



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS



BRUNA LUIZA CAPOVILLE

**PRODUÇÃO E ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS
VISANDO A OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL**

Botucatu

2012

BRUNA LUIZA CAPOVILLE

**PRODUÇÃO E ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS
VISANDO A OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pelo Departamento de Química e Bioquímica da UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", Campus Botucatu.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri

Botucatu

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Capoville, Bruna Luiza.

Produção e estudo da imobilização de lipases fúngicas visando à obtenção enzimática de biodiesel / Bruna Luiza Capoville. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luciana Francisco Fleuri

Coorientador: Valber de Albuquerque Pedrosa

Capes: 20805004

1. Bagaço de cana – Derivados. 2. Fermentação. 3. Biodiesel. 4. Impacto ambiental – Avaliação. 5. Lipase.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; Biodiesel; Fermentação em estado sólido; Lipases fúngicas.

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Resumo | 6 |
| 1. Introdução | 7 |
| 2. Objetivos | 11 |
| 3. Materiais e métodos | 12 |
| 3.1 <i>Microorganismos</i> | 12 |
| 3.2 <i>Produção de lipases fúngicas</i> | 12 |
| 3.3 <i>Planejamento experimental para a produção de lipases fúngicas</i> | 13 |
| 3.4 <i>Determinação da atividade de lipase</i> | 14 |
| 3.5 <i>Imobilização das lipases</i> | 14 |
| 4. Resultados | 16 |
| 4.1 <i>Produção de lipases</i> | 16 |
| 4.1.1 <i>Produção de lipases pelo fungo 01 em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar</i> | 18 |
| 4.1.2 <i>Produção de lipases pelo fungo 01 em farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar</i> | 21 |
| 4.1.3 <i>Produção de lipases pelo fungo 129 em farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar</i> | 24 |
| 4.2 <i>Imobilização das enzimas</i> | 26 |
| 5. Discussão | 28 |
| 6. Conclusão | 30 |
| 7. Referências Bibliográficas | 31 |

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|------------------------|-----------|
| Tabela 1 | 13 |
| Tabela 2 | 17 |
| Tabela 3 | 17 |
| Tabela 4 | 18 |
| Tabela 5 | 19 |
| Tabela 6 | 19 |
| Tabela 7 | 21 |
| Tabela 8 | 22 |
| Tabela 9 | 22 |
| Tabela 10 | 24 |
| Tabela 11 | 25 |
| Tabela 12 | 25 |
| Tabela 13 | 27 |
| | |
| Figura 1 | 20 |
| Figura 2 | 23 |
| Figura 3..... | 26 |

RESUMO

A atual demanda por produtos alternativos que substituam os combustíveis fósseis, causadores de alto impacto ambiental negativo, tem fomentado pesquisas em diferentes áreas como o emprego de lipases microbianas como biocatalisadores no setor de energia. Como mais uma forma de busca por tecnologias limpas, há também interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais. Nessa vertente, o Brasil como grande produtor agrícola se destaca na geração de subprodutos como o bagaço de cana-de-açúcar. Uma alternativa mais ecológica para atender a essa demanda é a produção de biodiesel, produzido a partir da transesterificação de triglicerídeos de origem animal ou vegetal, tendo como características não ser tóxico, ser biodegradável e fonte renovável de energia. As lipases são enzimas que aceleram reações de hidrólise e síntese, podendo ser obtidas de microorganismos por meio de processos de fermentação em estado sólido, porém com alta demanda de recursos financeiros para sua produção. Hoje em dia, o que está em alta na indústria de tecnologia com enzimas é a utilização de resíduos agroindustriais e processos de imobilização com o intuito de diminuir os gastos em sua produção, um dos gargalos para seu uso mais amplo. Neste trabalho foi analisada a viabilidade do uso do bagaço de cana-de-açúcar misturado a farelos de soja ou trigo como meios de cultivo em fermentação semi-sólida, assim como a melhor concentração de umidade para o desenvolvimento de lipases pelo microorganismos estudados. Foi testada também a viabilidade de imobilização das lipases produzidas em suporte de celite.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; Biodiesel; Fermentação em estado sólido; Lipases fúngicas.

1. INTRODUÇÃO

As fontes energéticas de um país tem papel fundamental em sua economia, principalmente nas áreas industrial e agrícola, considerando a relação intrínseca entre crescimento econômico e demanda por transporte (PAIVA, 2010). A dependência mundial por combustíveis fósseis como principal fonte de energia ainda é muito forte e as limitações dessa fonte estão cada vez mais em evidência, como sua atual escassez e esgotamento próximo, demanda maior que produção, grande aumento de preços e poluição causada por seu uso. Como uma alternativa mais ecológica para atender a essa demanda tem-se a produção de biodiesel, composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de ácidos graxos de gorduras de origem vegetal ou animal (ANP - Lei nº 11.097, Art. 2º).

O setor de transportes é um dos maiores emissores de gases do efeito estufa (GEE) (PEZZO e AMARAL, 2007). O biodiesel pode substituir total ou parcialmente o óleo diesel, derivado de petróleo, largamente usado em motores de máquinas de grande porte que demandam uma potência maior, como caminhões, tratores, ônibus e as utilizadas na construção civil e mineração, que são essenciais para o transporte e desenvolvimento da economia de muitos países (PAIVA, 2010). Se baseado no consumo da produção interna de cada país, o mercado de biocombustíveis ainda é pequeno, esperando-se que este mercado se consolide a longo prazo. O consumo na América Latina, entretanto, tem potencial de crescimento, principalmente nesta época em que a distribuição de fontes fósseis está instável.

As principais críticas hoje à produção de biocombustíveis são quanto ao seu baixo rendimento energético em relação aos combustíveis fósseis, à competição por fatores de produção com alimentos, tais como terra e água, e comprometimento de ecossistemas (PEZZO, 2012). Por motivos

econômicos e ecológicos, a obtenção de biocombustíveis advindos de biomassa vem aumentando seu espaço na área da tecnologia (STAMENKOVIC, 2011).

A matéria-prima triglicérida, importante fonte de lipídeos, pode ser obtida de óleos vegetais ou de gordura animal, o que garante as maiores vantagens do biodiesel: ser biodegradável e renovável. O termo biodegradável deve-se ao fato de ser constituído de carbono neutro, sua obtenção e queima não contribuem para o aumento das emissões de CO₂ na atmosfera, igualando assim o balanço de massa entre emissão de gases dos veículos e absorção dos mesmos pelas plantas produtoras dos óleos. Os combustíveis fósseis geram um aumento na concentração atmosférica dos gases causadores do efeito estufa, chuva ácida e da redução da camada de ozônio, o que contrapõe a biodegradabilidade (DANTAS, 2011). O termo renovável sugere como a produção do biocombustível não leva milhares de anos como os combustíveis fósseis, além do óleo usado na produção pode ser um resíduo agroindustrial e sua utilização reduzir a emissão de dióxido de carbono em cerca de 70%, quando comparado ao óleo diesel convencional. No Brasil, as vantagens vão além de uma fonte de energia sustentável: seu uso traz perspectivas de redução nas importações de combustíveis fósseis ou não (BARBOSA, 2009).

Durante a produção de biodiesel é necessário um catalisador para a reação química acontecer de maneira mais rápida e eficiente. Pode ser um ácido, uma base ou uma enzima de origem microbiana. A catálise ácida (o ácido mais usado como catalisador é o sulfúrico) apresenta uma cinética muito lenta de reação, comparado ao uso de catalisadores básicos. Outra desvantagem de seu uso está na necessidade da remoção do ácido após a transesterificação, pois sua presença poderia causar danos aos motores dos veículos. Já a catálise básica é mais rápida e proporciona grandes rendimentos, na maioria das vezes superior a 90%. No entanto, bases possuem grande sensibilidade à presença de água e ácidos graxos livres no

meio reacional, afetando o rendimento da reação e causando saponificação, comprometendo assim a qualidade do produto final.

As enzimas que promovem catálise, principalmente lipases, apresentam vantagem por elevarem consideravelmente a velocidade das reações, necessitarem de condições mais brandas de meio reacional, serem compatíveis com os substratos sintéticos e em alguns casos, catalisarem reações de síntese e degradação, podendo apresentar seletividade quanto ao tipo de reação (MESSIAS *et al*, 2011). São menos sensíveis à presença de água, não formando géis ou sabões, é possível recuperar as enzimas para serem utilizadas em novas reações quando imobilizadas, pois se separam facilmente do biodiesel. A origem microbiana é ambientalmente mais atrativa pois minimiza resíduos gerados no processo, as enzimas podem ser produzidas maciçamente e são mais estáveis, com grande diversidade em suas propriedades de catálise e especificidade com substratos.

Apesar do grande interesse em se utilizar enzimas, suas desvantagens estão relacionadas ao seu alto custo e a dificuldade em controlar o processo. O uso de resíduos agroindustriais como meio de cultivo dos microorganismos produtores dessas enzimas vem aumentando por ser ambientalmente viável e diminuir os gastos de processos que os utilizam (SALIHU, 2011).

Já a imobilização de enzimas em suportes insolúveis mostra grande eficiência em fornecer maior estabilidade e carga enzimática no reator, proporcionando atividade superior às enzimas quando comparadas às livres, devido à maior disponibilidade dos sítios ativos das enzimas quando confinadas nos poros do sólido, uma vez que durante as reações pode ocorrer a formação de agregados, comprometendo os sítios. A imobilização também deixa a tecnologia com enzimas mais acessível e mais ecológica, pois prolonga a vida útil do biocatalisador, possibilitando uma recuperação

facilitada e reutilização das enzimas em vários lotes da produção de interesse (CASTIGLIONI, 2009).

As enzimas com maior potencial para serem usadas durante o processo do biodiesel são as lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3), que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. São um grupo de grande importância por sua habilidade única de hidrolisar as ligações éster de ácidos graxos em ambientes aquosos e sintetizá-las em meio não aquoso. O biocombustível em questão pode ser produzido por alcoólise ou hidrólise seguida de esterificação utilizando lipases. Um número considerável de lipases bacterianas e fúngicas tem sido produzido comercialmente, sendo a última mais prática porque fungos produzem enzimas extracelulares, que são mais fáceis de recuperar a partir do caldo de fermentação (DHEEMAN *et al.*, 2011).

O presente trabalho visou a produção de lipases utilizando resíduos agroindustriais e diferentes condições de umidade para o cultivo e estudo da imobilização das enzimas em celite.

2. OBJETIVOS

- Avaliação da combinação de bagaço de cana-de-açúcar com farelo de trigo ou soja como substrato do processo fermentativo para a produção de lipases fúngicas;
- Avaliação do teor de umidade na produção de lipases fúngicas;
- Verificação do rendimento de produção enzimática;
- Estudo da viabilidade de imobilização com celite das lipases produzidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microorganismos

O Laboratório de Microorganismos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP possui 175 isolados fúngicos obtidos de amostras de vegetais e frutas em decomposição, flores, rejeitos e resíduos industriais e agrícolas, solos, águas marinhas e termais e de produtos industrializados. Destes 175 fungos, foram selecionados os três que apresentaram maior atividade de lipase em experimentos prévios, codificados como 01, 110 e 129. Os microorganismos foram conservados em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) a 4°C sob camada de vaselina esterilizada e repicados a cada três meses de armazenamento.

3.2. Produção de lipases fúngicas

A produção de lipases pelos fungos isolados e selecionados (três no total e codificados como 01, 110 e 129) foi realizada através de Fermentação em Estado Sólido (FES), utilizando como substrato combinações de farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar, como descrito por Fleuri e Macedo (2009). Para produção foi utilizado 10g da combinação de substratos umedecidos com diferentes quantidades de água, conforme planejamento experimental. Os frascos Erlenmeyers de 250mL contendo 10g do meio de cultura foram esterilizados por 40 minutos à temperatura de 121°C, a 1atm de pressão, e posteriormente inoculados com 1mL de suspensão de esporos, preparada com água destilada esterilizada e com esporos da cultura de 96 horas de crescimento em meio inclinado PDA. Os frascos foram incubados a 30°C por 96 horas. Após a incubação, foram adicionados 50mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro e após permanecerem em repouso por 30 minutos com agitação ocasional, foram filtrados em gaze e coletados em recipiente único. O

filtrado foi considerado fonte de enzimas e denominado de extrato enzimático bruto, sendo a atividade de lipase determinada como descrito no item 3.4. A combinação de substrato e umidade foi realizada como descrito a seguir, através de planejamento experimental. Nesta etapa foram selecionados os fungos e o substrato mais promissores quanto à produção de lipases.

3.3. Planejamento experimental para a produção de lipases fúngicas

Foi avaliada a combinação de farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar, totalizando 10g da mistura. Foi também avaliado a umidade (40, 80 e 120%) do meio de cultivo. Foi realizado um total de sete ensaios para o estudo de produção da enzima, tratando-se de um planejamento fatorial 2^n com três pontos centrais, onde n é o número de variáveis independentes, conforme metodologia descrita por Neto *et al.* (2001). O experimento decorreu por 96h, período este em que foi obtido o filtrado (fonte de enzimas) como descrito no item acima. A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa computacional Statistica 6.0, utilizando o Experimental Design.

As variáveis independentes e seus respectivos níveis e valores reais do planejamento fatorial estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizadas no planejamento fatorial para o estudo da produção de lipase pelos fungos 01, 110 e 129.

| Variáveis | -1 | 0 | +1 |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Substratos | 2,5g FS ou FT + 7,5g BC | 5,0g FS ou FT + 5,0g BC | 7,5g FS ou FT + 2,5g BC |
| Umidade | 4,0mL (40%) | 8,0mL (80%) | 12,0mL (120%) |

Sendo: FS= farelo de soja; FT= farelo de trigo e BC= bagaço de cana-de-açúcar.

3.4. Determinação da atividade de lipase

A atividade de lipase foi determinada em um sistema composto por 5mL de emulsão de óleo de oliva extra virgem e goma arábica 7% na proporção de 25% de óleo para 75% de goma; 2mL de solução-tampão fosfato 0,01M, pH 7,0 e 2mL de solução enzimática. O sistema foi incubado a 40°C por 30 minutos em banho termostaticado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada com a adição de 15mL de solução acetona:etanol (1:1, v/v) e os ácidos graxos liberados titulados contra solução de NaOH 0,05mol/L, utilizando fenolftaleína como indicador (Macedo *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 2011). Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1µmol de ácido graxo por minuto, nas condições de ensaio.

3.5. Imobilização das lipases

Após a determinação da atividade enzimática, foram selecionados o fungo, os meios de cultivo e as condições de umidade para o prosseguimento do estudo de imobilização. Foi selecionado o fungo 01 nas seguintes condições: 7,5g de farelo de trigo + 2,5g bagaço de cana-de-açúcar + 4mL de água; 7,5g de farelo de soja + 2,5g bagaço de cana-de-açúcar + 4mL de água; 5,0g de farelo de soja + 5,0g de bagaço de cana-de-açúcar + 4mL de água. As lipases foram produzidas nos meios descritos acima em larga escala, para posterior liofilização.

À uma suspensão de 50mg de enzima/mL em 5mL de água destilada foi adicionado 500mg do suporte celite (545) (Sigma-Aldrich) para a imobilização. A suspensão com o suporte foi colocada em agitador magnético por 1 hora a 0°C, seguido de filtração em papel de filtro Whatman n°1 e três lavagens com água destilada a 10°C. As águas de filtragem foram reservadas e o resíduo do papel de filtro foi colocado em tubo de ensaio com 7mL de solução-tampão fosfato com concentração de 0,1M em pH 7,4, ambos mantidos em geladeira.

A atividade enzimática dos produtos da imobilização (resíduo do papel de filtro e água de filtração) foi realizada como descrito anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. Produção de lipases

Foi realizado um planejamento experimental para verificar a influência da combinação dos resíduos farelo de soja, farelo de trigo e do bagaço de cana-de-açúcar, bem como a umidade da mistura de resíduos a 40, 80 e 120% no processo de produção de lipase por fermentação em estado sólido.

Os resultados da Tabela 2 indicam que a linhagem fúngica 01 cultivada em farelo de soja + bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo + bagaço de cana-de-açúcar e a linhagem 129 cultivada em farelo de soja + bagaço de cana-de-açúcar apresentaram as maiores atividades de lipases, sendo esses dados computados na planilha de planejamento experimental (Tabela 3) e analisados para a obtenção de curvas de contorno. O fungo 110 apresentou atividades de lipase irrisórias neste estudo.

Tabela 2. Atividade de lipase (U/mL) dos extratos obtidos por meio de processo fermentativo utilizando o fungo 01, 110 e 129 em diferentes combinações de resíduos e umidade.

| Fungo | Ensaio | Combinação de resíduos | Umidade (%) | | |
|-------|--------|------------------------|--------------|------|------|
| | | | 40 | 80 | 120 |
| 01 | 1 | 7,5 FT + 2,5 BC | 10,82 | 8,5 | 9,23 |
| | 2 | 5,0 FT + 5,0 BC | 6,05 | 5,3 | 1,15 |
| | 3 | 2,5 FT + 7,5 BC | 3,5 | 3,71 | 0 |
| | 4 | 7,5 FS + 2,5 BC | 11,35 | 4,88 | 0,53 |
| | 5 | 5,0 FS + 5,0 BC | 10,4 | 5,62 | 0,95 |
| | 6 | 2,5 FS + 7,5 BC | 4,14 | 0,53 | 0 |
| 110 | 1 | 7,5 FT + 2,5 BC | 1,91 | 1,8 | 0,95 |
| | 2 | 5,0 FT + 5,0 BC | 1,17 | 1,5 | 2,12 |
| | 3 | 2,5 FT + 7,5 BC | 1,17 | 0,53 | 0,53 |
| | 4 | 7,5 FS + 2,5 BC | 1,6 | 1,16 | 1,7 |
| | 5 | 5,0 FS + 5,0 BC | 2,55 | 1,8 | 0,74 |
| | 6 | 2,5 FS + 7,5 BC | 1,5 | 0,74 | 0,53 |
| 129 | 1 | 7,5 FT + 2,5 BC | 6,6 | 5,41 | 4,45 |
| | 2 | 5,0 FT + 5,0 BC | 4,03 | 5,2 | 4,45 |
| | 3 | 2,5 FT + 7,5 BC | 1,91 | 3,07 | 3,6 |
| | 4 | 7,5 FS + 2,5 BC | 10,1 | 4,14 | 6,8 |
| | 5 | 5,0 FS + 5,0 BC | 4,14 | 5,73 | 5,73 |
| | 6 | 2,5 FS + 7,5 BC | 5,3 | 2,44 | 2,76 |

Sendo: FS= farelo de soja; FT= farelo de trigo e BC= bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 3. Estudo da combinação de substratos e da umidade na produção de lipases pelos fungos 01 e 129 após 96 horas de fermentação em estado sólido, utilizando planejamento experimental.

| Ensaio | Substratos | Umidade | U/mL de lipase (01 FT + BC) | U/mL de lipase (01 FS + BC) | U/mL de lipase (129 FS + BC) |
|--------|------------|---------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 1 | -1 | -1 | 3,5 | 4,14 | 5,3 |
| 2 | +1 | -1 | 10,82 | 11,35 | 10,1 |
| 3 | -1 | +1 | 0 | 0 | 2,76 |
| 4 | +1 | +1 | 9,23 | 4,88 | 6,8 |
| 5 | 0 | 0 | 5,09 | 4,46 | 5,52 |
| 6 | 0 | 0 | 5,52 | 6,79 | 5,95 |
| 7 | 0 | 0 | 5,3 | 5,62 | 5,73 |

Sendo: FS= farelo de soja; FT= farelo de trigo e BC= bagaço de cana-de-açúcar.

4.1.1. Produção de lipases pelo fungo 01 em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar

Analisando os valores de atividades de lipase obtidos do extrato do fungo 01 (Tabela 3, quarta coluna), verifica-se uma maior atividade de lipase no ensaio dois, em que se utilizou 7,5g de FT + 2,5g BC e 40% de umidade, possibilitando uma atividade 10,82U/mL.

Tabela 4. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 01 por fermentação em estado sólido.

| Parâmetros | Efeito | Desvio Padrão | t (2) | P | Limite de Confiança (-95%) | Limite de Confiança (+95%) |
|-----------------|----------|---------------|----------|----------|----------------------------|----------------------------|
| Média* | 5,63714 | 0,081270 | 69,3634 | 0,000208 | 5,28747 | 5,98682 |
| (1) Substratos* | 8,27500 | 0,215019 | 38,4849 | 0,000674 | 7,34985 | 9,20015 |
| (2) Umidade* | -2,54500 | 0,215019 | -11,8361 | 0,007063 | -3,47015 | -1,61985 |
| 1 x 2* | 0,95500 | 0,215019 | 4,4415 | 0,047138 | 0,02985 | 1,88015 |

*Parâmetros estatisticamente significativos.

A Tabela 4 apresenta o efeito das variáveis (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 01. Todos os parâmetros estudados foram considerados estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$). A combinação de substratos apresentou o maior efeito na produção da enzima (efeito positivo) seguido pela interação das variáveis. Dessa forma, quanto maior o conteúdo de farelo de trigo e menor de bagaço, maior a resposta. A umidade apresentou efeito negativo, portanto quanto menor o conteúdo de água, maior a produção de lipase pelo fungo em questão.

Tabela 5. Coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança das variáveis independentes (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 01 por fermentação em estado sólido.

| Parâmetros | Coeficiente de Regressão | Desvio Padrão | Limite de Confiança (-95%) | Limite de Confiança (+95%) |
|---------------|--------------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| Média | 5,63714 | 0,081270 | 5,28747 | 5,986818 |
| (1)Substratos | 4,13750 | 0,107510 | 3,67492 | 4,600077 |
| (2)Umidade | -1,27250 | 0,107510 | -1,73508 | -0,809923 |
| 1x2 | 0,47750 | 0,107510 | 0,01492 | 0,940077 |

*Parâmetros estatisticamente significativos.

A validade do modelo foi verificada pela Análise de Variância (Anova) apresentada na Tabela 6. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99. O valor do teste F calculado foi comparado ao valor do F tabelado para a distribuição de F a 95% de nível de confiança com os respectivos graus de liberdade. O F calculado (regressão/resíduos) para a produção de lipase pelo fungo 01 foi doze vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 6. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 01 por fermentação em estado sólido.

| Fonte de Variação | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática | Teste Fcal |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------|
| Regressão | 75,86496 | 3 | 25,28832 | 112,03074 |
| Resíduos | 0,67718 | 3 | 0,2257266 | |
| Falta de Ajuste | 0,58471 | 2 | | |
| Erro Puro | 0,09247 | 1 | | |
| Total | 76,54214 | 6 | | |

Coeficiente de correlação: R^2 : 0,99.

$F_{tab\ 0,95;3;3} = 9,276628$.

$F_{cal}/F_{tab} = 12,07$.

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear, a partir da Tabela 5, que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve a curva de contorno (Figura 1) da produção de lipase pelo fungo 01.

Equação 1: $5,63 + 4,13 \times \text{substratos} - 1,27 \times \text{umidade} + 0,47 \times \text{substratos} \times \text{umidade}$

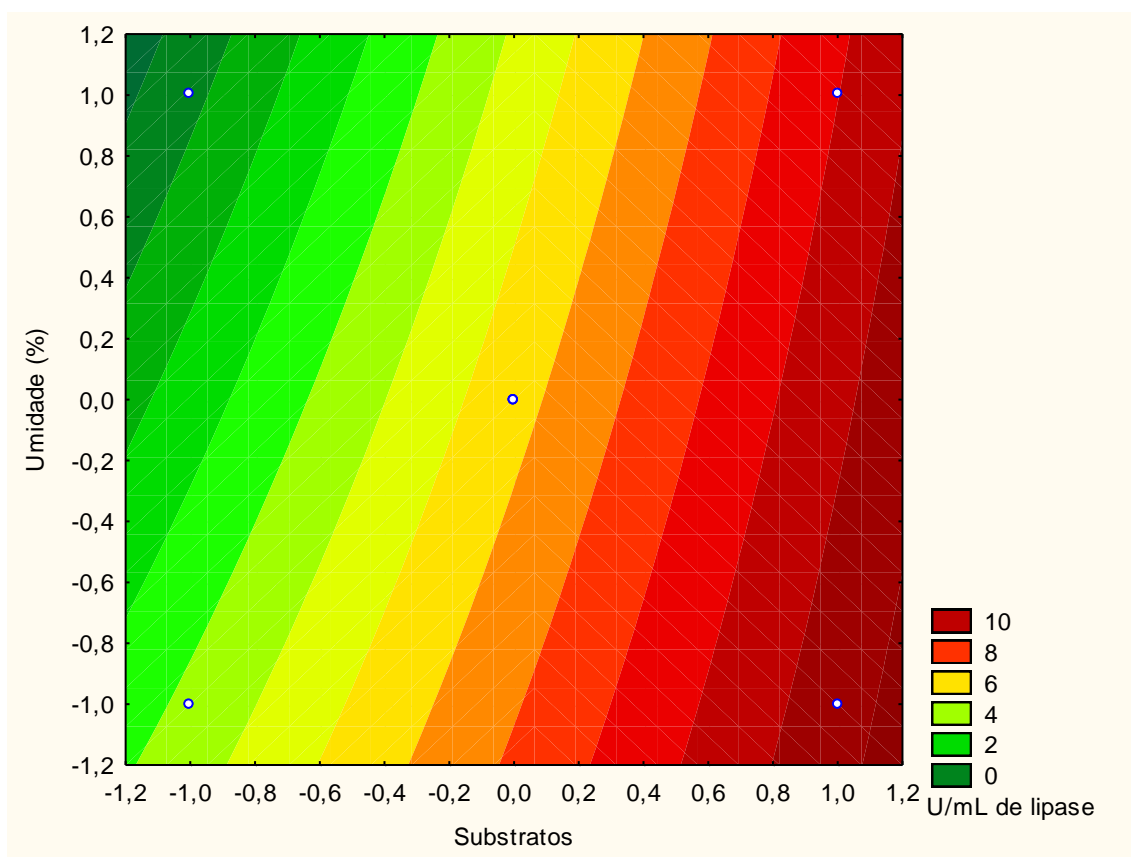


Figura 1. Curva de contorno da produção de lipase pelo fungo 01 em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (valores codificados).

4.1.2. Produção de lipases pelo fungo 01 em farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar

Analisando os valores de atividades de lipase obtidos do extrato do fungo 01 (Tabela 3, quinta coluna), verifica-se também uma maior atividade de lipase no ensaio dois, em que se utilizou 7,5g de FS + 2,5g BC e 40% de umidade, possibilitando uma atividade 11,35U/mL.

Tabela 7. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 01 por fermentação em estado sólido.

| Parâmetros | Efeito | Desvio Padrão | t (2) | P | Limite de Confiança (-95%) | Limite de Confiança (+95%) |
|-----------------|----------|---------------|----------|----------|----------------------------|----------------------------|
| Média* | 5,32000 | 0,440330 | 12,08185 | 0,006781 | 3,4254 | 7,21459 |
| (1) Substratos* | 6,04500 | 1,165004 | 5,18883 | 0,035193 | 1,0324 | 11,05761 |
| (2) Umidade* | -5,30500 | 1,165004 | -4,55363 | 0,044996 | -10,3176 | -0,29239 |
| 1 x 2 | -1,16500 | 1,165004 | -1,00000 | 0,422651 | -6,1776 | 3,84761 |

*Parâmetros estatisticamente significativos.

A Tabela 7 apresenta o efeito das variáveis (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 01. Os parâmetros substratos e umidade foram considerados estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$). A combinação de substratos apresentou o maior efeito na produção da enzima (efeito positivo). Dessa forma, quanto maior o conteúdo de farelo de soja e menor de bagaço, maior a resposta. A umidade apresentou efeito negativo, portanto quanto menor o conteúdo de água, maior a produção de lipase pelo fungo em questão. A interação entre os parâmetros estudados não foi significativo a 95% de confiança, sendo excluída do modelo.

Tabela 8. Coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança das variáveis independentes (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 01 por fermentação em estado sólido.

| Parâmetros | Coeficiente de Regressão | Desvio Padrão | Limite de Confiança (-95%) | Limite de Confiança (+95%) |
|---------------|--------------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| Média | 5,32000 | 0,440330 | 3,42541 | 7,214587 |
| (1)Substratos | 3,02250 | 0,582502 | 0,51620 | 5,528803 |
| (2)Umidade | -2,65250 | 0,582502 | -5,15880 | -0,146197 |

*Parâmetros estatisticamente significativos.

A validade do modelo foi verificada pela Análise de Variância (Anova) apresentada na Tabela 6. Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança foram excluídos do modelo, sendo incorporados no resíduo total. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,93. O valor do teste F calculado foi comparado ao valor do F tabelado para a distribuição de F a 95% de nível de confiança com os respectivos graus de liberdade. O F calculado (regressão/resíduos) para a produção de lipase pelo fungo 01 foi quatro vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 9. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 01 por fermentação em estado sólido.

| Fonte de Variação | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática | Teste Fcal |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------|
| Regressão | 64,68504 | 2 | 32,34252 | 28,40327 |
| Resíduos | 4,55476 | 4 | 1,13869 | |
| Falta de Ajuste | 2,71447 | 2 | | |
| Erro Puro | 1,84029 | 2 | | |
| Total | 69,23980 | 6 | | |

Coefficiente de correlação: R^2 : 0,93.

$F_{tab_{0,95;2;4}} = 6,944272$.

$F_{cal}/F_{tab} = 4,09$.

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear, a partir da Tabela 8, que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve a curva de contorno (Figura 2) da produção de lipase pelo fungo 01.

Equação 2: $5,32 + 3,02 \times \text{substratos} - 2,65 \times \text{umidade}$

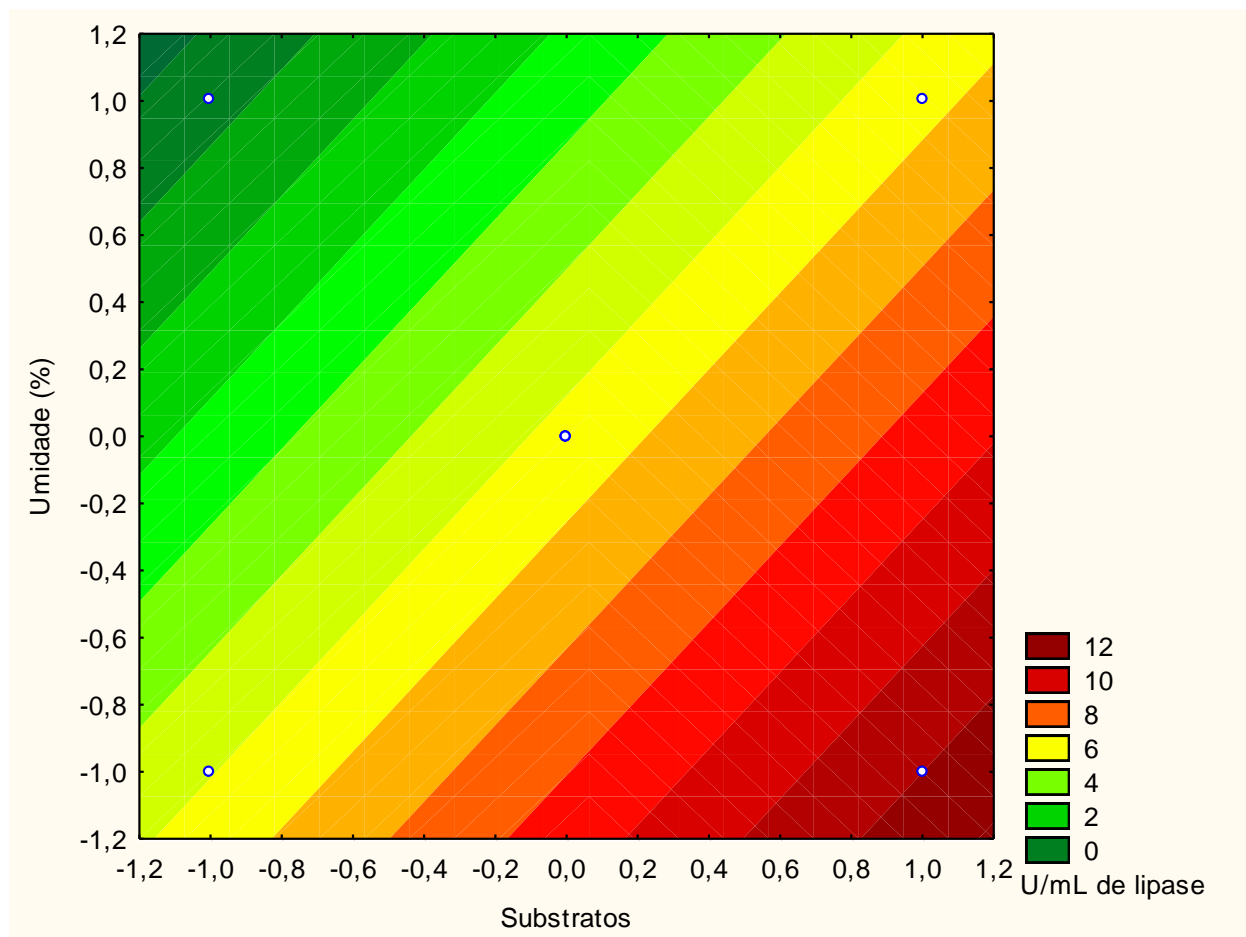


Figura 2. Curva de contorno da produção de lipase pelo fungo 01 em farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar (valores codificados).

4.1.3 Produção de lipases pelo fungo 129 em farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar

Analisando os valores de atividades de lipase obtidos do extrato do fungo 129 (Tabela 3, sexta coluna), verifica-se também uma maior atividade de lipase no ensaio dois em que se utilizou 7,5g de FS + 2,5g BC e 40% de umidade, possibilitando uma atividade 10,1U/mL.

Tabela 10. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 129 por fermentação em estado sólido.

| Parâmetros | Efeito | Desvio Padrão | t (2) | P | Limite de Confiança (-95%) | Limite de Confiança (+95%) |
|-----------------|----------|---------------|----------|----------|----------------------------|----------------------------|
| Média* | 6,02286 | 0,081270 | 74,1095 | 0,000182 | 5,67318 | 6,37253 |
| (1) Substratos* | 4,42000 | 0,215019 | 20,5563 | 0,002358 | 3,49485 | 5,34515 |
| (2) Umidade* | -2,92000 | 0,215019 | -13,5802 | 0,005379 | -3,84515 | -1,99485 |
| 1 x 2 | -0,38000 | 0,215019 | -1,7673 | 0,219215 | -1,30515 | 0,54515 |

*Parâmetros estatisticamente significativos.

A Tabela 10 apresenta o efeito das variáveis (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 129. Os parâmetros substratos e umidade foram considerados estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$). A combinação de substratos apresentou o maior efeito na produção da enzima (efeito positivo). Dessa forma, quanto maior o conteúdo de farelo de soja e menor de bagaço, maior a resposta. A umidade apresentou efeito negativo, portanto quanto menor o conteúdo de água, maior a produção de lipase pelo fungo em questão. A interação entre os parâmetros estudados não foi significativo a 95% de confiança, sendo excluída do modelo.

Tabela 11. Coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança das variáveis independentes (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 129 por fermentação em estado sólido.

| Parâmetros | Coeficiente de Regressão | Desvio Padrão | Limite de Confiança (-95%) | Limite de Confiança (+95%) |
|---------------|--------------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| Média | 6,02286 | 0,081270 | 5,67318 | 6,372532 |
| (1)Substratos | 2,21000 | 0,107510 | 1,74742 | 2,672577 |
| (2)Umidade | -1,46000 | 0,107510 | -1,92258 | -0,997423 |

*Parâmetros estatisticamente significativos.

A validade do modelo foi verificada pela Análise de Variância (Anova) apresentada na Tabela 12. Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança foram excluídos do modelo, sendo incorporados no resíduo total. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,97. O valor do teste F calculado foi comparado ao valor do F tabelado para a distribuição de F a 95% de nível de confiança com os respectivos graus de liberdade. O F calculado (regressão/resíduos) para a produção de lipase pelo fungo 129 foi aproximadamente doze vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 12. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (substratos e umidade) na produção de lipase pelo fungo 129 por fermentação em estado sólido.

| Fonte de Variação | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática | Teste Fcal |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------|
| Regressão | 28,0628 | 2 | 14,0314 | 82,910745 |
| Resíduos | 0,67694 | 4 | 0,169235 | |
| Falta de Ajuste | 0,58447 | 2 | | |
| Erro Puro | 0,09247 | 2 | | |
| Total | 28,73974 | 6 | | |

Coeficiente de correlação: R^2 : 0,97.

$F_{tab\ 0,95;2;4} = 6,944272$.

$F_{cal}/F_{tab} = 11,939443$.

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear, a partir da Tabela 11, que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve a curva de contorno (Figura 3) da produção de lipase pelo fungo 129.

Equação 3: $6,02 + 2,21 \times \text{substratos} - 1,46 \times \text{umidade}$

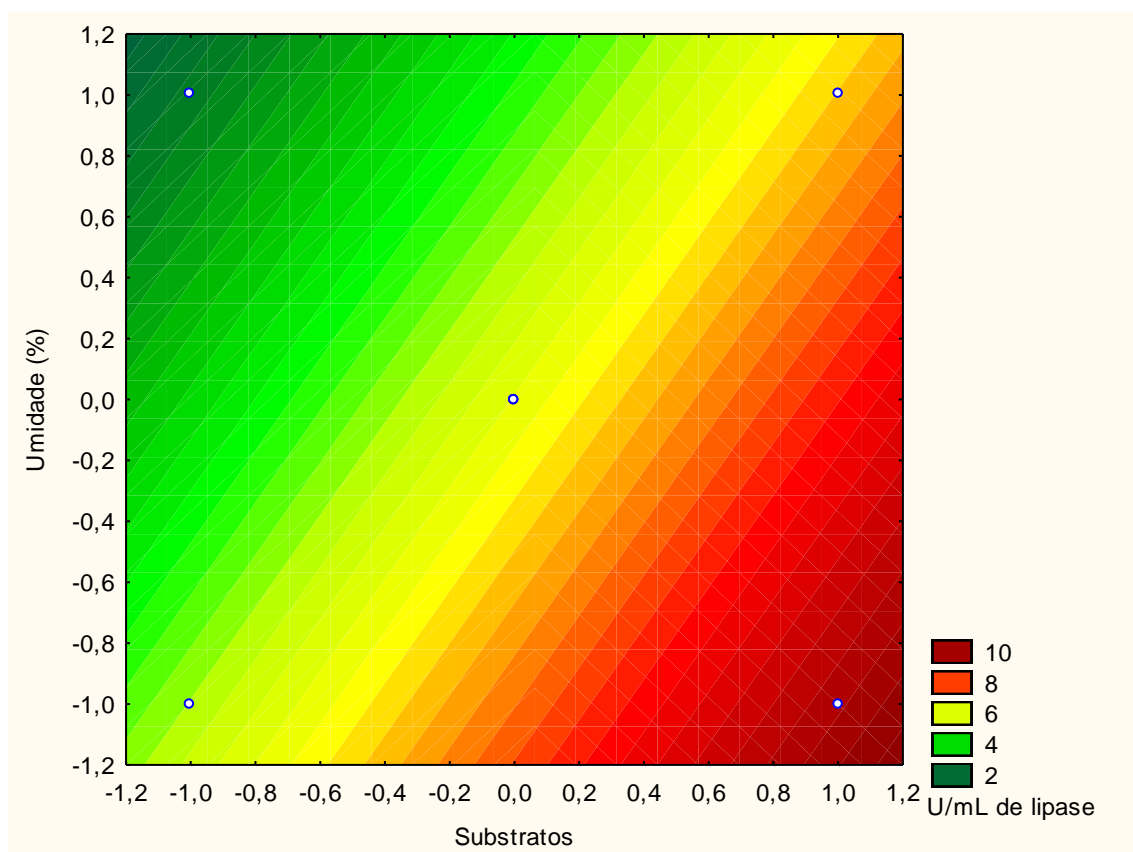


Figura 3. Curva de contorno da produção de lipase pelo fungo 129 em farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar (valores codificados).

4.2. Imobilização das enzimas

A imobilização foi testada nos resultados mais promissores dos testes de atividade enzimática, todas do fungo 01, nas condições 7,5g de farelo de trigo + 2,5g bagaço de cana-de-açúcar + 4mL de água; 7,5g de farelo de soja + 2,5g bagaço de cana-de-açúcar + 4mL de água e 5,0g de farelo de soja + 5,0g de bagaço de cana-de-açúcar + 4mL de água. Produziu-se em larga escala as

lipases nessas condições, onde foram preparados meios de cultivo que implicaram na obtenção 262,5mL, 260mL e 220mL respectivamente de extrato enzimático aquoso a ser liofilizado.

Os extratos sem liofilização apresentaram atividades enzimáticas de 7,96U/mL da amostra 7,5g de farelo de trigo + 2,5g bagaço de cana-de-açúcar + 4mL de água; 11,46U/mL de 7,5g de farelo de soja + 2,5g bagaço de cana-de-açúcar + 4mL de água e 6,90U/mL da amostra 5,0g de farelo de soja + 5,0g de bagaço de cana-de-açúcar + 4mL de água. Após o processo de liofilização, foram obtidos 5,6g, 4,0g e 2,8g de extrato liofilizado e que resultaram respectivamente em 159,2U/g, 129,5U/g e 190U/g (Tabela 13).

A atividade enzimática das amostras posterior à imobilização foi testada duas vezes, com 2mL do imobilizado ou da água de lavagem e 2mL de solução-tampão fosfato, assim como feito nas amostras sem imobilização. Os testes realizados não detectaram atividade de lipase, nem no imobilizado e nem nas águas de lavagem (Tabela 13).

Tabela 13: Atividades de lipases do fungo 01 e rendimento dos processos para enzimas brutas, concentradas e imobilizadas.

| Substratos | Atividade do extrato enzimático bruto (U/mL) | Atividade do extrato enzimático liofilizado (U/g) | Rendimento de produção de lipase liofilizada (U/100g) | Atividade de lipase imobilizada |
|-----------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 7,5 FT + 2,5 BC | 7,96 | 159,2 | 1.114,4 | 0 |
| 7,5 FS + 2,5 BC | 11,46 | 129,5 | 647,5 | 0 |
| 5 FS + 5 BC | 6,9 | 190 | 665 | 0 |

5. DISCUSSÃO

Maldonado *et al.* (2012) estudou a produção de lipase de *Geotrichum candidum* em frascos agitados e reator de misturas e obteve uma atividade máxima de 16U/mL após 48 horas de fermentação com meio composto de 3% de peptona e 0,5% de óleo de soja. Roveda *et al.* (2010) avaliou a produção de lipases por diferentes cepas de microorganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa, sendo que os fungos E9 (*Aspergillus*), E21 (*Aspergillus*) e E20 (*Penicillium*) foram os que apresentaram as maiores atividades enzimáticas, de 1,250; 2,042 e 2,250U, respectivamente. A produção de lipases por *Penicillium corylophilum* IOC 4211 foi estudada por Baron *et al.* (2005) em dois meios de cultivo complexos de fermentação. As atividades enzimáticas obtidas com o primeiro meio foi de 3,25U/mL após três dias de fermentação e com o segundo, de 7,1U/mL após seis dias de fermentação. Teng e Xu (2008) estudaram a produção de lipases com células imobilizadas de *Rhizopus chinenses* obtendo 13,9U/mL de lipases em meio de cultivo líquido contendo óleo de oliva e peptona. Miranda *et al.* (1999) obtiveram 2,63 e 5,79U/mL de lipase em dois meios de cultivo, contendo, respectivamente óleo de oliva e sulfato de amônio (meio 1) e resíduo industrial e sulfato de amônio (meio 2).

No presente estudo, os extratos de lipases obtidos dos fungos 01 e 129 a partir de farelos de trigo ou soja em combinação com bagaço de cana-de-açúcar, apresentaram atividades de lipases superiores às citadas por Roveda *et al.* (2010), Baron *et al.* (2005) e Miranda *et al.* (1999) e similares às relatadas por Maldonado *et al.* (2012) e Teng e Xu (2008).

Com a análise dos dados obtidos anterior e posteriormente à liofilização, nota-se um grande aumento na atividade enzimática das três amostras, com um rendimento bastante satisfatório de produção de lipases.

Para cada 100g do substrato composto por 75g de FT + 25g BC e 40mL de água para cultivo do fungo 01, foi obtido 1.114,4U de lipase (Tabela 13).

Para cada 100g do substrato composto por 75g de FS + 25g BC e 40mL de água para cultivo do fungo 01, foi obtido 647,5U de lipase (Tabela 13).

Para cada 100g do substrato composto por 50g de FS + 50g BC e 40mL de água para cultivo do fungo 01, foi obtido 665U de lipase (Tabela 13).

Quanto à imobilização das enzimas, o suporte, provavelmente, inativou as lipases, havendo necessidade de mais estudos.

6. CONCLUSÃO

Os isolados fúngicos do Laboratório de Microorganismos do Departamento de Química e Bioquímica codificados como 01, 110 e 129 foram capazes de produzir lipases em meio de cultivo com diferentes combinações de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo ou de soja como substrato, nas três diferentes concentrações de umidade 40, 80 e 120%.

Na maioria dos ensaios, a umidade 40% demonstrou-se mais próxima da ideal para o crescimento dos fungos e produção de lipases.

O fungo 01 foi o melhor produtor de lipases com alta atividade, com destaque para as combinações 5,0 FS + 5,0 BC, 7,5 FT + 2,5 BC e 7,5 FS + 2,5 BC, todas com 40% de umidade, que apresentaram 10,4, 10,82 e 11,35U/mL de atividade de lipase, respectivamente.

Os resultados obtidos do fungo 110 demonstram que houve produção de lipase, mas não de maneira significativa.

As lipases do fungo 129 foram produzidas em maior quantidade na combinação 7,5 FS + 2,5 BC, na umidade 40% (10,1U/mL).

A imobilização com celite não se mostrou eficaz para as enzimas produzidas em larga escala, mas o método de liofilização apresentou grande importância no tratamento dessas, aumentando suas atividades enzimáticas de maneira significativa.

Como uma forma de dar continuidade ao trabalho desenvolvido, proponho a busca por suportes mais eficientes para a imobilização das lipases produzidas, para torná-las mais eficientes e ativas quimicamente, passíveis de reutilização, sem que percam sua atividade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional do Petróleo - Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, Art. 2º.

AL-ZUHAIR, S.; DOWAIDAR, A.; KAMAL, H. - Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, nº 2-3, p. 256, 2009.

AL-ZUHAIR, S. - Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bioproducts Biorefining**, v. 1, p. 57, 2007.

AL-ZUHAIR, S.; JAIRAMAN, K. V.; KRISHNAM, S.; CHAN, W. H. - The effect of fatty acid concentration and water content on the production of Biodiesel by lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, nº 2, p. 212, 2006.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. - Seed Lipases: Sources, Applications and Properties - A Review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 15, 2010.

CALADO, C. R. C.; MONTEIRO, S. M. S.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA L. P. - Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, nº 3, 4, p. 354, 2002.

CASTIGLIONI, G. L. - Estudo da produção e utilização de lipase de *Brukholderia cepacia* na síntese enzimática de biodiesel. 2009. 153 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Unicamp. Campinas.

DANTAS, M. B. *et al.* - Obtenção de biodiesel através da transesterificação do óleo de milho: conversão em ésteres etílicos e caracterização físico-química. I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. Brasília, 2006.

DEMIRBAS, A. - Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 14, 2009.

DHEEMAN, D. S. *et al.* - Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain penicillium sp. ds-39 (dsm 23773). **Journal of molecular catalysis b: enzymatic**. v. 72, p.256-262. Novembro 2011.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. - Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, nº 1. 2005.

FLEURI, L. F. e MACEDO, G. A. - Desenvolvimentos de biocatalisadores com tecnologia nacional visando à obtenção de bioprodutos de interesse da indústria do petróleo: produção e imobilização de lipases. Relatório de Pesquisa para Petrobrás, 2009, 90 p.

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

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

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. - Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, nº 5, p. 405, 2001.

GUAN, G.; SAKURAI, N.; KUSAKABE, K. - Synthesis of biodiesel from sunflower oil at room temperature in the presence of various cosolvents. **Chemical Engineering Journal**, v. 146, p. 302, 2009.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGER, 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, n° 21, p. 5249, 2009.

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

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANE, D. - Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n°1, p. 155, 2004. International Energy Agency (IEA), 2009, em www.iea.org. Capturado em 12/11/2009.

ISO, M.; CHENB, B.; EGUCHI, M; KUDO, T.; SHRESTHA, S. - Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53, 2001.

LIMA, U. A; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E. - **Biotecnologia Industrial**, v. 3. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. - Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n°3, p. 1, 2011.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. A.; RANDALL, R. J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.

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

MAHADIK, N. D.; PUTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. - Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715- 721, 2002.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. - Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300, 2007.

MENDES, A. A. - Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel. 2009. 194 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - UFSCAR. São Carlos.

MESSIAS, J. M. *et al.* - Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. Londrina, v. 32, p.213-234. 2011.

NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. - Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p.142, 2006.

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

SALIHU, A. *et al.* - Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, conservation and recycling**. v. 58, p. 36–44. Elsevier. Janeiro 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. – **Biotecnologia Industrial**, v. 3. São Paulo. Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. - Biodiesel preparation by lipase catalysed transesterification of *Jatropha* oil. **Energy fuels**, v. 18, p. 154, 2004.

STAMENKOVIĆ, O. S.; VELIČKOVIĆ, A. V.; VELJKOVIĆ, V. B. - The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives. **Fuel: The Science and Technology of Fuel and Energy**. v. 90, p. 3141-3155. Elsevier. Novembro 2011.

BARBOSA, C. R. - Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel com substrato para a produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. 2009. 133 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena - USP. Lorena.

PAIVA, E. J. M. de. - Estudo da produção de biodiesel a partir de óleo de babaçu e etanol utilizando transesterificação alcalina tradicional com agitação mecânica e assistida por ultrassons. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena - USP. Lorena.

PEZZO, C. R.; AMARAL, W. A. N. do. - O papel do Brasil no estabelecimento do mercado internacional de biocombustíveis. **Rev. USP**, São Paulo, n. 75, nov. 2007.

RODRIGUES, R. C. - Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.