrassônica, pode ser explicado pela formação de uma mistura mais uniforme em micronível, diferente do que provavelmente ocorre quando se utiliza somente a agitação mecânica ou magnética (BRADLEY et al., 2003). Além disso, o aumento da movimentação das moléculas pode facilitar o acesso do substrato ao sítio ativo das enzimas (SHAH, GUPTA, 2008), o que poderia contribuir para aumentar o rendimento da reação de transesterificação. O uso do ultrassom também pode acelerar a reação de transesterificação (DABDOUB, et al., 2009).

Vishwanath et al. (2009) mostraram que a utilização do ultrassom na catálise química do óleo de palma proporcionou um aumento no equilíbrio das conversões e também melhorou as taxas de reação, porém o efeito não foi tão significativo em comparação com outras esterificações.

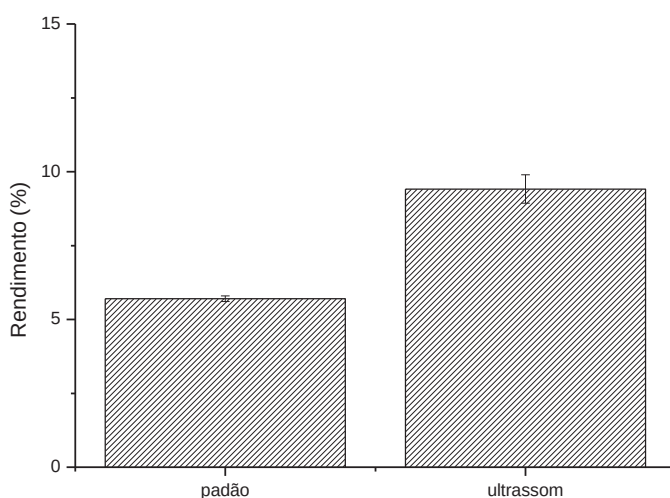


Figura 22: Rendimento da síntese de biodiesel utilizando-se enzimas das hifas imobilizadas em farelo de trigo do fungo *Fusarium sp* P24 com emprego de ultrassom.

Yu et al. (2010) observaram 96 % de conversão de ésteres metílicos em apenas 4 h combinando 50 % de irradiação ultrassônica e agitação mecânica de 50 rpm, sendo que utilizando-se somente o método de agitação mecânica obtiveram apenas 60 % de conversão em 12 horas de reação.

5.9. Análise de estabilidade oxidativa

As análises de estabilidade oxidativa foram realizadas pelo Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis,

Petróleo e Derivados (Cempecq) utilizando o equipamento Rancimat, modelo 873 Biodiesel, da marca Metrohm, de acordo com a norma EN 14112.

A estabilidade oxidativa do biodiesel é um parâmetro de qualidade exigido pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) através da Resolução nº 7 de 2008, que define estabilidade à oxidação a 110°C com um valor mínimo de período de indução de 6 horas. Os peróxidos são os principais produtos formados na primeira etapa da reação de oxidação do biodiesel. Com a continuidade do processo são formados compostos orgânicos voláteis, como ácidos orgânicos de baixa massa molecular (LÔBO, et al., 2009).

O biodiesel produzido pela transesterificação utilizando-se as enzimas das hifas imobilizadas em trigo do fungo *Fusarium sp* P24 apresentou período de indução de $4,62 \pm 0,03$ horas, não atingindo o mínimo exigido pela ANP. Também foi realizada a estabilidade oxidativa do óleo vegetal empregado na reação, este apresentou estabilidade de $4,58 \pm 0,01$ horas. As estabilidades oxidativas apresentadas pelo biodiesel produzido neste projeto e pelo óleo vegetal utilizado nas reações são muito similares. Possivelmente devido à baixa conversão obtida na transesterificação enzimática, além do biodiesel ainda ter um elevado percentual de óleo contaminante, que prejudica a qualidade final do biodiesel obtido. Este resultado é importante e mostra que o protocolo para a síntese do biodiesel precisa ser otimizado, a fim de alcançar resultados para viabilidade industrial.

6. CONCLUSÕES

Os zimogramas utilizando-se a Rodamina B como corante foram eficientes para pré-seleção de microrganismos com atividade lipolítica, as quais foram comprovadas pelos testes com substrato cromogênico. Entretanto, não houve correlação entre a atividade hidrolítica e a atividade de transesterificação. Apenas uma linhagem fúngica foi selecionada como produtora de lipase com atividade transesterificante. O fungo *Fusarium sp* P24 foi portanto escolhido para dar continuidade ao trabalho.

A fermentação da cepa fúngica *Fusarium sp* P24 mostrou maior produção de lipase em bagaço de cana de açúcar em 72 horas de cultivo. A concentração dos extratos brutos através de ultrafiltração, mostrou ser muito eficiente atingindo uma atividade de 58,9 U/g.

A lipase apresentou atividade hidrolítica ótima em uma ampla faixa de temperatura. Estas enzimas também apresentaram atividade de esterificação utilizando-se ácido oléico como substrato da reação.

Dos métodos de imobilização utilizado neste projeto, o único que se mostrou eficiente na transesterificação de óleo de soja, foi a imobilização da hifa em bagaço de cana de açúcar e em farelo de trigo, sendo o último escolhido para continuidade do projeto, já que apresentou maior conversão de ésteres.

A análise de variância mostrou que o único fator que apresentou variação estatisticamente significativa nas sínteses de biodiesel nas condições estudadas foi a concentração enzimática, apontando como ponto ótimo a concentração de 10 % de enzima em relação ao volume reacional.

A cinética realizada para a produção de biodiesel mostrou que 96 horas é o tempo adequado para sua produção nas condições empregadas.

A presença de mais que 1 % de água na síntese enzimática reduz a síntese de biodiesel. O ultrassom também teve efeito positivo sobre a síntese dos ésteres aumentando o rendimento da reação. A estabilidade oxidativa do biodiesel foi abaixo do preconizado pela ANP.

7. CRONOGRAMA DESENVOLVIDO DURANTE O PROJETO

CRONOGRAMA	SEMESTRES			
	1º	2º	3º	4º
Integralização dos créditos exigidos pela UNESP	X	X		
Testes da atividade lipolítica em placas de Petri	X	X		
Fermentação em estado sólido (FES)	X	X	X	X
Atividade de lipase em substrato cromogênico		X	X	
Imobilização das enzimas				X
Esterificação e transesterificação com as enzimas livres e imobilizadas			X	X
Avaliação química e físico-química dos produtos formados por esterificação e transesterificação.				X

REFERÊNCIAS

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP N° 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI G. M.; PORTO A. L. F.; MILANEZ A. I. Screening of mucor spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33 p. 325-330, 2002.

AMORIM, R. V. S.; MELO, E. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; LEDINGHAM, W. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 35–39, 2003.

ANDERSCH, P.; BERGER, M.; HERMANN, J.; LAUMEN, K. LOBELL, M.; SEEMAYER, R.; WALDINGER, C.; SCHNEIDER, M. P. Ester Synthesis via Acyl Transfer (Transesterification). In: RUBIN, B.; DENNIS, E. A. (Org.). **Methods Enzimology**, Part B, v. 286, p. 406-442, 1997.

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

BABICZ, I.; LEITE, S. G. F.; SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C. Lípase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 4-6, 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, p. 9–14, 2010.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. O. L.; MALCATA F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.

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

BELTRÃO N. E. M.; OLIVEIRA M. I. P. Direcionamento dos resíduos e co-produtos da fabricação do biodiesel a partir de mamona e pinhão manso. **Bahia Análise & Dados**, v. 18, n. 4, p. 613-619, 2009.

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

BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**, v. 23, p. 3627-3636, 2002.

BRADFORD, M. M. 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.

BRADLEY, M.; ASHOKKUMAR, M.; GRIESER, F. Sonochemical production of fluorescent And phosphorescent latex particles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125(2), p. 525-529, 2003.

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

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

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; DA SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

CASTRO-OCHOA, L .D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR 11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.

CHEN X.; DU W.; LIU D. Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 423–429, 2008.

CHIOU, S. H.; WU, W. T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, p. 197–204, 2004.

CORADI G. V.; OLIVEIRA B. H.; OLIVA NETO P.; LIMA V. M. G. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de lipases por fungos filamentosos. In: XXI Congresso de Iniciação Científica (Unesp), 2009, São José do Rio Preto. **Anais do XXI Congresso de Iniciação Científica (Unesp)**, 2009. p. 6668 - 6671.

CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. (Org.). **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. England: Ellis Horwood, v. 10, p. 12-50, 1985.

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

DANTAS E. M.; AQUINO L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 81-87, 2010.

DEMIRBAS A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 31, p. 466–487, 2005.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTRÖM, A. G.; BÄCKVALL, J. E.; MOWBRAY, S. L. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. **Jornal of Molecular Biology**, v. 376, p. 109–119, 2008.

FALONY G.; ARMAS J. C.; MENDOZA J. C. D.; HERNÁNDEZ J. L. M. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 235–240, 2006.

FERRAREZI, A. L. **Produção de lipases por fungos termofílicos imobilizados e a sua utilização para produção de biodiesel por transesterificação**. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em ciências biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista – Campus de Rio Claro, 2011.

FERRARI, R. A.; DE SOUZA, W. L. Evaluation of oxidation stability of sunflower oil biodiesel with antioxidants. **Química Nova**, v. 32, p. 106-111, 2009.

FERRAZ A. M.; BITENCOURT T. B.; NASCIMENTO M. G. Esterificação do ácido láurico catalisada por lipases imobilizadas em filmes de dextrana. In: 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, EQ- 40, 2006, Águas de Lindóia. **Anais da 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

FORESTI M. L.; PEDERNERA M.; BUCALÁ V.; FERREIRA M. L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 62–70, 2007.

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.

GOMES, E.; GUEZ, M. U.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fonte, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v.30, p.136-145, 2007.

GOPINATH S. C. B.; HILDA A.; PRIYA T. L.; ANNADURAI G. Purification of lipase from *Cunninghamella verticillata* and optimization of enzyme activity using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18 p. 449–458, 2002.

GUTARRA M. L. E.; GODOY M. G.; MAUGERI F.; RODRIGUES M. I.; FREIRE D. M. G.; CASTILHO L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5249–5254, 2009.

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

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

JACHMANIÁN I.; DOBROYÁN M.; MOLTINI M.; SEGURA N.; IRIGARAY B.; VEIRA J. P.; VIEITEZ I.; GROMPONE M. A. Continuous lipase-catalyzed alcoholysis of sunflower oil: effect of phase-equilibrium on process efficiency. **Jornal of the American Oil Chemists Society**, v. 87, p. 45-53, 2010.

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.

KAZLAUKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Pihler G, Stadler A, Kelly PJW (Org.). **Biotechnology**, v. 8, p. 37-192. 1998.

KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 1995.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 500–518, 2010.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia em fase gasosa**. 1. ed. São Carlos: Acta, 1993.

Leeuwen, V. J.; Beril A.; Kumar, K. S.; Shihwu S.; David ,G.; Leeuwen, V. J. Ultrasound pre-treatment of waste activated sludge. **Water Science & Technology: Water Supply**, v. 6, p. 5, 2006.

LYNNWORTH , L. C. Industrial Applications of Ultrasound -A Review II. Measurements, Tests, and Process Control Using Low-Intensity Ultrasound. **IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics**, v. 22, p. 71-101, 1975.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER N.; MITCHELL D. A.; BARATTI J. C.; DE-FILIPPIS I.; FONTANAE J. D. Evaluation of the potential 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.

LI M, F.; SUN, S. N.; XU, F.; SUN, R. C. Ultrasound-enhanced extraction of lignin from bamboo (*Neosinocalamus affinis*): Characterization of the ethanol-soluble fractions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 243–249, 2012.

LIN, L.; YING, D.; CHAITEP, S.; VITTAYAP, A. S. Biodiesel production from crude rice bran oil and properties as fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 681–688, 2009.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; DA CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; PARKER, Jack. **Microbiologia de BROCK**. 10. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2004.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 26, p. 509 – 515. 2000.

MATSUMOTO, M.; KONDO, K. Enhanced thermostability of α -chymotrypsin enclosed in inorganic microcapsules. **Jornal of Bioscience and Bioengineering** v. 92, p. 197–199. 2001.

MEDEIROS M. A.; OLIVEIRA D. L.; SANSIVIERO M. T. C.; ARAÚJO M. H.; LAGO R. M. Use of the glycerol by-product of biodiesel to modify the surface of expanded vermiculite to produce an efficient oil absorbent. *Journal Chemical Technology & Biotechnology*, v. 85, p. 447-452, 2010.

MEDINA, A. R.; MORENO, P. A. G.; CERDÁN, L. E.; GRIMA, E. M. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, 2009.

MESSIAS, J. M.; DA COSTA, B. Z.; DE LIMA, V. M. G.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Bothryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Bothryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p.426-431, 2009.

NEIS, U.; NICKEL, K.; TIEHM, A. Enhancement of anaerobic sludge digestion by ultrasonic disintegration. **Water Science & Technology**, v. 42, p. 73, 2000.

NOVELLINE, R. Squire's Fundamentals of Radiology (5th ed.). Harvard University Press. pp. 34–35, 1997.

NWUCHE C. O.; OGBONNA J. C. Isolation of Lipase Producing Fungi from Palm Oil Mill Effluent (POME) Dump Sites at Nsukka. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 54, n. 1, p. 113-116, 2011.

NYBROE, O.; JORGENSEN, P. E.; HENZE, M. Enzyme activities in waste water and activated sludge. **Water Research**, v. 26, n. 5, p. 579-584, 1992.

OHE, T. H. K. **Produção de biodiesel etílico com uso de lipases extracelulares de fungos termofílicos**. Tese (Mestrado) – Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto, 2011.

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

OKEKE C. N.; OKOLO B. N. The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 10, p. 747-750, 1990.

OTERO, C.; BERRENDERO, M. A.; CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; ELSON S. W.
General characterization of noncommercial microbial lipases in hydrolytic and synthetic reactions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v 120, p. 209-223, 2005.

PAU, H. S.; OMAR, I. C. Selection and optimization of lipase production from *Aspergillus flavus* UMS A10 via solid state fermentation (SSF) on rice husks and wood dusts as substrates. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 7, p. 1249-1256, 2004.

PETZELBAUER, I.; KUHN, B.; SPLECHTNA, B.; KULBE, K. D.; NIDETZKY, B.
Development of and ultrahigh temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. IV. Immobilization of two thermostable-glycosidases and optimization of a packed-bed reactor for lactose conversion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 619–631. 2002.

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

ROMDHANE, I. B. B.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H.
Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 230-239, 2011.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v. 27, nº 5, p. 298-306, 2009.

RUBIN, B.; DENNIS, E. A. Preface. In: **Methods in Enzimology: Lipases**. Part A, v. 284, p. 8, 1997.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. **Chemistry Central Journal**, v. 2, Article Number 1, 2008.

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

SILVA P. R. F.; FREITAS T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 843-851, 2008.

SILVA, M. F.; FREIRE D. M. G.; CASTRO A. M.; DI LUCCIO M.; MAZUTTI M. A.; OLIVEIRA J. V.; TREICHEL H.; OLIVEIRA D. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 145–152, 2011.

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

SMANIOTTO, A. **Produção e caracterização parcial de uma lipase sintética produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus***. Tese (Mestrado) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional do Alto do Uruguai e das Missões – Campus de Erechin, 2010.

SOHO, A. Industrial Applications of Ultrasound - A Review I. High Power Ultrasound. **IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics**, v. 22, p. 60-71, 1975.

SUAREZ P. A. Z.; SANTOS A. L. F.; RODRIGUES J. P.; ALVES M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, nº 3, p. 768-775, 2009.

SUN, J. X.; XU F.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; WU, S. B. Comparative study of lignins from ultrasonic irradiated sugar-cane bagasse. **Polymer International**, v. 53, p. 1711–1721, 2004.

TAMALAMPUDI S.; TALUKDER M. R.; HAMA S.; NUMATA T.; KONDO A.; FUKUDA H. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 185–189, 2008.

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

TREVAN, M. D. Enzyme immobilization by covalent bonding. **New Protein Techniques**, Humana Press, p. 495-510, 1988.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. R., Enzimas como agentes biotecnológicos. Ed. Legis Summa, Cap.7, p. 115-135. 2004.

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

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, nº 2, p. 407 - 412, 2008.

VENKATESAGOWDA B.; PONUGUPATY E.; BARBOSA A. M.; DEKKER R. F. H. Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v. 28, p.71 – 80, 2012.

VIEIRA, A. P. D. A.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. **Latin American Applied Research**, v. 36, p. 283-288, 2006.

VISHWANATH G. D.; PARAG. R. G.; ANIRUDDHA B. P. Ultrasound assisted synthesis of isopropyl esters from palm fatty acid distillate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, p. 345–350, 2009.

VYAS, A. P.; VERMA, J. L.; SUBRAHMANYAM, V. N. A review on FAME production processes. **Fuel**, p.1-9, 2010.

XIAO, M.; MATHEW, S.; OBBARD J. P. Biodiesel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst. **GCB Bioenergy**, v. 1, p. 115–125, 2009.

WANGA Y.; ZHANG L. Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 91–96, 2010.

YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y.; MA, D.; FANG, X. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 519-525, 2010.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura