



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA**

Sabrina Moro Villela Pacheco

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASE DE FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DO EFLUENTE
DE ABATEDOURO DE FRANGOS**

Florianópolis

2012

Sabrina Moro Villela Pacheco

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASE DE FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DO EFLUENTE
DE ABATEDOURO DE FRANGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química,
como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor em Engenharia
Química. Área de Concentração:
Desenvolvimento de Processos
Químicos e Biotecnológicos.
Orientador: Prof. Dr. Ayres Ferreira
Morgado
Coorientador: Prof. Dr.
Agenor Furigo Junior

Florianópolis

2012

Sabrina Moro Villela Pacheco

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASE DE FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DO EFLUENTE
DE ABATEDOURO DE FRANGOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 09 de março de 2012.

Prof. Dr. Ayres Ferreira Morgado
Orientador – Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Coorientador - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Prof^ª.Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares
Universidade FURB

Prof^ª. Dra. Maria Manuela Camino Feltes
Instituto Federal Catarinense

Prof^ª. Dra. Denise Esteves Moritz
Universidade UNISUL

Prof^ª. Dra. Débora de Oliveira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Javier Ignacio Vernal
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, que nesses doze anos de convívio colaborou para minha formação científica e humana.

Ao professor Ayres Ferreira Morgado pela orientação deste trabalho;

Ao professor Agenor Furigo Junior pela coorientação deste trabalho;

Aos membros da banca de avaliação por aceitarem o convite e se disponibilizarem a ler e analisar esse trabalho;

À professora Denise Esteves Moritz pelas valiosas sugestões com relação à execução deste trabalho;

Ao ex-colega de laboratório Francielo Vendruscolo pelas ricas conversas e troca de ideias;

Ao amigo e colega Américo Cruz Júnior pelo incentivo e ajuda na execução das atividades experimentais;

Aos alunos de iniciação científica Joel Pires Viana Júnior, Bruna Sampaio Slussarek, Daniel Diniz e Nathália Correa Lima que colaboraram imensamente para a execução deste projeto;

Aos colegas de laboratório Gisanara Dors, Maria Manuela Camino Feltes, Jaciane Ienczak, Beatriz Salomão, Morgana Zimmermann, Siannah Maria Mas Diego, Kelin de Menezes Quines e demais colegas pelo bom convívio, incentivo e amizade;

À ex-colega de laboratório Cristiane Martins Isnardi pelo auxílio nas atividades de laboratório e pela amizade;

Ao colega e amigo Robson Leandro Schacker pelas ricas conversas sobre os experimentos;

Ao colega João Renato de Mendonça Strelau pelas análises de cromatografia gasosa;

Ao querido Léo Serpa pelo auxílio nas análises estatísticas;

Ao Edevilson, secretário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pelo apoio, comprometimento e dedicação para a resolução das questões burocráticas;

À Semíramis Maria Duarte Dutra do Setor de Micologia do Laboratório Central de Saúde Pública de Florianópolis;

Ao CNPQ pelo período de recebimento da bolsa de doutorado;

Ao Laboratório QUITECH do departamento de química (UFSC), pela gentil doação da quitosana;

À Prefeitura Municipal de Garopaba pelo transporte escolar;

Agradeço especialmente ao Luiz Antonio e ao Jr. por colaborarem imensamente para a minha formação humana e por conspirarem intensamente para a realização deste projeto;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo
as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

RESUMO

Este trabalho ilustra três linhas de pesquisa que se interconectam para atingir um objetivo final, o de verificar a potencialidade de produção de biodiesel a partir de um material de partida ainda pouco estudado: o óleo de vísceras de frango e uma lipase obtida de uma cepa selvagem. Para isso, foram isoladas dezenove cepas fúngicas de um efluente bruto de um abatedouro de frangos, sendo que, destas, apenas três apresentaram atividade lipolítica. Através do cultivo das cepas em quatro formulações de meios de cultivo submersos, foi observado que o isolado 17 apresentou o maior valor de atividade enzimática, de 20,71 U/mL em meio de cultivo constituído por 50 mL efluente bruto de abatedouro de frangos, 0,5% (m/v) de peptona, pH inicial de 5,5, 0,25% (m/v) de óleo de oliva, 1% (m/v) de óleo de vísceras, 1% (m/v) de tween 80, 2% (m/v) de extrato de levedura, 1% (m/v) de NH_4Cl , 0,1% (m/v) de NaNO_3 , 0,1% (m/v) de KH_2PO_4 e 0,01% (m/v) de MgSO_4 . Por esse motivo, esse isolado foi selecionado para os experimentos seguintes de otimização da produção de lipase, que consistiram de um planejamento Plackett-Burman seguido por um planejamento composto central rotacional. Os resultados mostraram que, através do uso de um meio constituído por 50 mL efluente bruto de abatedouro de frangos, 0,5% (m/v) de peptona, pH inicial de 5,5, 0,25% (m/v) de óleo de oliva, 3,41% (m/v) de óleo de vísceras, 2% (m/v) de tween 80, 2% (m/v) de extrato de levedura, 1% (m/v) de NH_4Cl , 0,1% (m/v) de NaNO_3 , 0,1% (m/v) de KH_2PO_4 e 0,05% (m/v) de MgSO_4 , foi possível obter um máximo de rendimento de atividade enzimática de 43,51 U/mL. O extrato bruto foi concentrado utilizando-se sulfato de amônio a 40%. O concentrado enzimático foi imobilizado em esferas de quitosana/argila ativadas com glutaraldeído 3% (v/v). O rendimento de imobilização atingido foi de 80%. A análise do comportamento de atividade enzimática do extrato bruto e da enzima imobilizada foi realizado frente a diferentes temperaturas, pH(s), solventes, íons metálicos e tempo de estocagem. Para esses ensaios observou-se que a enzima imobilizada adquiriu maior estabilidade, porém a mesma não foi estável após cinco ciclos de reuso para a reação de hidrólise. Ensaios para obtenção de ésteres etílicos foram realizados com quatro sistemas diferentes envolvendo óleo de soja refinado, óleo de vísceras, extrato bruto enzimática e uma lipase comercial (Novozym 435). Os resultados revelaram que os ensaios utilizando óleo de soja com a lipase comercial e com a lipase do extrato bruto acarretaram nos

maiores valores de conversão em ésteres, de 90,32 e 54,58%. Já os ensaios utilizando o óleo de vísceras com Novozym 435 e extrato bruto acarretaram em 35,17% e 28,11%. Apesar do fato do uso dos últimos sistemas apresentarem baixas taxas de conversão em ésteres, é importante ressaltar que os estudos realizados não são suficientes para descartar a possibilidade do uso deste tipo óleo para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: isolamento; fungos; lipases; óleo de vísceras; imobilização; biodiesel.

ABSTRACT

This work presents three interconnected lines of studies in order to achieve a final goal: to verify the potential on biodiesel production from chicken viscera oil, a less studied starting material, and lipase obtained from a wild type fungal strain. In order to analyze this potential, nineteen fungal strains were isolated from a chicken slaughterhouse raw effluent, and, among those, only three showed lipolytic activity. By cultivating the strains in four types of submerged culture, it was observed that isolated 17 showed the highest enzymatic activity value, 20.71 U/mL, in the culture consisting of NaNO_3 (w/v) + KH_2PO_4 (w/v) + MgSO_4 (w/v) + Tween 80 (w/v) + raw effluent from a chicken slaughterhouse. Therefore, the isolated 17 was selected to the following experiments on lipase production optimization which consisted of a Plackett-Burman experimental design followed by a rotational, central and composite planning. Results showed that through a culture consisting of 3.41% (w/v) viscera oil, 2% (w/v) of Tween 80, 2% (w/v) of yeast extract, 1% (w/v) of NH_4Cl , 0.1% (w/v) of NaNO_3 , 0.1% (w/v) of KH_2PO_4 , 0.5% (w/v) of peptone, 0.25% (w/v) of olive oil, 0.05% (w/v) of MgSO_4 and 50 mL of effluent to solubilize the components, with initial pH of 5.5, it was possible to obtain a maximum enzymatic activity yield of 43.51 U/mL. The raw extract was concentrated to 40% by using ammonium sulfate. The enzymatic concentrated was then immobilized in activated chitosan/clay spheres with 3% (v/v) glutaraldehyde. The immobilization yield obtained was 80%. Both the raw extract and immobilized enzyme enzymatic activity behavior was analyzed at different temperatures, pH (s), solvents, metallic ions and storage time. Those analyses showed that the immobilized enzyme acquired greater stability; however, it did not remain stable after being reused for five cycles in hydrolysis reaction. Experiments for obtaining ethyl esters were performed with four different systems involving refined soybean oil, viscera oil, enzymatic raw extract and a commercial lipase (Novozym 435). Results showed that the use of soybean oil with commercial lipase and raw extract lipase presented the highest values of conversion into esters, 90.32% and 54.58%. Tests using viscera oil with Novozym 435 and raw extract resulted in 35.17% and 28.11% esters conversion. Despite the fact that the last systems presented low rates of esters conversion, it is important to highlight that the studies performed are not sufficient to rule out the

possibility of biodiesel production from viscera oil.

Keywords: isolation, fungi, lipases, viscera oil; immobilization; biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Obtenção de combustíveis líquidos a partir de ácidos graxos e triacilgliceróis pelas reações de: (i) craqueamento de óleos ou gorduras; (ii) craqueamento de ácidos graxos; (iii) transesterificação de óleos ou gorduras e (iv) esterificação de ácidos graxos. Note que as equações não estão balanceadas.....	38
Figura 2 - (a) Mono-, (b) Di- e (c) Triacilgliceróis formados a partir de ácidos graxos capríco (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0)..	39
Figura 3 - Etapas intermediárias e global de produção de ésteres alquílicos e glicerol a partir de triacilgliceróis e um álcool.....	40
Figura 4 - Parâmetros primários e secundários que afetam o rendimento da produção do biodiesel através de síntese enzimática	42
Figura 5 - Classificação da lipase.	49
Figura 6 - Estrutura da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> . Na imagem é ilustrada a “lid” nas conformações aberta em laranja e fechada em verde. O substrato é representado na cor violeta.....	51
Figura 7 - Representação do ciclo catalítico das lipases catalisando reação de hidrólise ou transesterificação. A letra a) representa o sítio catalítico da lipase; b) representa o substrato; c) intermediário tetraédrico - acilação; d) álcool liberado na reação; e) complexo acil enzima; f) R ₂ = hidrogênio ou grupo alquil; g) intermediário tetraédrico – desacetilação; h) éster ou ácido carboxílico liberado na reação.	52
Figura 8 - Representação esquemática das principais reações catalisadas pelas lipases.....	53
Figura 9 - Representação da reação de transesterificação de materiais contendo ácidos graxos livres com alcoóis alifáticos com cadeia curta. Na ilustração R _n =R ₁ , R ₂ , R ₃ ou R ₄ , onde R _n =alquil. O grupo alquil poderá ser: metil, etil, 1-propil, 2-propil, 1-butil e isobutil.....	55
Figura 10 - Esquema geral de um programa de seleção de micro-organismos.....	57
Figura 11 - A) Aspecto de uma colônia contida em fragmentos de grama. O halo trata-se de um éster de cálcio formado pela ação da lipase sobre o tween 80 e cloreto de cálcio no meio de cultivo; B) Aspecto de uma colônia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> cultivada	

em meio com óleo de oliva, sais biliares e corante Azul vitória B; C)	
Aspecto de uma colônia de <i>Bacillus megaterium</i> em meio de cultivo contendo óleo de oliva e rodamina B sob a luz UV 365 nm.....	59
Figura 12 - Percentual de artigos publicados desde 2008 em relação à produção ou caracterização de biodiesel produzido a partir de resíduos gordurosos e óleos vegetais.	61
Figura I.1 - Resumo dos métodos realizados para o cumprimento das etapas do capítulo I.....	72
Figura I.2 - Método utilizado para o espalhamento do efluente sobre o meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol.....	74
Figura I.3 - Aparato montado para a realização do microcultivo....	77
Figura I.4 - Método utilizado para análise da macrocolônia e medidas de crescimento micelial radial.....	78
Figura I.5 - Raias traçadas nas placas de Petri para as leituras dos crescimentos miceliais radiais.....	79
Figura I.6 - Processo para obtenção da solução usada para a inoculação dos isolados fúngicos nas placas de Petri para análise de crescimento radial (A) e para a obtenção do extrato bruto contendo enzimas extracelulares com atividade lipolítica (B).....	81
Figura I.7 - Constituição dos meios de cultivos 1, 2, 3 e 4.....	82
Figura I.8 - Reação de hidrólise enzimática do <i>p</i> -nitrofenilpalmitato.	83
Figura I.9 - Método usado para análise de atividade enzimática.....	84
Figura I.10 - Aspecto do efluente enriquecido com extrato de levedura após 3 dias de incubação em <i>shaker</i> orbital.....	91
Figura I.11 - Fungos filamentosos crescidos em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol (A) e os mesmos fungos após processo de isolamento (Figuras B, C e D).....	91
Figura I.12 - Aspecto das culturas oriundas da inoculação do efluente bruto de abatedouro de frangos em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol (A) aveludado; (B) algodinoso e (C) pulverulento ou furfurácea (com aspecto de farinha).....	92
Figura I.13 - Imagem de 12 dos 19 isolados fúngicos armazenados em tubos de ensaio com meio inclinado de ágar Sabouraud e cloranfenicol.....	93
Figura I.14 - Placa de Petri com meio 1. Os orifícios foram preenchidos com soluções de diferentes porcentagens de lipase (5 a 100%). (A) Placa iluminada com luz UV 365 nm, onde as setas indicam os halos observados; (B) Placa iluminada com luz UV 256	

nm.....	95
Figura I.15 - Placa de Petri com meio 2. Os orifícios foram preenchidos com soluções de diferentes porcentagens de lipase (5 a 100%). (A) Placa iluminada com luz UV 365 nm; (B) Placa iluminada com luz UV 256 nm.....	96
Figura I.16 - Tubo de ensaio com meio 2, após sete dias decorridos da inoculação de <i>Penicillium</i> sp.....	96
Figura I.17 - Setas indicando a formação do precipitado de ésteres de cálcio proveniente da produção de lipase extracelular de <i>Rhizopus oryzae</i> em tubo de ensaio com meio 3 inclinado, após 4 dias de incubação em estufa microbiológica a 25 °C.....	97
Figura I.18 - Curva de calibração obtida através da medida da altura do precipitado formado frente à adição de soluções com várias porcentagens de lipase comercial. No canto superior esquerdo da figura observa-se a formação do precipitado em um tubo de ensaio com o meio 3.....	98
Figura I.19 - Observação da formação do halo de ésteres de cálcio através do gotejamento de uma solução 80% (v/v) de lipase.....	98
Figura I.20 - Chave das classes de fungos.....	101
Figura I.21 - (A) Detalhe de hifa septada; (B) Hifa demácea; (C) Detalhe da morfologia do esporo; (D) Sequência dos conidióforos.	102
Figura I.22 - (A) e (B) Detalhes das hifas septadas; (C) e (D) Fragmentação das hifas.....	103
Figura I.23 - (A) e (B) Detalhe das hifas septadas.....	104
Figura I.24 - Análises microscópicas dos isolados 7 (A) e 17 (B) submetidos ao crescimento em meio BDA após 6 dias a 25 °C.....	104
Figura I.25 - Crescimento dos isolados 7 e 17 sobre meio de cultivo constituído por BDA pH 6,0 crescido a 25 °C ou Controle negativo, BDA + tween 80 crescido a 25 °C, BDA + tween 80 crescido a 40 °C e BDA pH 10,0 crescido a 25 °C.....	106
Figura I.26 - Representação das médias obtidas para as análises de atividade enzimática (U.mL ⁻¹) (hachuras cruzadas), pH final (listras verticais), biomassa (mg) (listras horizontais) do extrato bruto produzido com os isolados 7 e 17 nos meios de cultivo 1, 2, 3 e 4. As médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.....	110
Figura II.1 - Resumo dos métodos realizados para o cumprimento das etapas do capítulo II	123

Figura II.2 - Método adotado para a concentração do extrato bruto utilizando o sulfato de amônio.....	130
Figura II.3 - Método adotado para a precipitação de proteínas utilizando a acetona e etanol.....	130
Figura II.4 - (A) Resultados para atividade enzimática (U/mL), pH final e biomassa (g) para os 15 ensaios planejados; (B) Resultados dos efeitos e coeficientes para o planejamento PB.....	135
Figura II.5 - Erlenmeyer contendo meio descrito pelo ensaio 10 (50 mL efluente, 0,5% (m/v) de peptona, pH 5,5, 0,25% (m/v) de óleo de oliva, 1% (m/v) de óleo de vísceras, 1% (m/v) de tween 80, 2% (m/v) de extrato de levedura, 1% (m/v) de NH₄Cl, 0,1% (m/v) de NaNO₃, 0,1% (m/v) de KH₂PO₄, 0,01% (m/v) de MgSO₄) após 10 dias de incubação com o isolado 17 a 25 °C e 100 rpm.....	136
Figura II.6 - Gráfico dos valores dos resíduos versus probabilidade normal.	138
Figura II.7 - Coeficientes de regressão para a variável resposta. Os termos lineares são representados pela letra L.	139
Figura II.8 - ANOVA para a resposta atividade de lipase.....	139
Figura II.9 - (A) Superfície de resposta e (B) curvas de contorno para atividade enzimática obtida na otimização das condições para produção de lipase.....	141
Figura III.1 - Principais métodos de imobilização.....	148
Figura III.2 - Representação da estrutura química da quitosana..	150
Figura III.3 - Estrutura da esmectita. Os círculos cheios menores representam Si(IV) e os maiores representam Al(III) ou Mg(II); os círculos abertos são átomos de oxigênio.....	152
Figura III.4 - Resumo dos métodos realizados para o cumprimento das etapas do capítulo III.....	154
Figura III.5 - Método utilizado para a obtenção de ésteres etílicos de óleo de soja e óleo de vísceras.....	164
Figura III.6 - Esferas obtidas com as solução (a) 0,5 g argila e 0,5 g de quitosana; (b) 0,5 g de argila e 1,0 g de quitosana; (c) 1,0 g de argila e 0,5 g de quitosana e (d) 1,0 g de argila e 1,0 g de quitosana.	170
Figura III.7 - Modificação dos parâmetros geométricos (densidade, raio médio e porosidade) das esferas obtidas com as soluções (1) 0,5 g argila e 0,5 g de quitosana; (2) 0,5 g de argila e 1,0 g de quitosana; (3) 1,0 g de argila e 0,5 g de quitosana; (4) 1,0 g de argila e 1,0 g de quitosana. As barras representam o desvio padrão de cinco	

repetições.....	170
Figura III.8 - Curva de viscosidade do compósito quitosana/argila das soluções 2 e 4 (A) e das soluções 1 e 3 (B). As letras A e Q correspondem respectivamente a argila e quitosana.....	171
Figura III.9 - Parâmetros geométricos (densidade, raio médio e porosidade) das esferas de quitosana/argila. As esferas confeccionadas com a solução 4 são representadas pelo número 1 e as esferas confeccionadas com a solução 4 seguidas do processo de ativação com glutaraldeído 3% (v/v) são representadas pelo número 2 . As barras representam o desvio padrão de cinco repetições.....	173
Figura III.10 - Representação das ligações cruzadas entre duas cadeias poliméricas de quitosana com o glutaraldeído.....	174
Figura III.11 - Representação estrutural da enzima imobilizada sobre o suporte (esferas de argila/quitosana) com auxílio do glutaraldeído.....	175
Figura III.12 - Determinação da atividade enzimática relativa de hidrólise da enzima livre (símbolo aberto) e imobilizada (símbolo fechado) em tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 7,0, após um período de incubação de 54 minutos em temperaturas que variaram de 30 a 70 °C.....	178
Figura III.13 - Efeito de diferentes pHs sobre a atividade enzimática de hidrólise relativa da enzima livre (símbolo aberto) e imobilizada (símbolo fechado) a temperatura de 25 °C.....	181
Figura III.14 - Efeito de hexano (A) e heptano (B) em relação à atividade enzimática relativa da enzima livre (símbolo aberto) e a enzima imobilizada (símbolo fechado) a 25 °C.....	187
Figura III.15 - Efeito de Éter (A) e Acetona (B) em relação à atividade enzimática relativa da enzima livre (símbolo aberto) e a enzima imobilizada (símbolo fechado) a 25 °C.....	188
Figura III.16 - Efeito de Clorofórmio (A) e Etanol (B) em relação à atividade enzimática relativa da enzima livre (símbolo aberto) e a enzima imobilizada (símbolo fechado) a 25 °C.....	189
Figura III.17 - Efeito de Metanol (A) e Glutaraldeído (B) em relação à atividade enzimática relativa da enzima livre (símbolo aberto) e a enzima imobilizada (símbolo fechado) a 25 °C.....	191
Figura III.18 - Efeitos de diferentes íons metálicos e EDTA sobre a atividade relativa da lipase imobilizada em esferas de quitosana/argila a 30 °C. As barras representam o desvio padrão de três repetições.....	192

Figura III.19 - Efeito de diferentes substratos sobre a atividade enzimática de esterificação da lipase do extrato bruto do fungo isolado do efluente de abatedouro de frangos. As barras representam o desvio padrão de cinco repetições.....	197
Figura III.20 - Estabilidade operacional da lipase imobilizada em esferas de quitosana/argila a 25 °C frente a reação de hidrólise usando <i>p</i>-NNP como substrato.....	202
Figura III.21 - Espectro IV do óleo de vísceras.....	207
Figura III.22 - Cromatograma da amostra de óleo de vísceras. Os picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 referem-se aos ácidos mirístico, palmitoléico, palmítico, linoléico, oléico e esteárico, respectivamente.....	208
Figura III.23 - Os picos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem ao palmitoleato de etila, palmitato de etila, linoleato de etila, oleato de etila, estearato de etila, respectivamente.	214

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações industriais das lipases.	46
Tabela 2 - Comparação entre os métodos de produção de biodiesel através da catálise enzimática e catálise alcalina.	48
Tabela I.1 - Descrição dos métodos utilizados para análise das características físico-químicas do efluente bruto de abatedouro de frangos.....	73
Tabela I.2 - Cepas fúngicas utilizadas para a realização da validação do método para seleção dos isolados fúngicos produtores de lipases.	76
Tabela I.3 - Resultados obtidos para as médias dos parâmetros físico-químicos do efluente bruto.....	85
Tabela I.4 - Valores de parâmetros físico-químicos de efluentes brutos de abatedouro de frango obtidos na literatura utilizando os mesmos métodos descritos neste trabalho.....	86
Tabela I.5 - Resultados para o rastreamento primário de cepas fúngicas produtoras de lipase. Os símbolos (+++), (++) , (+) e (-) representam formação muito intensa de precipitado, formação média de precipitado, pequena formação de precipitado e nenhuma formação de precipitado, respectivamente.....	99
Tabela I.6 - Média de crescimento radial (cm/h) dos isolados 7 e 17 em diferentes meios e condições de cultivo.....	107
Tabela I.7 - Média de biomassa fúngica (g) dos isolados em diferentes meios e condições de cultivo.	108
Tabela II.1 - Delineamento experimental PB para o estudo de 11 fatores com 15 ensaios. Ilustração das variáveis codificadas com valores reais. X₁: Efluente (mL); X₂: Peptona (% m/v); X₃: pH inicial; X₄: Óleo de oliva (% m/v); X₅: Óleo de víscera (% m/v); X₆: tween 80 (% m/v); X₇: Extrato de levedura (% m/v); X₈: NH₄Cl (% m/v); X₉: NaNO₃ (% m/v); X₁₀: KH₂PO₄ (% m/v); X₁₁: MgSO₄ (% m/v).....	126
Tabela II.2 - Delineamento experimental CCD com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 4 repetições do ponto central. Ilustração das variáveis codificadas e reais.....	128
Tabela II.3 - Delineamento experimental PB e resultados. Ilustração das variáveis codificadas com valores reais. X₁: Efluente (mL); X₂:	

Peptona (% m/v); X ₃ : pH inicial; X ₄ : Óleo de oliva (% m/v); X ₅ : Óleo de víscera (% m/v); X ₆ : tween 80 (% m/v); X ₇ : Extrato de levedura (% m/v); X ₈ : NH ₄ Cl (% m/v); X ₉ : NaNO ₃ (% m/v); X ₁₀ : KH ₂ PO ₄ (% m/v); X ₁₁ : MgSO ₄ (% m/v); X ₁₂ : Atividade enzimática (U/mL).....	132
Tabela II.4 - Delineamento experimental CCD com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 4 repetições do ponto central. Representação das variáveis com valores reais.....	137
Tabela II.5 - Resumo dos resultados relativos aos procedimentos utilizados para a concentração do extrato bruto obtido através do cultivo submerso com o isolado fúngico. Ilustração das variáveis codificadas com valores reais . Pt: proteínas totais (mg/mL); A: Atividade enzimática (U/mL); As: Atividade específica (U/mg); η: Rendimento (%); Fp: Fator purificação.....	142
Tabela III.1: Condições utilizadas para o teste de estabilidade com a enzima livre e imobilizada.....	161
Tabela III.2 - Detecção do pH que acarretou nos maiores valores de atividade enzimática para lipases microbianas obtidas por outros autores.....	181
Tabela III.3 - Valores de log P para os solventes utilizados neste trabalho.....	184
Tabela III.4: Efeito da condição de estocagem sobre a atividade enzimática residual da lipase na forma livre e imobilizada.....	194
Tabela III.5 - Porcentagem de ácidos graxos constituintes do óleo de soja, oliva, mamona, girassol e óleo de vísceras.....	198
Tabela III.6 - Características físico-químicas do óleo de vísceras.	206
Tabela III.7 - Composição de ácido graxos do óleo de vísceras.....	208
Tabela III.8 - Valores de temperatura e tempo para reações de esterificação enzimática escolhidos por outros autores.....	211
Tabela III.9 - Resultados dos ensaios de obtenção de ésteres etílicos de óleo de soja e óleo de vísceras utilizando lipase do extrato bruto e Novozym 435.....	213

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – Ácidos graxos
ANOVA – Análise de variância
AOCS - *American Oil Chemists Society*
APHA - *American Public Health Association*
ATCC - *American Type Culture Collection*
BDA – Batata dextrose ágar
BHI – *Brain heart infusion*
CCD - *Central Composite Design*
CCT - Coleção de Culturas Tropicais
CEPA – Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola
DBO₅ -Demanda bioquímica de oxigênio medida após 5 dias
DQO – Demanda química de oxigênio
EC – *Enzyme Comission*
EDC - *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide*
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*
ENGEPIO – Laboratório de Engenharia Bioquímica
EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*
LABCAL – Laboratório de Análises do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública
LIMA – Lima Integrado de Meio Ambiente
log P - Coeficiente de partição
MSR – Metodologia de Superfície de Resposta
OG – Óleos e graxas
PB - Plackett-Burman
p-NNP - *p*-nitrofenilpalmitato
TAG - Triacilgliceróis
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
USPA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América
 γ -APTS - γ -aminopropiltriétoxissilano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	29
REVISÃO DA LITERATURA.....	35
1 BIOCOMBUSTÍVEIS.....	35
2 USO DE ÓLEOS VEGETAIS COMO BIOCOMBUSTÍVEIS.....	36
3 BIODIESEL.....	38
4 MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DO BIODIESEL.....	39
4.1 A INFLUÊNCIA DA FONTE LIPÍDICA.....	42
4.2 A INFLUÊNCIA DO ÁLCOOL.....	44
4.3 A INFLUÊNCIA DA RAZÃO ENTRE A FONTE LIPÍDICA E O ÁLCOOL.....	44
4.4 A INFLUÊNCIA DA FONTE DE LIPASE.....	45
4.5 LIPASES – DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E ATIVIDADE.....	48
4.6 LIPASES – ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO.....	53
5 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE.....	55
6 A CATÁLISE HETEROGÊNEA E A IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	59
JUSTIFICATIVA.....	61
CAPÍTULO I.....	65
ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE ENZIMA EXTRACELULAR COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ABATEDOURO DE FRANGOS CATARINENSE.....	65
I.1 RESUMO.....	66
I.2 ABSTRACT.....	66
I.3 INTRODUÇÃO.....	67
I.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
I.4.1 MATERIAL.....	72
1.4.2 métodos.....	72
I.4.2.1 Caracterização do efluente bruto de abatedouro de frangos	72
I.4.2.2 Isolamento dos fungos filamentosos a partir do efluente	74
I.4.2.3 Validação de métodos para determinação da atividade lipolítica.....	75

I.4.2.4	Análise das características dos isolados fúngicos.....	76
I.4.2.5	Análise de crescimento radial e características macroscópicas.....	80
I.4.2.6	Obteção do extrato bruto dos isolados fúngicos selecionados	81
I.4.2.7	Determinação da atividade enzimática.....	83
I.4.2.8	Análise de biomassa.....	84
I.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
I.5.1	Caracterização do efluente bruto do abatedouro de frangos.....	85
I.5.2	Isolamento dos fungos filamentosos a partir do efluente	90
I.5.3	Validação de métodos para determinação da atividade lipolítica.....	94
I.5.4	Avaliação da atividade lipolítica com o meio 3.....	98
I.5.4	Análise das características dos isolados fúngicos	101
I.5.5	Obtenção do extrato bruto contendo lipase.....	109
I.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
CAPÍTULO II	117
ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A MAIOR PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR POR FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO DE FRANGOS.....	117
II.1	RESUMO.....	118
II.2	ABSTRACT.....	118
II.3	INTRODUÇÃO.....	119
II.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	123
II.4.1	Material.....	124
II.4.2	Métodos.....	124
II.4.2.1	Variação dos constituintes do meio de cultivo para a produção de lipase pelo fungo isolado do efluente de abatedouro de frangos.....	124
II.4.2.1	Aplicação da metodologia rsm para otimização da produção de lipase pelo isolado fúngico.....	128
II.4.2.3	Concentração do extrato bruto.....	129
II.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
II.5.2	Estudo da variação dos constituintes do meio de cultivo para a produção de lipase pelo fungo isolado do efluente de abatedouro de frango.....	131

II.5.2.2 Aplicação da metodologia rsm para otimização da produção de lipase pelo fungo isolado do efluente de abatedouro de frangos.....	137
II.5.2.3 Concentração da lipase contida no extrato bruto.....	142
II.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
CAPÍTULO III.....	145
CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO DE FRANGOS NA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA COM POSTERIOR AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	145
III.1 RESUMO.....	146
III.2 ABSTRACT.....	146
III.3 INTRODUÇÃO.....	147
III.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	153
III.4.1 Material.....	154
III.4.2 Métodos.....	155
III.4.2.1 Confecção e caracterização do suporte para imobilização da lipase concentrada do extrato bruto.....	155
III.4.2.2 Ativação das esferas com glutaraldeído.....	157
III.4.2.3 Análise da atividade enzimática.....	157
III.4.2.4 Imobilização da lipase do extrato bruto concentrado.....	158
III.4.2.5 Determinação de proteínas totais.....	159
III.4.2.6 Determinação da termoestabilidade.....	159
III.4.2.7 Efeito de diferentes phs sobre a atividade enzimática.....	159
III.4.2.8 Efeito de diferentes solventes sobre a atividade enzimática.....	160
III.4.2.9 Efeito de diferentes íons sobre a atividade enzimática.....	160
III.4.2.10 Estabilidade frente à estocagem.....	160
III.4.2.11 Atividade de esterificação.....	161
iii.4.2.12 atividade de esterificação frente a diferentes substratos.....	162
III.4.2.13-Efeito do uso repetido sobre a atividade residual da enzima imobilizada.....	162
III.4.2.14-Análise do uso da lipase para produção de biodiesel.....	163

III.4.2.14 (A) Determinação da conversão em ésteres.....	164
III.4.2.15- Caracterização do óleo de vísceras.....	165
III.4.2.15 (A) Índice de acidez.....	166
III.4.2.15 (B) Índice de saponificação.....	166
III.4.2.15 (D) Densidade.....	167
III.4.2.15 (E) Análise de ácidos graxos.....	167
III.5 RESULTADOS.....	168
III.5.1 Preparação e caracterização das esferas de quitosana/argila.....	168
III.5.2 Imobilização da lipase do extrato bruto concentrado	174
III.5.3 Caracterização da lipase livre e imobilizada	176
III.5.3.1 Determinação da termoestabilidade.....	177
III.5.3.2 Efeito de diferentes pHs sobre a atividade enzimática	180
feito de diferentes solventes sobre a atividade enzimática...183	
III.5.3.4 Efeito de diferentes íons sobre a atividade enzimática	191
III.5.3.5 Estabilidade frente à estocagem.....	193
III.5.3.6 Atividade de esterificação	195
III.5.3.7 Atividade de esterificação frente a diferentes substratos.....	195
III.5.3.8 Efeito do uso repetido sobre a atividade residual da enzima imobilizada.....	201
III.5.3.9 Caracterização do óleo de vísceras.....	205
III.5.3.10 Uso da lipase obtida para produção de biodiesel...209	
II.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	218
CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	221
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	223
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	225

INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2011). Segundo informações divulgadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), os Estados Unidos lideram a produção mundial de carne de frango, seguido pela China e pelo Brasil. Em 2010, o Brasil produziu cerca de 12 milhões de toneladas de carne de frango (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2011).

O estado de Santa Catarina contribuiu de maneira significativa para este quadro, pois, em 2010, respondeu por 28,9% de participação no abate de aves, seguido logo atrás pelo Paraná, que foi responsável por 27,5% dos abates e o Rio Grande do Sul, que ficou com 16,0% do total. Juntos, os três estados do Sul somaram 72,4% de participação nos abates (EPAGRI - CEPA, 2011). Segundo dados do IBGE (2011), somente no segundo trimestre de 2011 foram abatidas no Brasil 1310 bilhão de frangos. Tais números revelam o crescimento constante da produção desse tipo de bem de consumo. Contudo, esse aumento também é proporcional ao impacto ambiental, principalmente em virtude dos resíduos gerados por essa atividade.

A produção de carne e seus derivados destinados ao consumo humano passa pelo processo de abate dos animais. Essa operação, bem como os demais processamentos industriais de carne, é regulamentada por uma série de normas sanitárias destinadas a fornecer maior segurança alimentar aos consumidores desses produtos (MALDANER, 2008).

O processo de abate dos frangos caracteriza-se pelas seguintes etapas: atordoamento, sangria, escaldagem, depenagem, escaldagem dos pés, evisceração, pré-resfriamento e embalagem. Em todas as etapas do processo um grande volume de água é utilizado, aproximadamente 30 litros por ave abatida, o que gera efluentes com elevada carga de matéria orgânica. Tais efluentes contêm elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que varia de 800 a 32000 mg/L; elevada concentração de óleos e graxas; materiais flotáveis (gorduras); alta concentração de sólidos sedimentáveis (podendo chegar até 15 g/L) e sólidos suspensos; alta concentração de nitrogênio orgânico; presença de sólidos grosseiros e micro-organismos patogênicos (SCARASSATI et al., 2003).

Segundo a Legislação Ambiental de Santa Catarina, Decreto Nº 14.250 - 1981, as empresas que emitem efluentes líquidos devem

submetê-los a um sistema de tratamento que permita a redução de, no mínimo, 80% da carga poluidora em termos de demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Para isso, as empresas, em especial os abatedouros, adotam sistemas de tratamento dos efluentes constituídos por um tratamento preliminar e primário (para remoção de sólidos, óleos e graxas) e tratamento secundário (para remoção da matéria orgânica dissolvida). A remoção da matéria orgânica dos efluentes é realizada especialmente através de tratamentos biológicos, tais como lodos ativados, filtros biológicos anaeróbios e aeróbios, lagoas aeradas, lagoas de estabilização e digestores de fluxo ascendente. De forma geral e, principalmente, por questões de custos de instalação e clima apropriado, os sistemas de tratamento secundário são constituídos por lagoas de estabilização (SPILLER, 2005).

As lagoas de estabilização podem ser definidas como a forma mais simplificada de tratamento de efluentes, consistindo em um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem de forma natural. O princípio básico consiste na capacidade de reciclagem natural dos elementos em um corpo d'água lântico (VON SPERLING, 2000). Entretanto, esse tipo de sistema possui sua eficácia seriamente afetada, caso ainda esteja presente no efluente a ser tratado um elevado teor de ácidos graxos e sólidos suspensos. Dentro desse contexto, o estudo de processos alternativos vem sendo intensamente realizado, especialmente envolvendo a aplicação de tratamentos prévios que visam a hidrólise dos sólidos, especialmente gorduras, para a melhoria do processo de biodegradação das etapas posteriores (MENDES et al., 2005; DORS, 2006).

Os ácidos graxos contidos nos efluentes de abatedouros além de reduzirem significativamente a eficácia do sistema de tratamento, representam uma perda industrial importante, pois várias pesquisas ilustram que tais resíduos podem ser eficientemente utilizados como fonte de energia sob a forma de biocombustível (GOMES et al., 2008; LOU; ZONG; DUAN, 2008; DIZGE et al., 2009).

Os biocombustíveis podem ser denominados como quaisquer combustíveis de origem biológica, desde que não sejam de origem fóssil. Dessa forma, são fontes de energia renováveis, disponíveis em grandes quantidades e derivadas de materiais orgânicos. Existem, atualmente, vários tipos de biocombustíveis: etanol, biodiesel, biogás, biomassa, biometanol e o biohidrogênio. Entretanto, o biocombustível denominado biodiesel tem se destacado por seu uso crescente.

De acordo com a Lei N° 11.097 de 13 de Janeiro de 2005, o biodiesel pode ser definido como um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia que possa substituir total ou parcialmente combustíveis de origem fóssil. É constituído por uma mistura de ésteres de ácidos graxos.

Segundo Nogueira (2011), enquanto a produção de petróleo bruto encontra-se relativamente estagnada, os biocombustíveis apresentam uma expansão significativa. De acordo com o Cenário de Políticas Alternativas, o uso do biodiesel em transportes rodoviários pode chegar a cerca de 7% em 2030. Apesar deste aumento na produção, a participação do biodiesel na produção agrícola continuará a ser relativamente modesta. Segundo esse cenário, a exigência de terras aráveis para a produção desse biocombustível precisa sofrer um aumento de 14 milhões de hectares em 2004, ou apenas 1% da área cultivada do mundo terreno, para 53 milhões de hectares em 2030, representando 3,8% das terras utilizadas na agricultura, o que depende fortemente da matéria-prima a ser utilizada.

Desde a década de 70, o Brasil realiza pesquisas com óleos vegetais para fins combustíveis. A primeira patente sobre os processos de transesterificação de óleos vegetais para fins combustíveis é do professor Expedido José de Sá Parente, da Universidade Federal do Ceará. A descoberta do combustível que poderia ser produzido, além dos óleos vegetais, também por gorduras animais, foi denominado na época de PRODIESEL (PARENTE, 2003).

Atualmente, sabe-se que as principais transformações químicas de óleos vegetais e de ácidos graxos em biodiesel são:

- Processo de transesterificação, que envolve a reação de alcoóis de cadeias curtas e ésteres na presença de um catalisador, dando origem a novos ésteres de ácidos graxos; ou reação, que envolve ácidos carboxílicos e ésteres, dando origem a novos ácidos carboxílicos e ésteres;

- Processo de esterificação, quando um ácido graxo reage com um álcool de cadeia curta, também na presença de um catalisador, dando origem a ésteres de ácidos graxos (SUAREZ; MENEGHETTI, 2007).

Dos processos citados, o mais usualmente utilizado é o processo de transesterificação, que por sua vez, pode ser realizado na presença de

um catalisador básico, ácido ou enzimático.

Os processos que envolvem a catálise enzimática vêm ganhando a atenção dos pesquisadores por se tratar de um processo que pode ser realizado em condições menos drásticas de temperatura, além de não produzir efluentes tóxicos. A catálise enzimática pode ser realizada com o uso de enzimas chamadas lipases. As lipases são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. Elas constituem uma classe especial de esterases. Devido ao seu amplo espectro de ação, tais enzimas são muito utilizadas nas indústrias de alimentos, fármacos, óleo-química e detergentes.

As lipases podem ser obtidas de animais, vegetais e micro-organismos. Entretanto, os micro-organismos, especialmente os fungos, produzem lipases de forma mais intensa e diversificada no que diz respeito às suas propriedades enzimáticas e especificidades pelos substratos, o que facilita, dessa forma, seu emprego em processos industriais.

Tendo em vista a diversidade das lipases microbianas e a reduzida fração de identificação de micro-organismos encontrados na natureza, a busca por novas espécies lipolíticas vem sendo cada vez mais intensificada. Apesar da ampla gama de aplicação das lipases, seu uso, assim como de quaisquer biocatalisador, é dificultado por estarem sujeitos à perda de atividade em diferentes condições físicas, químicas e biológicas. Para contornar esse problema, as enzimas podem ser imobilizadas. Para isso, existem vários métodos utilizados, tais como a imobilização covalente, a imobilização iônica, na forma de micelas reversas ou através de ligações covalentes entre as moléculas das enzimas com agente entrecruzante (SAID; PIETRO, 2004).

Dentro do contexto citado e, levando-se em consideração que o Governo Federal Brasileiro vem ofertando uma série de incentivos fiscais para o estímulo à pesquisa e abertura de usinas de Biodiesel em todo o território brasileiro procurando cumprir a Lei 11.097/05¹ o objetivo geral deste trabalho foi selecionar uma fonte fúngica de lipase, caracterizar a lipase produzida tanto na forma livre e imobilizada e avaliar seu potencial para a produção de biodiesel a partir de óleo não comestível de vísceras de frangos, obtido das instalações de um abatedouro da região da grande Florianópolis. Para se atingir esse

1 Lei 11.097/05 que garante a adição 5% de biodiesel ao óleo diesel até 2013.

objetivo, foram desenvolvidas as seguintes ações: 1) Caracterizar o óleo de vísceras e o efluente de abatedouro de frangos quanto às suas propriedades físico-químicas; 2) Isolar e selecionar fungos filamentosos presentes no efluente bruto do abatedouro que apresentam atividade lipolítica; 3) Realizar estudos visando a otimização da produção de lipase; 4) Caracterizar a lipase presente no extrato bruto do meio de cultivo e imobilizada em esferas de quitosana/argila; 5) Avaliar o potencial de aplicação da lipase produzida para a produção de biodiesel, utilizando como substrato o óleo de vísceras de frango do mesmo abatedouro de frangos.

Para organizar as informações citadas, este trabalho foi estruturado em três capítulos, com a seguinte disposição:

Capítulo I – Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de enzima extracelular com atividade lipolítica de um efluente de abatedouro de frangos catarinense;

Capítulo II – Estudos de otimização das condições experimentais para a maior produção de lipase extracelular por fungo filamentoso isolado de efluente de abatedouro de frangos;

Capítulo III – Caracterização da lipase de fungo filamentoso isolado de efluente de abatedouro de frangos na forma livre e imobilizada com posterior avaliação do seu potencial para a produção de biodiesel.

REVISÃO DA LITERATURA

Neste item serão abordados temas referentes ao trabalho realizado como um todo, visando proporcionar o embasamento teórico e fornecendo, desta forma, condições para o entendimento científico a partir de pesquisas já desenvolvidas.

1 BIOCOMBUSTÍVEIS

A revolução industrial foi um período marcado por diversos acontecimentos, dentre eles a introdução do carvão, que deu início a era dos combustíveis fósseis. Com o declínio das reservas mundiais de carvão, o petróleo consagrou-se como principal fonte energética mundial. Esse, no entanto, além de emitir grandes quantidades de gases poluentes é esgotável e suas maiores jazidas se localizam em regiões politicamente conturbadas, o que provoca contantes variações em seu preço. A busca por combustíveis alternativos vem ganhando destaque nas últimas décadas. A substituição dos combustíveis fósseis tem sido motivada por fatores ambientais, econômicos e sociais, uma vez que toda a sociedade depende de seu uso. Dentro desse contexto, uma alternativa que vem se destacando é o uso dos biocombustíveis (OLIVEIRA; SUAREZ; SANTOS, 2008).

O termo biocombustível refere-se ao combustível líquido ou gasoso que é predominantemente produzido a partir de biomassa. Uma grande variedade de combustíveis pode ser produzida a partir de biomassa, incluindo combustíveis líquidos, tais como o etanol, metanol, biodiesel e combustíveis gasosos, tais como o hidrogênio e o metano. Os combustíveis líquidos são primariamente usados em veículos, mas também podem ser usados em células combustíveis para a geração de eletricidade. São várias as razões para os biocombustíveis serem considerados relevantes tecnologias, tanto para os países emergentes, como para os países industrializados. Tais razões estão relacionadas à seguridade energética, a questões ambientais, à sustentabilidade e a questões relacionadas à socioeconomia do setor rural. As vantagens dos biocombustíveis são: a) o fato de serem facilmente disponíveis a partir de uma fonte comum de biomassa; b) representarem um ciclo fechado de dióxido de carbono, pois os derivados de petróleo aumentam a concentração de CO₂ na atmosfera, enquanto o uso de biomassa permite a reabsorção do CO₂ liberado, possibilitando que um ciclo quase

fechado de carbono seja estabelecido. Esse ciclo só não é fechado, pois em alguns casos utiliza-se combustível fóssil em alguma etapa da produção, tal como no transporte do produto; c) vem sendo considerados ambientalmente corretos, principalmente por serem biodegradáveis e contribuírem para sustentabilidade (DEMIRBAS, 2008).

2 USO DE ÓLEOS VEGETAIS COMO BIOCOMBUSTÍVEIS

Segundo Aranda (2009), as primeiras referências do uso de óleos vegetais *in natura* no Brasil datam da década de 20. Posteriormente, algumas pesquisas foram desenvolvidas no Instituto Nacional de Tecnologia, no Instituto de Óleos do Ministério da Agricultura e no Instituto de Tecnologia Industrial de Minas Gerais. Neste último, em 1950, registraram-se estudos sobre o uso dos óleos de ouricuri, mamona e algodão em motores diesel. A partir da década de 70, o cenário energético mundial era crítico, o que acabou incentivando a redução da dependência de petróleo importado, impulsionando novamente as pesquisas sobre o uso de óleos vegetais.

Diversos estudos realizados com óleos vegetais demonstraram que houve um bom rendimento quando os mesmos foram utilizados em máquinas agrícolas ou caminhões. No entanto, esses estudos demonstraram a existência de algumas desvantagens no uso direto dos óleos *in natura*: (a) ocorrência de excessivos depósitos de carbono no motor; (b) obstrução nos filtros de óleo e bicos injetores; (c) diluição parcial do combustível no lubrificante; (d) comprometimento da durabilidade do motor; (e) aumento considerável nos custos de manutenção e (f) possível formação de compostos lacrimogênicos (odor desagradável) e outros carcinogênicos, como as dioxinas (acroleína) (MENANI, 2008; RAMOS et al., 2003).

Outros estudos demonstraram que a alta viscosidade e a baixa volatilidade dos óleos vegetais *in natura* podem provocar sérios problemas ao bom funcionamento do motor. Para contornar as desvantagens citadas, houve um considerável investimento na adaptação dos motores para que o uso de óleos vegetais *in natura* pudesse ser viabilizado. Contudo, ainda fazia-se necessário desenvolver uma metodologia de transformação química do óleo para que suas propriedades se tornassem mais adequadas ao seu uso como combustível. Dessa forma, em meados da década de 70, surgiram no

Brasil as primeiras propostas para modificação de óleos vegetais, cujos objetivos eram melhorar sua qualidade de ignição, reduzir seu ponto de fluidez e ajustar os seus índices de viscosidade e densidade específica (KNOTHE et al., 2006).

As principais transformações químicas de óleos vegetais ou gorduras animais em espécies que possam ser usadas como biocombustíveis encontram-se na Figura 1. Além das reações ilustradas, é possível citar o processo de micro-emulsificação que se trata da solubilização de misturas de óleo vegetal/álcool através da adição de componentes anfifílicos²; a diluição com petrodiesel e a mistura de co-solventes, quando é aplicado um co-solvente para auxiliar no processo de solubilização da mistura de triacilglicerol/álcool (KNOTHE et al., 2006).

Apesar de atualmente existirem comissões no senado federal que defendem o uso do óleo vegetal *in natura* como combustível, conforme notícia publicada por Bernardo (2009), estudos realizados já na década de 30 recomendavam que, para se obter o maior valor combustível de óleos vegetais, seria necessário quebrar as ligações éster-glicerídicas dos óleos vegetais e usar diretamente os ácidos graxos remanescentes (NEWS, 1980). A afirmação citada foi um indicativo daquilo que hoje é conhecido como “biodiesel”.

2 Compostos Anfifílicos: Caracterizam-se por possuir em sua estrutura uma região polar e uma região apolar, a qual pode ser representada por uma ou mais cadeias hidrocarbônicas com mais de oito grupos metilênicos.

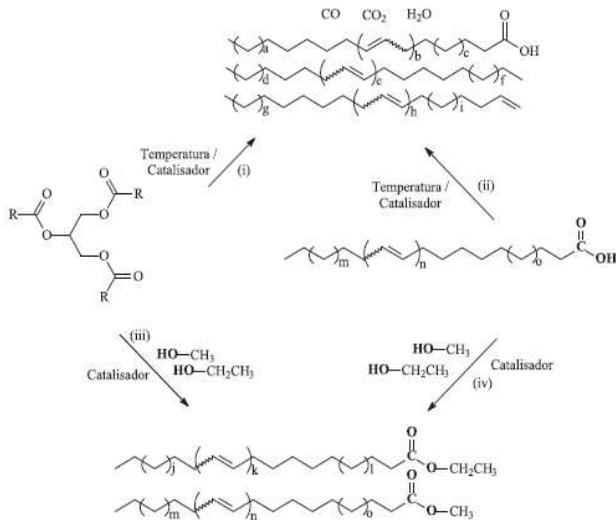


Figura 1 - Obtenção de combustíveis líquidos a partir de ácidos graxos e triglicilgliceróis pelas reações de: (i) craqueamento de óleos ou gorduras; (ii) craqueamento de ácidos graxos; (iii) transesterificação de óleos ou gorduras e (iv) esterificação de ácidos graxos. Note que as equações não estão balanceadas. Fonte: Suarez; Meneghetti (2007).

3 BIODIESEL

Os maiores componentes de óleos vegetais e gorduras animais são os triacilgliceróis (TAG: muitas vezes chamados triglicerídeos). Quimicamente, os TAGs são ésteres de ácidos graxos (AG) com glicerol (1,2,3 propanotriol), conforme apresentado na Figura 3.

Os TAGs de óleos vegetais e gorduras animais contêm tipicamente diferentes tipos de AGs. Dessa forma, diferentes AGs podem estar ligados à cadeia do glicerol. Os diferentes AGs que estão contidos nos TAGs revelam o perfil de AG (ou composição em AG) de óleos vegetais e gorduras animais. Como cada AG apresenta

propriedades químicas peculiares, o perfil de AG é provavelmente o parâmetro de maior influência sobre as propriedades dos óleos vegetais e gorduras animais de onde se originam.

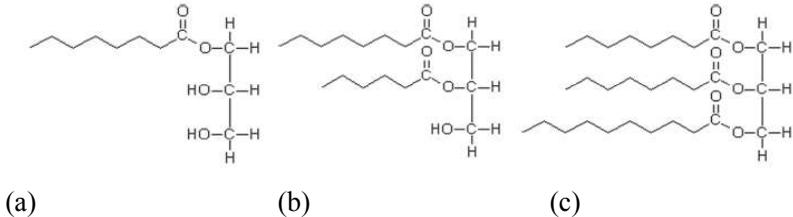


Figura 2 - (a) Mono-, (b) Di- e (c) Triacilgliceróis formados a partir de ácidos graxos capríco (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0). Fonte: Oliveira; Suarez; Santos (2008).

A obtenção do biodiesel propriamente dito pode ser realizada através de uma reação de transesterificação ou de uma reação de esterificação. A reação de esterificação se caracteriza pela reação reversível entre um ácido carboxílico e um álcool produzindo éster e água. Por outro lado, a transesterificação é caracterizada por uma reação entre um éster e um álcool, da qual resulta um novo éster e um álcool. Das reações citadas, a mais utilizada para a produção de biodiesel é a reação de transesterificação, pois fornece um coproduto que possui diversas aplicações em vários segmentos industriais: o glicerol (KNOTHE et al., 2006).

4 MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DO BIODIESEL

Conforme citado anteriormente, o processo mais utilizado para a produção de biodiesel é através da reação de transesterificação. Nesta reação, a produção de biodiesel forma ésteres alquílicos e glicerol, sendo que a camada deste poliálcool, mais densa que os ésteres, se deposita no fundo do recipiente da reação. O processo se baseia na reação estequiométrica do álcool glicerol com álcool em presença de um catalisador (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

O processo global de transesterificação de óleos vegetais e gorduras é uma sequência de três reações reversíveis e consecutivas em que os mono e os diacilgliceróis são intermediários das reações, conforme a Figura 3.

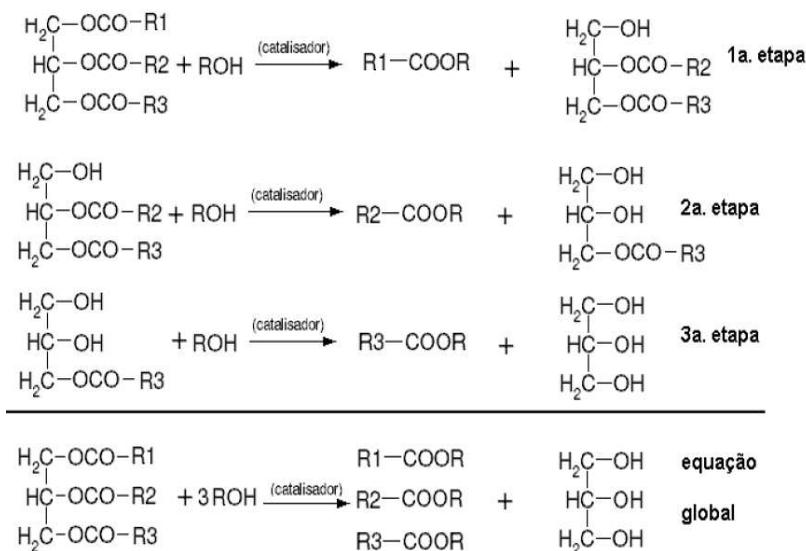


Figura 3 - Etapas intermediárias e global de produção de ésteres alquílicos e glicerol a partir de triacilgliceróis e um álcool. Fonte: Krause (2008).

As reações de transesterificação podem ser conduzidas através do uso de um catalisador ácido ou básico, catalisador enzimático ou fluidos supercríticos (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

Na catálise ácida são normalmente utilizados: ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorídrico e ácidos sulfônicos. Embora a reação de transesterificação catalisada por ácidos seja mais lenta em relação à mesma reação catalisada por álcalis, ela apresenta a vantagem de ser mais indicada para matérias-primas que não contenham uma elevada porcentagem de ácidos graxos livres e água.

Na catálise básica são normalmente utilizados: hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonatos e alcóxidos, tais como o metóxido de sódio, etóxido de sódio, propóxido de sódio e o butóxido de sódio. As reações de transesterificação catalisadas por reagentes álcalis ocorrem a velocidades que chegam a ser quatro mil vezes mais rápidas que a catálise ácida. Por esse motivo, é o tipo de catálise mais utilizada comercialmente. Conforme já mencionado, as reações que ocorrem com reagentes alcalinos precisam ser processadas em materiais isentos de água devido às possíveis reações de saponificação, especialmente

quando o catalisador utilizado é o hidróxido de sódio. O sabão formado consome o catalisador e reduz a eficiência catalítica bem como causa um aumento na viscosidade, a formação de géis e a dificuldade de separar o glicerol. Alguns autores sugerem que o conteúdo de ácido graxos livres seja menor que 0,5%, enquanto outros sugerem que a matéria-prima usada seja totalmente isenta de ácidos graxos livres e água (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

Embora a transesterificação usando um catalisador álcali forneça elevadas taxas de conversão de triglicilgliceróis para os seus correspondentes ésteres em curtos períodos de tempo, a reação possui inúmeros inconvenientes: o elevado custo para a recuperação do glicerol; a necessidade de o catalisador ser removido do produto; a produção de resíduos alcalinos que precisam de tratamento; o fato de os ácidos graxos livres e a água prejudicarem a reação. Tais inconvenientes impulsionaram os pesquisadores a buscarem novos catalisadores. Nesse contexto, a produção de biodiesel catalisada pelas lipases vem recebendo atenção especial por eliminar ou reduzir os problemas citados acima, tornando-se uma promissora rota alternativa às tradicionais rotas químicas (ANTCZAK et al., 2009).

No caso do biodiesel, sabe-se que, para a produção com elevados rendimentos do mesmo através da catálise enzimática, vários fatores possuem papel importante no processo, tais como o tipo do álcool utilizado, a fonte lipídica, a razão molar entre a fonte lipídica e o álcool, a temperatura, o tipo de solvente orgânico (se houver), a quantidade de água e a fonte de lipase utilizada. A Figura 4 possui a relação dos principais fatores citados.

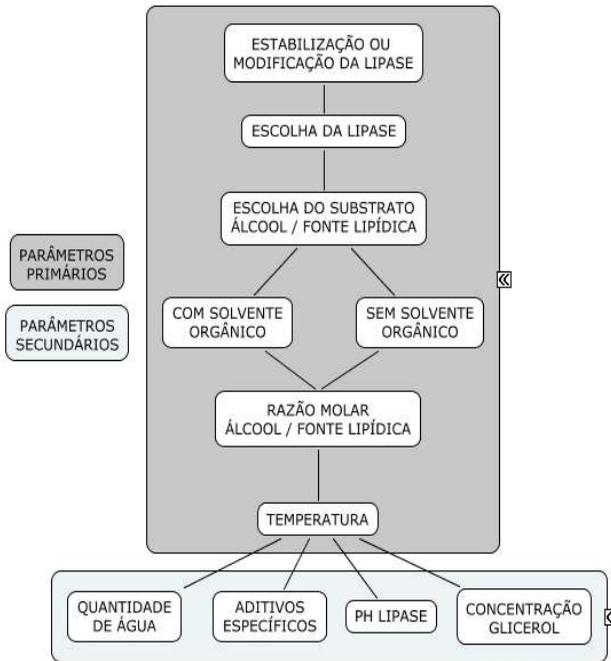


Figura 4 - Parâmetros primários e secundários que afetam o rendimento da produção do biodiesel através de síntese enzimática. Fonte: Antczak et al. (2009).

4.1 A INFLUÊNCIA DA FONTE LIPÍDICA

Um fator importante a ser considerado para a comercialização do biodiesel é o seu custo. Segundo Zhang et al. (2003), o biodiesel possuía um custo aproximado de US\$ 0,5 por litro, enquanto o diesel de petróleo custava aproximadamente US\$ 0,35 por litro. De acordo com os autores, o alto custo do biodiesel é vinculado principalmente a natureza da fonte lipídica. O uso de óleos vegetais de alta qualidade geram um biodiesel com interessantes características energéticas, porém, com elevado custo. Para reduzir os custos do biodiesel novos métodos e materiais de partida vem sendo estudados, tais como óleos vegetais usados em frituras, sebo, efluentes ricos em lipídeos, especialmente das indústrias de laticínios, abatedouros, alimentos enlatados, cervejarias, processamento de óleos comestíveis, aterros sanitários e esgotos domésticos. Dentre os diversos

materiais de descarte é possível destacar os resíduos dos abatedouros e frigoríficos de frangos.

Os efluentes gerados por tal segmento industrial possuem como principal característica a elevada carga de matéria orgânica, composta por gorduras oriundas do processo industrial e do processamento dos subprodutos (vísceras, ossos, sangue, penas e partes condenadas) que, por sua vez, são convertidos em farinhas que servirão como insumo na formulação de rações. O excedente de gordura, principalmente das vísceras, é extraído com auxílio de centrifugas e encaminhado principalmente para fábricas de ração, sabão e pneus. A extração ocorre primeiramente através da separação da fase líquida e sólida, quando o líquido é separado em fase hidrofílica e fase hidrofóbica. Geralmente, a fase hidrofóbica (óleo) possui acidez em torno de 1,2% e umidade em torno de 0,2%, índices favoráveis para o processo de transesterificação. Por outro lado, a gordura do efluente flotado possui um valor econômico menor, devido ao fato de possuir um elevado grau de acidez (GOMES, 2005).

Ainda de acordo com Gomes (2005), os efluentes gerados possuem uma concentração de óleos e graxas em torno de 1.000 mg/L de efluente. Considerando que, no abate de aves, são consumidos aproximadamente 30 litros de água por ave abatida, então para o abate de 100.000 aves por dia seriam gerados aproximadamente 3000 m³ por dia de efluentes. Por essa razão, poderiam ser extraídos 9 t de resíduos gordurosos por mês. Tais números ilustram a viabilidade econômica do uso desse tipo de material lipídico para a produção de biodiesel.

Através da comparação da gordura de frango com outras gorduras animais, como banha e sebo, é possível notar que geralmente há uma grande proporção de ácidos graxos insaturados presentes naquela. Esse fato explica a característica física desse tipo de gordura que é semissólida à temperatura ambiente. De acordo com Lee e Foglia (2000), a gordura de frango apresenta uma composição média de 60% de ácidos graxos insaturados. Desses, 22% são de ácido linolênico (C18:3) (ω 3), 20% de ácido oléico (C18:1) (ω 9) e 7% de ácido palmitoleico (C16:1) (ω 7). Apresenta também uma composição média de 43% de ácidos graxos saturados. Desses, 26% são de ácido palmítico (C16) e 0,7% de ácido esteárico (C18). Nesse caso, é interessante citar que a composição de ácidos graxos insaturados da gordura de frango é semelhante ao óleo de soja. Esse é um fator importante, pois o fato de tais gorduras apresentarem-se, de forma geral, no estado líquido (óleo),

facilita seu uso como material de partida nas reações de transesterificação.

4.2 A INFLUÊNCIA DO ÁLCOOL

Segundo Antczak et al. (2009), os alcoóis normalmente utilizados na produção do biodiesel são: metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol e iso-butanol. Dentre os alcoóis citados, o etanol e o metanol são os mais produzidos e utilizados na produção do biodiesel. Porém, os mesmos são agentes desnaturantes mais fortes que os alcoóis contendo cadeias carbônicas mais longas e, por sua vez, são os menos utilizados, principalmente devido aos elevados custos. Além disso, o rendimento das reações de transesterificação catalisadas enzimaticamente aumenta de acordo com o comprimento das cadeias carbônicas dos alcoóis. Geralmente os rendimentos de tais tipos de reações são dependentes de um equilíbrio entre a velocidade da reação e a taxa de desnaturação da enzima. Assim, estruturalmente a concentração do álcool afeta a estabilidade operacional da enzima e influencia na sua atividade. A seleção do sistema reacional contendo ou não um solvente orgânico baseia-se principalmente na questão da estabilidade operacional da enzima, pois usualmente solventes orgânicos caracterizam-se por proteger as enzimas da desnaturação citada anteriormente. Alguns estudos evidenciaram que sistemas contendo pequenas quantidades de água com etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol também protegem a enzima da desnaturação.

4.3 A INFLUÊNCIA DA RAZÃO ENTRE A FONTE LIPÍDICA E O ÁLCOOL

Devido às reações de transesterificação serem reversíveis, o excesso da massa de álcool em relação à massa de triacilgliceróis acarreta em um aumento na geração dos produtos. Por outro lado, também pode promover severa desnaturação enzimática. O metanol e óleos de plantas formam uma mistura quando a sua razão molar é de 1:1, a uma temperatura de 40 °C. A adição de solventes orgânicos aumenta a solubilidade do álcool na mistura, protege a enzima da desnaturação e garante transesterificação enzimática em uma única etapa.

A razão molar é associada com o tipo de catálise usada. Dessa forma, a reação com catálise ácida necessita de uma razão de 30:1 de butanol

para óleo de soja, enquanto que a mesma reação catalisada por álcalis requer uma razão de 6:1 para alcançar os mesmos rendimentos. Por outro lado, a razão mais indicada para um catalisador enzimático é de 3:1, dependendo, conforme visto anteriormente, do tipo de álcool e se existe ou não a adição de solvente orgânico (MA; HANNA, 1999).

4.4 A INFLUÊNCIA DA FONTE DE LIPASE

As lipases constituem o grupo de biocatalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas, pois apresentam a capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é restrito. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado por sua capacidade de utilização de uma ampla faixa de substratos, sua estabilidade frente a diferentes temperaturas, pH(s), com solventes orgânicos e sua quimio-regio e enantioseletividade (PAHOJA; SETHAR, 2002) (MANZANERA, 2011).

Atualmente, as lipases são largamente utilizadas no processamento de óleos e gorduras, detergentes, formulação desengraxantes, processamento de alimentos, síntese de produtos para a química fina e fármacos, manufatura de papel, produção de cosméticos e na degradação de efluentes gordurosos. Na área de detergentes, aproximadamente 1000 toneladas de lipases são comercializadas por ano (SAID; PIETRO, 2004). As aplicações industriais das lipases encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Aplicações industriais das lipases. Fonte: Said; Pietro (2004).

Indústria	Ação catalítica	Produto ou aplicação
Detergentes	Hidrólise de gordura	Remoção de manchas de óleo de tecidos
Laticínios	Hidrólise de gordura, amadurecimento de queijo	Desenvolvimento de sabor em leite, queijo e manteiga
Panificação	Melhoria do sabor	Prolongamento do tempo de prateleira
Bebidas	Melhoria do aroma	Bebidas
Molhos	Melhoria da qualidade	Maionese, molhos e coberturas
Suplementos alimentares	Transesterificação	Alimentos especiais
Frigoríficos	Desenvolvimento de sabor	Derivados de carne e peixe, remoção de gordura
Óleos e gorduras	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, glicerol, mono- e diglicerídeos

Produtos químicos	Enantioseletividade, síntese	Intermediários quirais, produtos químicos
Produtos farmacêuticos	Transesterificação, hidrólise	Lipídeos especiais, auxiliares digestivos
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, hidratantes
Couro	Hidrólise	Produtos de couro
Papel	Hidrólise	Papel de melhor qualidade
Produtos de limpeza	Hidrólise	Remoção de gordura

No que tange à aplicação das lipases na produção de biodiesel, é possível dizer que seu uso possui várias vantagens em relação ao uso de catalisadores alcalis, com exceção do custo do catalisador, conforme ilustra a Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação entre os métodos de produção de biodiesel através da catálise enzimática e catálise alcalina. Fonte: Fukuda; Kondo; Noda (2001).

Fatores para análise	Catálise alcalina	Catálise enzimática
Temperatura da reação	60 – 70 °C	30 – 40 °C
Ácidos graxos livres presentes no material de partida	Produtos saponificáveis	Ésteres metílicos*
Água presente no material de partida	Ocorre interferência na reação	Não ocorre interferência na reação
Rendimento de ésteres metílicos*	Normal	Alto
Recuperação do glicerol	Difícil	Fácil
Purificação de ésteres metílicos*	É necessário repetidas lavagens	Não é necessário nenhuma etapa de lavagem
Custos de produção do catalisador	Custo baixo	Custo elevado

* Exemplo de produção de ésteres utilizando o metanol como álcool nas reações de transesterificação.

4.5 LIPASES – DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E ATIVIDADE

De acordo com a IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), as lipases são classificadas como EC 3.1.1.3. A sigla EC significa *Enzyme Commission* e os quatro números seguintes

indicam, respectivamente, a classe da enzima, a subclasse, os grupos químicos específicos que participam da reação e a enzima propriamente dita. A lipase é classificada conforme ilustrado na Figura 5.

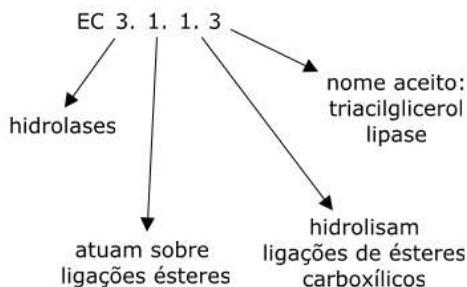


Figura 5 - Classificação da lipase. Fonte: NC-IUBMB (2011).

Apesar da classificação apresentada ser utilizada na maioria dos trabalhos científicos, ainda não existe consenso em relação à definição das lipases. Alguns autores adotam como critério o fato de algumas lipases catalisarem a hidrólise de ácidos graxos de cadeias longas a partir de acilgliceróis, atuando na interface lipídeo/água de um sistema bifásico. Nesse caso, tais lipases são denominadas como “true lipases” (ILLANES, 2008).

As lipases já foram definidas em termos cinéticos com base nos fenômenos de ativação interfacial. Segundo Verger (1997), esta propriedade não foi encontrada em outras enzimas semelhantes, como, por exemplo, as esterases, que, por sua vez, atuam em substratos solúveis em água. É importante ressaltar que os substratos utilizados e o modo de ação das lipases se assemelham muito ao das esterases. As características que distinguem as duas é o fato das lipases possuírem um aumento em sua atividade, quando atuam na interfase polar/apolar, e apresentarem maior afinidade por ácidos graxos de cadeias longas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Alguns autores, tais como: Côté e Shareck (2008), Lima et al. (2004) e Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999), comentam com mais detalhes sobre a especificidade das lipases, definindo as mesmas por sua habilidade de hidrolisar preferencialmente ácidos graxos contendo número igual ou maior que oito átomos de

carbono em pH alcalino.

O fenômeno de ativação interfacial foi observado pela primeira vez em 1936 por Holwerda. Holwerda observou que as lipases possuíam sua atividade aumentada frente a substratos insolúveis. Em 1990, a primeira elucidação tridimensional da estrutura da lipases foi realizada. A elucidação foi realizada com uma lipase pancreática humana e uma lipase de origem fúngica, proveniente de *Rhizomucor miehei* (Figura 6). Através desses ensaios e, mais recentemente, por técnicas de difração de raio X, tornou-se possível elaborar uma explicação para o fato de as lipases possuírem sua atividade aumentada quando atuam na interface lipídeo/água. Conforme descrito por Illanes (2008), o sítio ativo das lipases - constituído por uma cadeia polipeptídica com a sequência G-X1-S-X2-G¹ - é recoberto por uma espécie de “tampa” ou “lid” com característica anfipática. Quando essa espécie de tampa interage com a superfície lipídeo/água, a mesma sofre uma mudança conformacional, fazendo com que o sítio ativo torne-se disponível para se ligar ao substrato. No entanto, foi possível observar que em alguns casos ocorre a hidrólise de substratos solúveis em água sem necessariamente ocorrer a abertura da “tampa” através do fenômeno de ativação interfacial (VERGER, 1997). As lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica B* possuem essa característica (JAEGER, DIJKSTRA, REETZ, 1999). Existem ainda lipases consideradas como esterases pelo fato de não possuírem a “lid” ou possuírem de forma incompleta, não necessitando de interface para aumentar sua atividade. Para representar esse grupo, é possível citar as lipases de *Candida antarctica* e *Bacillus subtilis* (BARON, 2008).

Verger (1997) cita em seu trabalho que outros parâmetros também podem estar associados à exposição do sítio ativo com a abertura da “lid”, dentre os quais é possível citar a forma e a curvatura das moléculas dos substratos que podem atuar através do acoplamento dos mesmos à tampa, promovendo mudanças conformacionais. No sentido de ratificar tal afirmação, é possível citar o estudo de Secundo et al. (2006). Nesse trabalho, são ilustradas as análises da atividade enzimática e enantioselectividade utilizando diferentes substratos com lipases recombinantes. Tais lipases recombinantes possuíram a sequência de sua “lid” modificada. Os resultados mostraram que a “lid” está envolvida na modulação das propriedades funcionais das lipases,

1 As letras simbolizam os aminoácidos: G = glicina, X1= histidina, S= serina e X2= ácido aspártico ou glutâmico (SAID; PIETRO, 2004).

assim como todas as mudanças introduzidas afetam seu comportamento. A atividade, enantioseletividade, especificidade e estabilidade foram modificadas com as mutações inseridas na “lid”, revelando assim que tais modificações podem alterar completamente as propriedades das lipases.

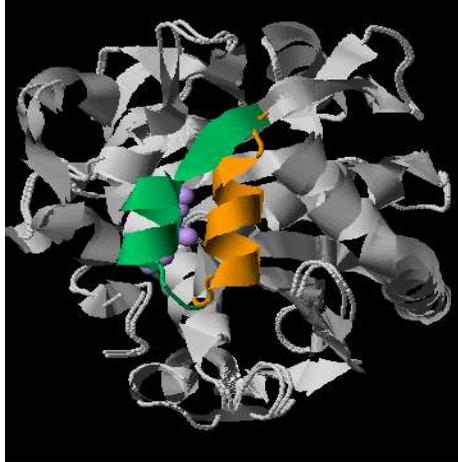


Figura 6 - Estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei*. Na imagem é ilustrada a “lid” nas conformações aberta em laranja e fechada em verde. O substrato é representado na cor violeta. Disponível em: <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc463a/molecular_graphics_gallery/jmol/Lipase_kenneth_A/lipase.html>. Acesso em: 15 mar. 2011.

Segundo Illanes (2008), as lipases possuem muitas semelhanças estruturais se comparadas a outras enzimas hidrolíticas, compartilhando inclusive os mesmos padrões de dobramento de algumas cadeias polipeptídicas. Conforme já citado anteriormente, o sítio ativo das lipases, constituído por serina, resíduos de ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina está localizado em uma região altamente conservada, formando um “cotovelo” nucleofílico. Nessa região, ocorre o ataque nucleofílico do oxigênio da serina ao átomo de carbono

carbonílico da ligação éster do substrato, que forma um intermediário acil-enzima estabilizado por ligações de hidrogênio com os resíduos que possuem o oxianion. O álcool é liberado e o complexo acil-lipase é finalmente hidrolisado para produzir os ácidos graxos e a enzima livre, fechando, desse modo, o ciclo catalítico, conforme ilustrado na Figura 7.

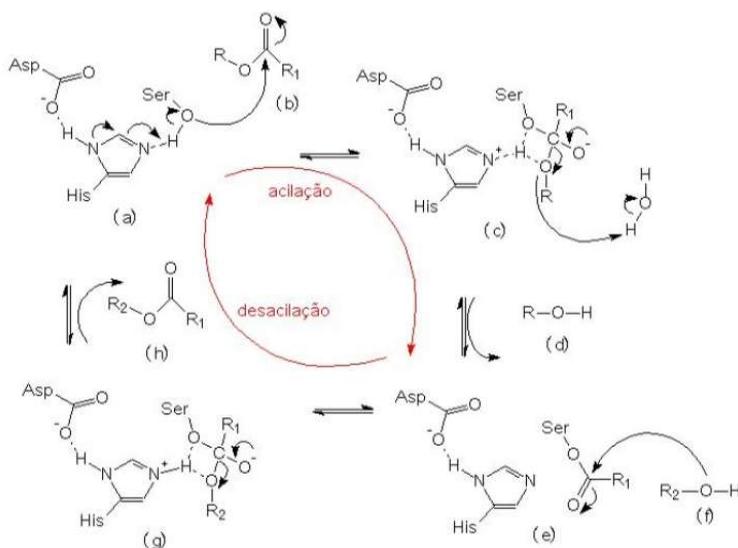
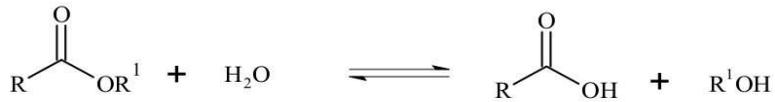


Figura 7 - Representação do ciclo catalítico das lipases catalisando reação de hidrólise ou transesterificação. A letra a) representa o sítio catalítico da lipase; b) representa o substrato; c) intermediário tetraédrico - acilação; d) álcool liberado na reação; e) complexo acil enzima; f) R_2 = hidrogênio ou grupo alquil; g) intermediário tetraédrico - desacetilação; h) éster ou ácido carboxílico liberado na reação. Fonte: Ottosson (2001).

As lipases também possuem uma peculiaridade interessante. Elas são capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como, por exemplo, a formação de um éster a partir de um álcool e um ácido carboxílico. Esses dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), conforme ilustra a Figura 8 (CASTRO; A MENDES; SANTOS, 2004).

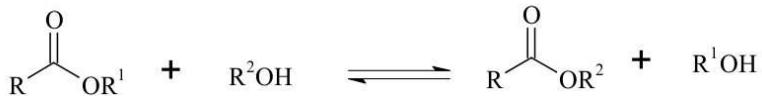
Hidrólise/ Esterificação



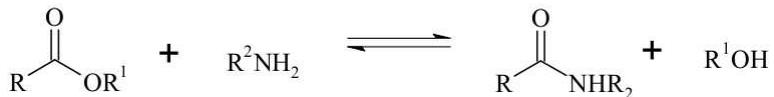
Interesterificação



Alcoólise



Aminólise



Acidólise



Figura 8 - Representação esquemática das principais reações catalisadas pelas lipases.

4.6 LIPASES – ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO

As lipases são produzidas por micro-organismos, plantas e animais. Normalmente, as lipases de plantas são encontradas associadas a membranas, sendo exceções o milho, a colza e o mamão. Diversos estudos revelaram que as lipases nas plantas encontram-se mais concentradas nos frutos e sementes, pois as mesmas contêm

consideráveis quantidades de triacilgliceróis. Nos mamíferos podem ser distinguidos três grupos de lipases: digestivas, de tecidos e do leite. As lipases digestivas incluem: linguais, faríngeas, gástricas e pancreáticas. Órgãos e tecidos que contêm lipases são: coração, cérebro, músculos, artérias, rins, baço, pulmão, fígado, tecido adiposo e plasma (SAID; PIETRO, 2004).

De forma geral, as lipases utilizadas comercialmente, são de origem microbiana. Os micro-organismos, especialmente os fungos, produzem lipases de forma mais intensa e diversificada, no que diz respeito às suas propriedades enzimáticas e especificidades pelos substratos, facilitando, dessa forma, seu emprego em processos industriais.

Atualmente, sabe-se que lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar as mesmas reações, porém, com desempenhos diferentes. Esse comportamento está relacionado à especificidade de tais enzimas.

Nem todas as lipases são capazes de atuar com eficiência na síntese do biodiesel e somente algumas delas podem catalisar a reação em sistemas orgânicos e sistemas livres de solventes orgânicos. As lipases podem ser divididas em três grupos com base em sua especificidade:

a) não específicas: catalisam a clivagem das moléculas de triacilglicerol sem distinguir entre as posições das ligações ésteres, gerando diversos produtos, tais como: ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Os produtos gerados são semelhantes à catálise química. As lipases não específicas são produzidas pelos seguintes micro-organismos: *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp (CASTRO; A MENDES; SANTOS, 2004).

b) ácido graxo específicas: catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de triacilglicerol. Um representante típico desse grupo é a lipase de *Geotrichum candidum* que hidrolisa preferencialmente grupos acila de cadeia longa, que contenham dupla ligação cis na posição 9 (CARVALHO et al., 2003).

c) 1,3 específicas: catalisam a clivagem de ligações nas posições R₁ e R₃ da molécula de triacilglicerol. As posições das ligações encontram-se apresentadas na Figura 9. Nesse caso, as lipases 1,3 específicas liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 formando produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não específicas. Tais tipos de lipases podem ser produzidas pelos seguintes

micro-organismos: *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquerfortii* (CASTRO; A MENDES; SANTOS, 2004; ANTCZAK et al., 2009).

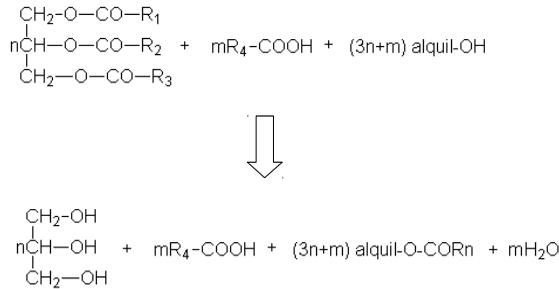


Figura 9 - Representação da reação de transesterificação de materiais contendo ácidos graxos livres com alcoóis alifáticos com cadeia curta. Na ilustração $R_n=R_1, R_2, R_3$ ou R_4 , onde R_n =alquil. O grupo alquil poderá ser: metil, etil, 1-propil, 2-propil, 1-butil e isobutil. Fonte: Antczak et al., 2009).

Com base nas informações citadas, é possível dizer que a lipase obtida de um determinado micro-organismo fornece maiores taxas de conversão em relação à reação de transesterificação, se comparada com a lipase de outro micro-organismo. Assim, é possível verificar que a seleção da fonte enzimática é de primordial importância para a produção de biodiesel. Para isso, torna-se muitas vezes necessário estudar a microbiota natural presente neste material, já que a produção da enzima está intimamente relacionada à capacidade de adaptação dos micro-organismos aos ambientes que possuem naturalmente a matéria-prima que se deseja utilizar como substrato de partida. A constatação de que as propriedades das lipases são diferentes entre gêneros de micro-organismos e mesmo entre suas espécies justifica o estudo por novas linhagens produtoras, bem como a caracterização da enzima produzida.

5 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE

Segundo Esposito e Azevedo (2004), os fungos filamentosos constituem o grupo com maior número de espécies, apresentando, dessa

forma, grande diversidade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Tal diversidade tem permitido ao homem explorar algumas linhagens para a produção de diversos metabólicos.

Os micro-organismos produtores de lipases vêm sendo isolados de diversos ambientes, dentre os quais é possível citar os resíduos industriais, as fábricas de processamento de óleos vegetais, as fábricas de laticínios, os solos contaminados com óleos, os resíduos de alimentos e muitos outros (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

De forma geral, os passos utilizados para a seleção de micro-organismos com potencial para a produção de substâncias de interesse é apresentado na Figura 10. Os elementos-chave das estratégias de seleção são: a) definição da substância que deseja-se obter; b) desenvolvimento de protocolos para o isolamento de micro-organismos que produzam a substância de interesse com base em micro-organismos que sabidamente produzem tais substâncias; c) escolha das fontes para a obtenção dos micro-organismos; d) (rastreamento primário) – análise qualitativa de uma grande população de organismos em relação à produção da substância de interesse; e) (rastreamento secundário) – análise qualitativa e quantitativa do potencial de produção da substância de interesse pelo micro-organismo selecionado (STEELE; STOWERS, 1991).

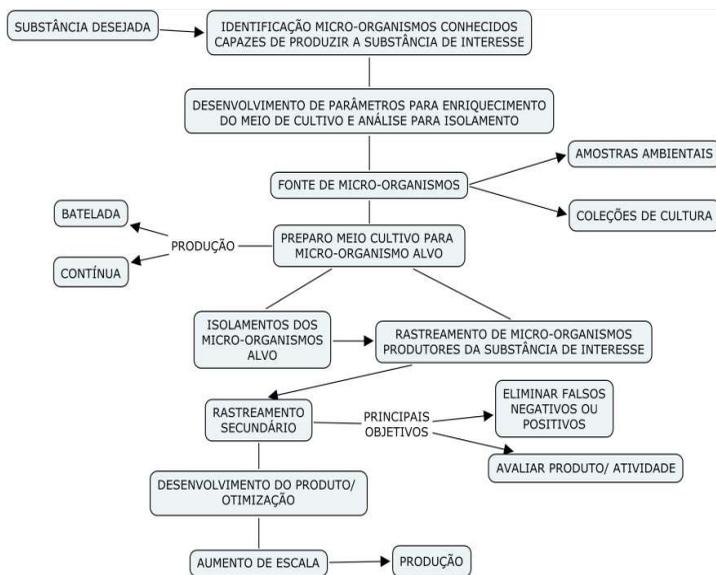


Figura 10 - Esquema geral de um programa de seleção de micro-organismos. Fonte: Steele; Stowers (1991).

De acordo com Colen (2006), a realização do rastreamento primário de fungos a partir de fontes naturais contaminadas com uma microbiota mista de bactérias e actinomicetos, além dos fungos, requer o emprego de condições de enriquecimento seletivo. Nesse caso, isso pode ser feito empregando-se meios de cultura com pH ácido ou, mais comumente, através da adição substâncias inibidoras de crescimento, tais como antibióticos, corantes e outras de ação específica.

Em geral, o rastreamento primário é realizado através do cultivo do micro-organismo que está sendo testado em meio de cultura em placas de Petri (STEELE; STOWERS, 1991). A visualização da produção da lipase é realizada de forma direta na placa e se baseia normalmente na formação de zonas claras ou opacas em torno das colônias lipolíticas ou, ainda, através da formação de cristais de corantes no interior de gotículas de gordura. Substratos solúveis em água, como, por exemplo, tween 80³, são úteis para a observação direta da liberação

3 O tween 80 é um surfactante não aniônico e emulsificante. Trata-se de um líquido viscoso e amarelo e solúvel em água. Sua estrutura química é constituída por grupos ésteres, sendo

de ácidos graxos insolúveis em água, ocorrendo neste caso a formação de um precipitado que forma um halo opaco, conforme apresentado na Figura 11A. Especial cuidado deve ser tomado, pois o micro-organismo pode metabolizar ácidos graxos e, neste caso, resultar em falsos negativos. Outros substratos, tais como o óleo de oliva (Figura 11B) e a tributirina também podem ser utilizados. No caso da tributirina, apesar da mesma não ser considerada como um substrato para a lipase, ela possui a vantagem de se solubilizar com facilidade em água. A zona clara produzida no meio contendo este substrato é devido à hidrólise da mesma. Outros métodos utilizam a trioleína. Porém, esse substrato acaba gerando uma suspensão que necessita da adição de emulsificadores.

A utilização de um indicador pode facilitar a visualização do halo. Nesse sentido, um corante muito utilizado e pesquisado é a rodamina B, que liga-se aos produtos resultantes da hidrólise exercida pelas lipases gerando produtos fluorescentes quando iluminados com luz ultravioleta (Figura 11C). O trabalho realizado por Samad et al. (1989) ilustra o uso de outros indicadores, como o Victoria Blue B e o vermelho de metila. Esses mesmos autores testaram vários tipos de substratos, tween 20, 60 e 80 com Victoria Blue B, vermelho de metila e rodamina B. Neste caso, os halos mais nítidos foram obtidos com uma solução de lipase comercial gotejada sobre o meio contendo tween 80 e Victoria Blue B. Também foi possível observar uma relação linear entre o diâmetro de difusão dos ácidos graxos em relação ao logaritmo da concentração de enzima. Essa técnica é muito conveniente para o rastreamento rápido de micro-organismos com atividade lipolítica (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009).

Apesar das vantagens do uso das lipases como catalisadores para a produção de biodiesel frente aos catalisadores álcalis, existe um inconveniente comum nos dois casos: o fato de tais catalisadores serem solúveis no meio reacional. Esse fato dificulta muitas vezes a remoção ou recuperação dos catalisadores. Para contornar esse problema, estudos vêm sendo realizados com a catálise heterogênea (KNOTHE et al., 2006; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

que o ácido graxo que origina a molécula é o ácido oléico. A característica hidrofílica da molécula ocorre devido a presença de uma cadeia hidrofílica de polioxietileno. Devido às essas características o tween 80 é utilizado para a obtenção de emulsões do tipo óleo em água (O/A), como dispersantes ou solubilizantes de óleos e como tensoativos em xampus. Ele também reduz a tensão superficial entre determinados tipos de componentes permitindo a obtenção de emulsões estáveis.

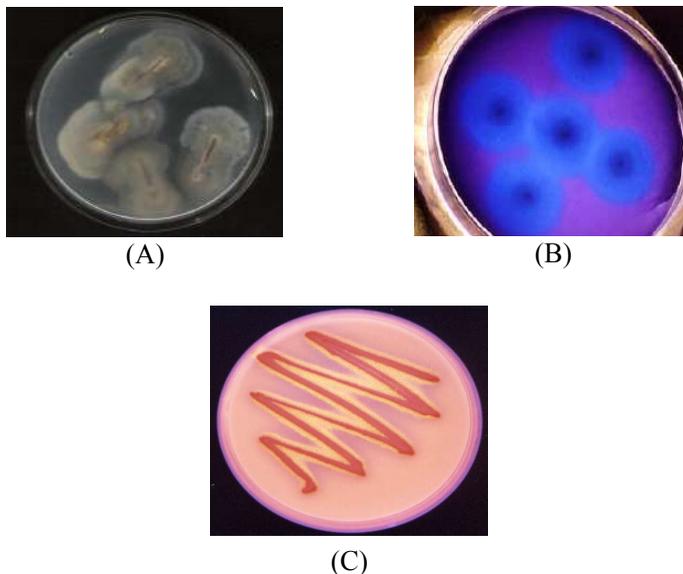


Figura 11 - A) Aspecto de uma colônia contida em fragmentos de grama. O halo trata-se de um éster de cálcio formado pela ação da lipase sobre o tween 80 e cloreto de cálcio no meio de cultivo Fonte: Macagnan (2007); B) Aspecto de uma colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* cultivada em meio com óleo de oliva, sais biliares e corante Azul vitória B Fonte: Colen (2006); C) Aspecto de uma colônia de *Bacillus megaterium* em meio de cultivo contendo óleo de oliva e rodamina B sob a luz UV 365 nm. Fonte: Lima (2004).

6 A CATÁLISE HETEROGÊNEA E A IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A catálise heterogênea, que utiliza catalisadores insolúveis, vem recebendo atenção especial devido as suas vantagens em relação à catálise homogênea. Dentre as diversas vantagens é possível citar: (a) aproveitamento da atividade catalítica por um período de tempo maior; (b) operação de forma contínua ou através de bateladas repetidas; (c) facilidade de separação do catalisador e do produto da reação; (d) redução do volume da reação, pois o catalisador insolúvel permanece retido no reator, contendo uma alta atividade por unidade de volume muito superior à que seria com o catalisador solúvel; (e) maior

facilidade para interromper a reação quando se atinge um determinado grau de conversão pela remoção do catalisador, se a operação está sendo realizada em batelada; ou pelo ajuste do tempo de residência, se é utilizada em um reator contínuo (SAID; PIETRO, 2004).

Alguns catalisadores heterogêneos têm sido investigados, dentre os quais é possível citar: ZrO_2 , ZnO , SO_4^{2-}/SnO_2 , SO_4^{2-}/ZrO_2 , zeólita KNO_3/KL e KNO_3/ZrO_2 (VASUDEVAN; BRIGGS, 2008). Outra possibilidade interessante é utilizar catalisadores biológicos imobilizados em suportes sólidos.

No caso das enzimas, é frequentemente vantajoso usá-las na forma imobilizada sobre suportes sólidos, por serem fáceis de manusear e por serem recuperadas em qualquer tempo de reação sem considerável perda de atividade catalítica.

Da mesma forma que quaisquer enzimas, as lipases sofrem inativação por diversos fatores físicos, químicos e biológicos. Esse efeito pode ocorrer quando as enzimas estão sendo utilizadas ou sob estocagem. Considerando a necessidade de aumentar o tempo de vida útil dessas biomoléculas, torna-se necessário desenvolver métodos, dentre os quais é possível citar a imobilização.

Segundo Durán et al. (2002), a imobilização enzimática pode ser definida como um método que permite o confinamento da enzima numa região definida, sem perda de atividade catalítica. A fixação ou encerramento das enzimas em suportes sólidos proporciona diversas vantagens sobre as enzimas livres, tais como maior estabilidade operacional e aumento da vida útil; facilidade de separação do produto do catalisador; em processos analíticos e em reatores de fluxo contínuo. Vários tipos de suportes vêm sendo estudados para a imobilização enzimática. Dentre eles destaca-se a quitosana, que, por sua vez, é o derivado mais importante da quitina, porque possui várias propriedades físicas, químicas e biológicas que tornam este polímero muito versátil quimicamente.

JUSTIFICATIVA

Através da pesquisa de artigos publicados nos últimos quatro anos nos periódicos disponíveis na coleção eletrônica da ScienceDirect, foi possível verificar que, dos 6608 artigos encontrados para a palavra chave biodiesel, aproximadamente 67% tratavam da produção ou caracterização de biodiesel oriundo de óleos vegetais de alta qualidade⁴, de soja, colza, girassol, palma e mamona. O restante dos artigos são relacionados à produção ou à caracterização de biodiesel de óleos vegetais usados, sebos e outros tipos de resíduos gordurosos. Vale a pena ressaltar que essa porcentagem sofreu significativo aumento desde 2008, de acordo com o gráfico ilustrado na Figura 12.

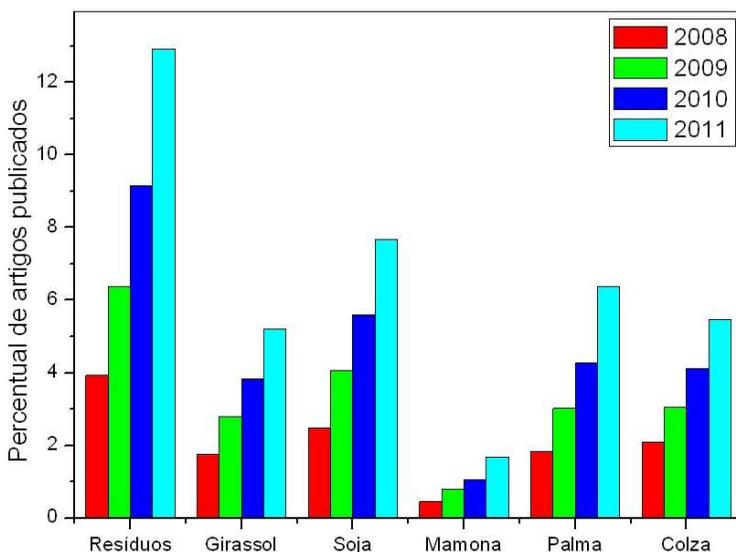


Figura 12 - Percentual de artigos publicados desde 2008 em relação à produção ou caracterização de biodiesel produzido a partir de resíduos gordurosos e óleos vegetais. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 05 out. 2011.

4 A expressão: óleos vegetais de alta qualidade, refere-se aos óleos que passaram por tratamentos que fornecem aos mesmos baixas concentrações de ácidos graxos livres, de pigmentos que conferem cor aos óleos e que possuem baixos índices de peróxido.

Os dados acima ilustram o número inferior de publicações relacionadas ao uso de matérias-primas alternativas, tais como os óleos de descarte ou resíduos gordurosos. Além disso, é interessante citar que alguns países ainda não iniciaram o processo gradativo de substituição do diesel pelo biodiesel, pois o custo de sua produção ainda é muito elevado. O alto custo do biodiesel deve-se à sua produção, em maior parte, ser realizada a partir de óleos vegetais de alta qualidade. Um fator importante é que esse custo de produção pode ser parcialmente reduzido pelo uso de matérias-primas de menor valor agregado, o que motiva a investigação de tecnologias para a utilização de óleos de descarte ou resíduos gordurosos (BHATTI et al., 2008).

Outra questão que merece reflexão é o aumento significativo que deverá ocorrer na produção de oleaginosas utilizadas na produção de biodiesel, para o cumprimento da Lei 11.097/05. Segundo Barbosa (2007), esse aumento poderá acarretar em mudanças no setor de alimentos. O efeito dessa elevada procura de produtos agrícolas para o setor energético aponta para um aumento nos preços das sementes, nos custos da ração para os animais e, no final da cadeia, no preço da alimentação. Esse cenário causa preocupação e também traz à tona o debate sobre a possível perda da segurança alimentar mundial, apesar de alguns países argumentarem que a produção de alimentos não será abalada pela produção de energia, uma vez que o desenvolvimento tecnológico e a introdução de novas sementes mais produtivas devem tornar a expansão das fronteiras agroenergéticas desnecessárias. Outro ponto de debate sobre o uso dos óleos vegetais comestíveis para a produção de biodiesel é a ameaça à biodiversidade. Ainda, segundo Barbosa (2007), a produção de óleo de palma já causou o desmatamento de grandes extensões de florestas na Colômbia, Equador e Indonésia. Na Malásia, maior produtor mundial de óleo de palma, 87% das florestas foram derrubadas em função das plantações de palma.

No Brasil, até 2008, o Governo Federal ofertou incentivos fiscais para impulsionar a produção de biodiesel utilizando o óleo de mamona para o cumprimento das metas estabelecidas pela Lei 11.097/05. O óleo de mamona é utilizado como substrato para a produção de um biodiesel que possui características singulares, que, por sua vez, estão relacionadas à sua composição química. O óleo de mamona é constituído por aproximadamente 90% de ácido ricinoléico que se diferencia dos outros ácidos graxos por possuir uma hidroxila no carbono 12 de sua cadeia e por apresentar uma dupla ligação cis entre os

carbonos 9 e 10. Essas características conferem ao óleo de mamona algumas de suas propriedades intrínsecas, como a elevada viscosidade e sua miscibilidade em álcool. Segundo Belfort (2011), apesar das propriedades físico-químicas para a produção de biodiesel através do óleo de mamona, alguns fatores contribuíram para a descrença da mamona para esse fim, como a baixa produtividade dos agricultores familiares. A cultura apresenta boa produtividade quando cultivada acima dos 600 metros de altitude, o que torna seu cultivo não indicado em estados como Pernambuco, Paraíba, Alagoas e Sergipe. Ainda de acordo com esse mesmo autor, a mamona não chega a ser substrato para a produção de 1% de todo o biodiesel fabricado no país. De acordo com o mesmo autor o óleo de soja e o óleo de palma respondem, respectivamente, por 30% e 70% da produção do biodiesel nacional.

As questões levantadas ressaltam a necessidade pela busca por novos substratos para a produção de biodiesel. Segundo Fukuda, Kondo e Tamakampudi (2009), a adoção de uma matéria-prima em particular para a produção do biodiesel também está vinculada a outros fatores, tais como a sua disponibilidade, as propriedades de armazenamento e o desempenho como combustível. Para o caso do uso de resíduos de abatedouros avícolas, através dos dados apresentados na introdução deste trabalho, é possível verificar que existem diversas evidências que comprovam que o item disponibilidade é contemplado. Por outro lado, quanto aos demais itens citados, ainda faltam pesquisas que comprovem a possibilidade do uso deste tipo de matéria-prima para a produção de biodiesel.

Mesmo com o reduzido⁵ número de trabalhos científicos publicados sobre as características do biodiesel produzido a partir de resíduos gordurosos, já é possível encontrar casos isolados de empresas que utilizam o óleo de vísceras para produção de biocombustível para abastecimento da própria frota (BATISTA, 2007; FONSECA, 2009). Também é válido ressaltar que o biodiesel pode ser utilizado para outras aplicações além do seu uso para transporte de superfície. Ele pode ser utilizado como óleo de aquecimento ou em aeronaves de pequeno porte.

Com relação ao catalisador utilizado, pôde-se perceber que, dos trabalhos encontrados na literatura sobre o uso de resíduos, a maior parte refere-se ao uso de catálise básica ou ácida para a produção do biodiesel (BHATTI et al., 2008; GOMES; SOUZA; BARICCATTI, 2008;

5 Reduzido número de trabalhos se comparado ao número de publicações sobre produção de biodiesel utilizando óleos vegetais.

PREDOJEVIC, 2008; KYONG-HWAN; KIM; LEE, 2009). Esse fato está relacionado aos baixos custos dos catalisadores citados. Por outro lado, a catálise enzimática vem ganhando cada vez mais atenção, pois a mesma oferece muitas vantagens em relação à catálise básica ou ácida, conforme evidenciado na revisão bibliográfica deste trabalho.

Apesar das vantagens já citadas anteriormente para o uso dos catalisadores enzimáticos, pode-se dizer que eles possuem alguns inconvenientes, entre os quais é possível citar o fato de sofrerem inativação por fatores químicos, físicos e biológicos. Para amenizar esse fenômeno e consequentemente aumentar o tempo de vida útil dos biocatalisadores, os mesmos podem ser imobilizados em suportes sólidos. Dentre os vários suportes estudados, a quitosana merece destaque. A quitosana é o derivado mais importante da quitina, possuindo várias propriedades físicas, químicas e biológicas que a tornam um polímero muito versátil quando comparado à quitina (THARANATHAN; KITTUR, 2003). Além disso, a quitosana é uma matéria-prima de baixo custo, pois é obtida principalmente de resíduos da indústria pesqueira.

Com base nos argumentos expostos e dando continuidade às pesquisas realizadas pelo grupo de Biocatálise Aplicada à Produção de Biocombustíveis do Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFSC, é possível dizer que o presente trabalho deve contribuir aos estudos existentes sobre o uso de diferentes fontes de lipases, sua caracterização, imobilização e viabilidade de aplicação para a produção de biodiesel.

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE ENZIMA EXTRACELULAR COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ABATEDOURO DE FRANGOS CATARINENSE

I.1 RESUMO

Levando-se em consideração a importância do estudo de novas fontes de lipases com características físico-químicas viáveis para aplicações comerciais, este estudo foi desenvolvido visando a obtenção de uma cepa fúngica selvagem lipolítica. Para alcançar esse objetivo, foram isoladas dezenove cepas de fungos filamentosos de um efluente de abatedouro de frangos. Na sequência, as cepas foram analisadas com base em sua atividade lipolítica. Para a realização desse experimento, tornou-se necessário testar diferentes métodos de detecção de micro-organismos lipolíticos em meios de cultivo sólidos contidos em placas de Petri. Os resultados obtidos revelaram que o meio mais adequado para a detecção de tais micro-organismos foi o que permitiu a visualização de precipitados de laurato de cálcio em tubos de ensaio com meio constituído por ágar bacteriológico (20 g/L), cloreto de cálcio (0,5 g/L), cloreto de sódio (5 g/L) e Tween 80 (10 g/L). Através do referido método foi possível identificar três cepas com atividade lipolítica. As cepas foram inoculadas em meios de cultivo submersos e o isolado fúngico de número 17 se destacou por atingir os maiores valores de atividade enzimática, chegando a 20,71 U/mL.

I.2 ABSTRACT

Taking into account the importance of studying new lipases sources with viable physicochemical characteristics for commercial applications, this study was developed in order to obtain a lipolytic wild fungal strain. To achieve this goal, nineteen strains of filamentous fungi were isolated from a chicken slaughterhouse raw effluent. Furthermore, the strains were analyzed in relation to their lipolytic activity. For this experiment, it was necessary to test different detection methods for lipolytic microorganisms on solid culture that were contained in Petri dishes. Results showed that the most suitable culture for detection of such microorganisms was the one that allowed the display of precipitated calcium laurate in sample tubes with culture consisting of bacteriological agar (20 g/L), calcium chloride (0.5 g/L), sodium chloride (5 g/L) and Tween 80 (10 g/L). Through that method, it was possible to identify three strains with lipolytic activity. Those strains

were then inoculated into submerged culture, with fungal isolate number 17 presenting the highest values of enzymatic activity of 20.71 U/mL.

I.3 INTRODUÇÃO

O uso das enzimas tem ocorrido em diversos processos desde as antigas civilizações. Segundo Sharma, Sharma e Shukla (2011), atualmente, cerca de 4000 enzimas são conhecidas, e, destas, cerca de 200 estão em uso comercial. Aproximadamente 60% da oferta mundial de enzimas é produzida na Europa. E pelo menos 75% de todas as enzimas industriais produzidas (incluindo as lipases) são da classe das enzimas hidrolíticas.

As lipases são utilizadas principalmente no processamento de gorduras e óleos, na formulação de detergentes e desengordurantes, no processamento de alimentos, na síntese de química fina, na fabricação de papel, na produção de cosméticos, na síntese de produtos farmacêuticos e tratamento de resíduos e efluentes gordurosos (SAID; PIETRO, 2004). Devido ao seu amplo espectro de atuação, as lipases vêm sendo intensamente estudadas. Tais investigações estão principalmente relacionados à caracterização estrutural, elucidação do mecanismo de ação, cinética, sequenciamento, clonagem de genes e caracterização de desempenho em relação a determinados tipos de reações. As lipases comercialmente úteis são normalmente obtidas a partir de micro-organismos que produzem uma grande variedade de lipases extracelulares. Dessa forma, devido às suas características e aplicações, a pesquisa por novas fontes microbianas de lipases é impulsionada.

Micro-organismos produtores de lipases têm sido encontrados e isolados nos mais diversos habitats, dentre os quais é possível citar os resíduos de indústrias de óleos vegetais, de laticínios, do solo contaminado com óleo, das sementes de oleaginosas, dos alimentos em decomposição, das caixas de gordura e das pilhas de compostagem. As culturas puras de tais micro-organismos podem ser obtidas através dos métodos de plaqueamento. Segundo Silva Filho e Oliveira (2007), o princípio geral dos métodos de plaqueamento está relacionado ao fato de que uma célula viável, ao ser adicionada em um meio de cultivo adequado, cresce dando origem a uma colônia visível a olho nu. A referida colônia pode ser transferida para um novo meio de cultivo onde crescerá concomitantemente a outros micro-organismos. O

procedimento inicial irá depender do substrato de partida para o isolamento dos micro-organismos. O método mais prático para obtenção de colônias isoladas consiste na semeadura em superfície, no meio de cultura até o esgotamento do inóculo. Após a etapa de isolamento, as cepas obtidas são normalmente submetidas a condições seletivas para permitir a detecção e seleção das cepas ou metabólitos de interesse. Esse procedimento é realizado primeiramente em meio de cultivo sólido em placas de Petri (rastreamento primário⁶), em que as cepas que possuem capacidade de produzir substância ou metabólito de interesse são detectadas. Na sequência, as cepas selecionadas, em geral, são cultivadas em meios de cultivo submersos, sob diversas condições, obtendo-se com essa técnica diversos tipos de extratos brutos resultantes do crescimento do mesmo isolado. A quantificação das substâncias ou metabólitos de cada cultivo é comparada. Com isso é possível obter uma avaliação do rendimento de produção em diferentes situações, e selecionar as cepas mais promissoras, bem como descartar as demais (COLEN, 2006).

O uso dos meios sólidos permite um rastreamento rápido de uma grande população de fungos que precisam ser comparados com outros micro-organismos (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). O trabalho de Hankin e Anagnostakis (1975) foi pioneiro ao ilustrar alguns tipos de meios de cultivo capazes de permitir a detecção da produção das enzimas amilase, lipase, deoxiribonuclease e ribonuclease, pectinase, protease e quitinase em culturas de fungos. Para a detecção da atividade de lipase, os autores utilizaram um meio de cultivo sólido constituído por tween 20, peptona, cloreto de sódio, cloreto de cálcio e ágar com pH de 6,0. A formação da lipase foi verificada através do surgimento de um precipitado ao redor da colônia fúngica, constituído por cristais de laurato de cálcio formado pela ação da enzima em questão. Para facilitar a visualização dos precipitados citados anteriormente, alguns autores sugerem a adição de corantes. Para exemplificar essa afirmação é possível citar o trabalho de Samad et al. (1989) que, por sua vez, ilustra o uso dos indicadores Victoria Blue B, Vermelho de Metila e Rodamina B. Curiosamente, esses mesmos autores adicionaram diferentes concentrações de uma solução comercial de lipase e verificaram que existiu uma relação linear entre a concentração de enzima e o diâmetro do halo de precipitado formado ao redor da solução gotejada no centro

6 Rastreamento primário: Análise qualitativa de uma grande população de organismos em relação a produção da substância de interesse (STEELE; STOWERS, 1991).

da placa de Petri. O diâmetro do halo aumentou com o tempo de incubação e sofreu estabilização após 90 horas. Resultados similares também foram obtidos após inoculação de *Rhizopus* sp. nas placas de Petri e mostram que a técnica pode ser utilizada com eficácia para o rastreamento primário de micro-organismos com atividade lipolítica.

Segundo Shelley et al. (1987) para se detectar com eficácia um micro-organismo que possui atividade lipolítica extracelular é necessário conciliar algumas variáveis, dentre as quais é possível citar o crescimento do micro-organismo; a produção e a excreção de lipases; a atividade e a especificidade da enzima e a sensibilidade da técnica de detecção. Dessa forma, todas as variáveis citadas devem ser empregadas nas condições ótimas. Porém, isso não é possível devido à grande variedade de micro-organismos que apresentam características diferentes. Essa afirmação demonstra que não há técnica que permite detectar a atividade enzimática em 100% dos micro-organismos testados. Mesmo com as dificuldades e desvantagens apresentadas, a técnica citada vem sendo amplamente utilizada para o rastreamento primário de cepas potencialmente produtoras de lipase.

Segundo Sharma, Chisti e Banerjee (2001), após o isolamento e a seleção das cepas produtoras de lipase, o principal método utilizado para a produção desta enzima é através do uso de cultivo submerso. Contudo, o cultivo em meio sólido também pode ser utilizado. Vem sendo demonstrado que o cultivo em meios sólidos acarreta na obtenção de uma maior produtividade enzimática. Além disso, o produto final é mais concentrado e com maior estabilidade, existem menores chances de contaminação do meio, uma vez que o conteúdo de água é menor e os micro-organismos encontram-se, de um modo geral, mais adaptados a esse tipo de meio. Por outro lado, existem fatores que desmotivam o uso das técnicas de cultivo sólido e que estão relacionados a dificuldades para o escalonamento a nível industrial. Das dificuldades mencionadas é possível destacar o surgimento de gradientes de temperatura, pH, oxigênio livre, de substrato e de umidade no meio de cultivo (DURAND et al., 1993; RAIMBAULT, 1998; PRABHAKAR et al., 2005;).

As lipases com aplicações comerciais são obtidas predominantemente de fungos através do cultivo submerso dos mesmos. Os fungos filamentosos se caracterizam por excretar quantidades significativas de lipases, sendo que, de um modo geral, a produção de tais enzimas está relacionada a respostas de estímulos ambientais (ILLANES, 2008).

Vários gêneros de fungos filamentosos vêm sendo estudados como fontes de lipases, tais como: *Aspergillus* (COSTA, 1996), *Geotrichum* (BURKERT, MAUGERI e RODRIGUES, 2004), *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium* (RIFAAT et al., 2010), *Penicillium* (MIRANDA et al., 1999, PINHEIRO, 2006), *Rhizopus* (KHARRAT et al. (2011) entre outros SHARMA, SHARMA e SHUKLA, 2011).

As lipases excretadas pelos fungos filamentosos podem ser separadas da massa micelial através de centrifugação ou filtração (RAPP; BACKHAUS, 1992). Um reduzido número de fungos filamentosos é conhecido por possuir, ligado ao seu micélio, as lipases, dentre os quais é possível citar fungos do gênero *Rhizopus* (WANG; XU; SHAN, 2008).

Os fungos filamentosos devem crescer em um meio de cultivo constituído por nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo e a produção de metabólitos. Dessa forma, este meio deve ser adequado para suprir energia para biossíntese e manutenção celular, sendo composto basicamente por fonte de carbono, fonte de nitrogênio (orgânico ou inorgânico), sais orgânicos, vitaminas e indutores, quando necessários para a produção de lipase, visto que existem lipases induzíveis e constitutivas.

As lipases constitutivas são aquelas que são produzidas independente do meio de cultura onde o micro-organismo se encontra. Já as lipases induzíveis têm sua produção estimulada pela presença de algum indutor presente no meio de cultivo (PINHEIRO, 2006).

Com base na teoria da evolução das espécies é possível dizer que os micro-organismos se adaptam ao meio em que estão, respondendo a condições de natureza química, física ou biológica. Devido às condições mencionadas, os fungos vêm se diversificando ao longo do processo evolutivo, utilizando uma ampla faixa de condições e substâncias diferentes para o seu desenvolvimento. Diferentes espécies necessitam de diferentes condições de crescimento, dentre as quais é possível citar as condições de aeração, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, outros nutrientes, pH e temperatura (COLEN, 2006).

Nesse contexto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de isolar e selecionar um micro-organismo com atividade lipolítica, utilizando como substrato um efluente bruto de abatedouro de frangos. Para essa etapa, foi importante a caracterização físico-química do substrato. Para a realização da etapa de rastreamento primário, tornou-se necessário selecionar um meio de cultivo mais apropriado para detectar

os micro-organismos com atividade lipolítica. Para isso foram utilizadas três formulações de meios distintos. Após a seleção das cepas mais promissoras para a produção de lipase, foi realizado um estudo em diferentes meios de cultivo líquidos para selecionar a cepa capaz de produzir um extrato bruto com maior atividade enzimática.

I.4 MATERIAL E MÉTODOS

Essa seção é destinada à descrição dos métodos utilizados para a caracterização físico-química do efluente bruto do abatedouro de frangos, que, por sua vez, foi utilizado como substrato para o isolamento de fungos filamentosos produtores de enzimas extracelulares com atividade lipolítica (rastreamento primário). Este capítulo também objetiva descrever os métodos utilizados para analisar as características macroscópicas e microscópicas dos isolados selecionados, bem como os métodos para obtenção do extrato bruto contendo lipase (rastreamento secundário⁷). O esquema ilustrado na Figura I.1 descreve resumidamente as etapas experimentais do capítulo I.

⁷ Rastreamento secundário: Análise qualitativa e quantitativa do potencial de produção da substância de interesse pelo micro-organismo selecionado (STEELE; STOWERS, 1991).

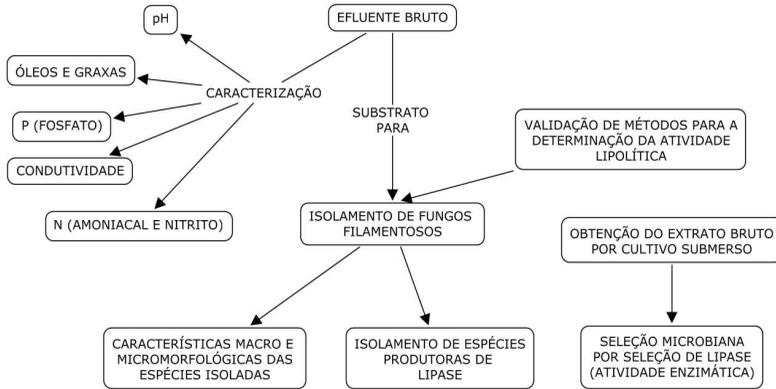


Figura I.1 - Resumo dos métodos realizados para o cumprimento das etapas do capítulo I - isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de enzima extracelular com atividade lipolítica de um efluente de abatedouro de frangos catarinense.

I.4.1 MATERIAL

Ágar bacteriológico, Ágar batata e dextrose (BDA) e Peptona bacteriológica foram adquiridos da DIFCO. O Ágar Sabouraud com cloranfenicol foi adquirido da ACUMEDIA, enquanto que o *p*-nitrofenilpalmitato e o corante Rodamina B foram adquiridos respectivamente, da SIGMA e da VETEC. A enzima CALB foi doada pela NOVOZYMES e o óleo de oliva, grau alimentar, foi adquirido da BUNGE. Os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico, sendo obtidos de outras fontes comerciais.

1.4.2 Métodos

I.4.2.1 Caracterização do efluente bruto de abatedouro de frangos

O efluente bruto foi coletado da caixa de gordura, etapa constituinte do tratamento primário de um abatedouro de frangos da região da grande Florianópolis. O efluente, após coletado, foi estocado em freezer a 0 °C em recipientes plásticos de 5 litros, limpos e esterilizados para a preservação de suas características (ANDRETTA; DAMSCHI JUNIOR; ONOFRE, 2007).

A caracterização físico-química deste material foi realizada nos locais e pelos métodos ou referências descritas na Tabela I.1.

Tabela I.1 - Descrição dos métodos utilizados para análise das características físico-químicas do efluente bruto de abatedouro de frangos.

Parâmetro analisado	Unidade	Método utilizado ou referência do mesmo	Locais de realização
pH		Foi realizada a leitura instrumental com um pHmetro modelo 330i/SET, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, com eletrodo de vidro, após calibração com soluções tampões pH 4,0 e 7,0.	ENGEBIO - UFSC
condutividade	($\mu\text{S}/\text{cm}$)	O aparelho utilizado foi o mesmo citado para a medida de pH, após calibração com uma solução de KCl de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C	ENGEBIO - UFSC
P- PO_4^{-3}	(mg/L)	APHA, 1995	LIMA ¹ - UFSC
N- NH_3	(mg/L)	APHA, 1995	LIMA - UFSC
N- NO_2^-	(mg/L)	APHA, 1995	LIMA - UFSC
DBO ₅	(mg/L)	APHA, 1995	LIMA - UFSC

DQO	(mg/L)	APHA, 1995	LIMA - UFSC
OG	(mg/L)	APHA, 1995	LIMA - UFSC

I.4.2.2 Isolamento dos fungos filamentosos a partir do efluente

O isolamento dos fungos filamentosos foi realizado em placas de Petri através da adição de 0,1 mL do efluente na superfície do meio de cultivo sólido. Conforme visualizado na Figura I.2, foi realizado o espalhamento do efluente sobre a superfície do meio de cultivo com o auxílio de uma alça de Drigalski. O meio de cultivo utilizado foi o Ágar Sabouraud com cloranfenicol, acidificado para pH 5,5. Este meio foi autoclavado em uma autoclave vertical da marca PHOENIX Equipamentos Científicos a 121 °C durante 15 minutos. Na sequência, as placas de Petri contendo o meio de cultivo e o efluente foram incubadas a 25 °C em estufa microbiológica Modelo 002CB da marca FANEM LTDA.

As etapas de isolamento foram realizadas através de sucessivas inoculações dos fungos em meios de cultivo mais seletivos até a obtenção das culturas axênicas. Para isso, porções do micélio foram retiradas com auxílio de uma alça de platina e inoculadas pontualmente no centro de placas de Petri contendo o meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol (ROVEDA, 2007).

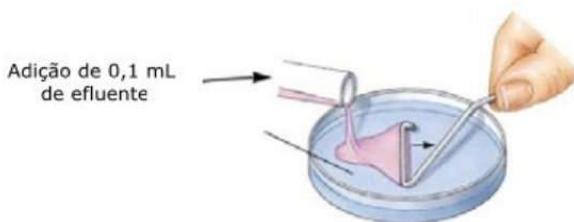


Figura I.2 - Método utilizado para o espalhamento do efluente sobre o meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol. Fonte: Roveda (2007).

Para promover a adaptação dos micro-organismos contidos no

efluente, antes da adição do mesmo no meio de cultivo contido nas placas de Petri, foi realizado um pré-inóculo. Para isso, 10 mL do efluente e 2% (m/v) de extrato de levedura foram adicionados em Erlenmeyers de 50 mL. O pH do meio foi ajustado para 5,5 com auxílio de uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L e um pHmetro modelo 330i/SET, Wissenschaftlich Technische Werkstätten. Em seguida, os Erlenmeyers foram agitados em *shaker* modelo TE-421 TECNAL, com agitação orbital de 100 rpm, a 25 °C, por 3 dias.

I.4.2.3 Validação de métodos para determinação da atividade lipolítica

Quatro métodos seletivos foram utilizados visando a validação de uma metodologia para rastreamento dos isolados com atividade lipolítica. Para isso, primeiramente foram realizados testes em placas, onde foi adicionada 100 µL de uma solução comercial de lipase, a CALB, com atividade 1200 U/L ou 100% de atividade. A partir da solução de lipase comercial citada, foram obtidas outras soluções mais diluídas em água destilada para os demais testes. As soluções obtidas possuíam as seguintes porcentagens de solução comercial de lipase (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%). As soluções enzimáticas foram gotejadas nos meios constituintes dos seguintes métodos:

Método 1 - O micro-organismo foi inoculado em um meio contendo a seguinte constituição: Ágar bacteriológico (15 g/L), Óleo de oliva (1% m/v), Rodamina B (0,001% m/v) e tween 80 (0,001 g/L) (SHELLEY et al., 1987).

Método 2 - A composição do meio de cultivo neste caso foi constituído por: Ágar bacteriológico (15 g/L), Óleo de oliva (1% m/v), Rodamina B (0,01% m/v) e tween 80 (0,001 g/L) (SHELLEY et al., 1987 adaptado).

Método 3 - Este meio foi constituído por: Ágar bacteriológico (20 g/L), Cloreto de cálcio anidro (0,5 g/L), Cloreto de sódio (5 g/L), Peptona bacteriológica (10 g/L) e tween 80 (10 g/L) (SHELLEY et al., 1987 adaptado por MACAGNAN, 2007).

Método 4 - O meio de cultivo, contido em placas de Petri, foi constituído por: Ágar bacteriológico (2% m/v), Cloreto de sódio (0,5% m/v), Extrato de levedura (0,1% m/v), Óleo de oliva (1% m/v) e Peptona bacteriológica (2% m/v) (FREIRE et al., 1997).

Todos os meios descritos nos métodos 1, 2, 3 e 4 foram preparados através da pesagem dos seus constituintes em uma balança

semi-analítica da marca DIGIMED. Na sequência, os meios foram esterilizados por um período de 15 minutos, a uma temperatura de 121 °C, com auxílio de uma autoclave.

Após a seleção do método a ser utilizado para o rastreamento primário dos isolados fúngicos, um estudo comparativo foi realizado com cepas que reconhecidamente produzem lipase extracelular. As cepas utilizadas, sua origem e referências que citam seu uso na produção de lipase encontram-se descritas na Tabela I.2.

Tabela I.2 - Cepas fúngicas utilizadas para a realização da validação do método para seleção dos isolados fúngicos produtores de lipases.

Cepas fúngicas	Origem	Referências
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 9092	Fundação André Tosselo	Kharrat et al. (2011); Hama et al.(2007)
<i>Penicillium</i> <i>simplicissimum</i> CCT 6686	Fundação André Tosselo	Li; Zong (2010); Wolski et al. (2009)
<i>Monascus ruber</i> CCT 3802	Fundação André Tosselo	Moritz; Pereira; Ninow (2003)
<i>Aspergillus niger</i>	Laboratório de Engenharia Bioquímica	Sharma; Chisti; Banerjee (2001); Marini et al. (2011)

I.4.2.4 Análise das características dos isolados fúngicos

A análise das características macroscópicas e microscópicas dos isolados fúngicos fazem parte das análises fundamentais para a identificação dos micro-organismos. Dessa forma, além das análises da macrocolônia, também faz-se necessária a visualização de hifas, conidióforos, esporos e outras estruturas micromorfológicas. Para a visualização das estruturas citadas foi utilizado o método de Riddell, também conhecido como técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950).

A realização do microcultivo foi realizada através da montagem de um aparato constituído por uma placa de Petri, papel filtro, lamínula e lâmina para microscopia, conforme ilustrado na Figura I.3.

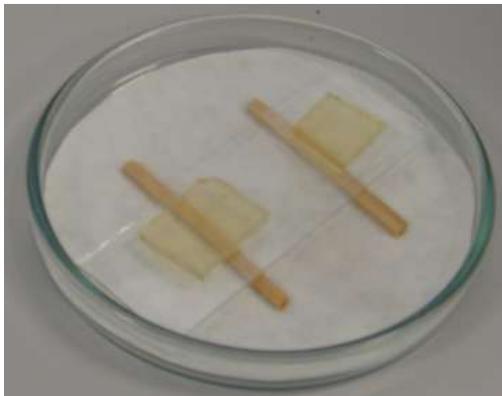


Figura I.3 - Aparato montado para a realização do microcultivo.

Para a realização do microcultivo, foram adicionados fragmentos do fungo com auxílio de uma alça de platina nos 4 lados do cubo de ágar. Na sequência, a lâmina foi recoberta pela lamínula com auxílio de uma pinça. Uma câmara úmida foi previamente providenciada através da adição de um círculo de papel filtro umidificado, conforme ilustrado na Figura I.3. Após a realização deste procedimento a placa foi tampada e incubada a 25 °C durante 2 e 6 dias.

De acordo com Lacaz, Porto e Martins (1991), para a visualização das estruturas citadas dos fungos, ao término do período de incubação, a placa de Petri foi destampada e a lamínula foi removida com auxílio de uma pinça. Na sequência, foi gotejada, em uma lâmina de vidro, uma gota do corante azul de lactofenol-algodão (“Cotton Blue”) e sobre esta foi adicionada a lamínula citada anteriormente e que se encontrava sobre o fungo. As lâminas foram observadas com microscópio ótico Bioval acoplado com câmera de vídeo ADLER CCTV.

A análise da macrocolônia foi realizada através da observação da cor, textura, superfície e pigmento difusível no meio de cultura. A realização das observações da macrocolônia ou colônia gigante foi realizada através da visualização de uma cultura feita no ponto central do meio de cultivo sólido distribuído em placa de Petri. A velocidade de crescimento, que pode ser rápida (menor ou igual a 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (maior que 15 dias), é fundamental

para identificação presuntiva do fungo (ANVISA, 2011). A medida do crescimento dos isolados foi realizada através da velocidade de crescimento radial nos meios de cultivo contidos em placas de Petri, ilustrados no esquema da Figura I.4 após incubação durante 1, 5, 10, 15 e 20 dias em estufa microbiológica a 25 °C.

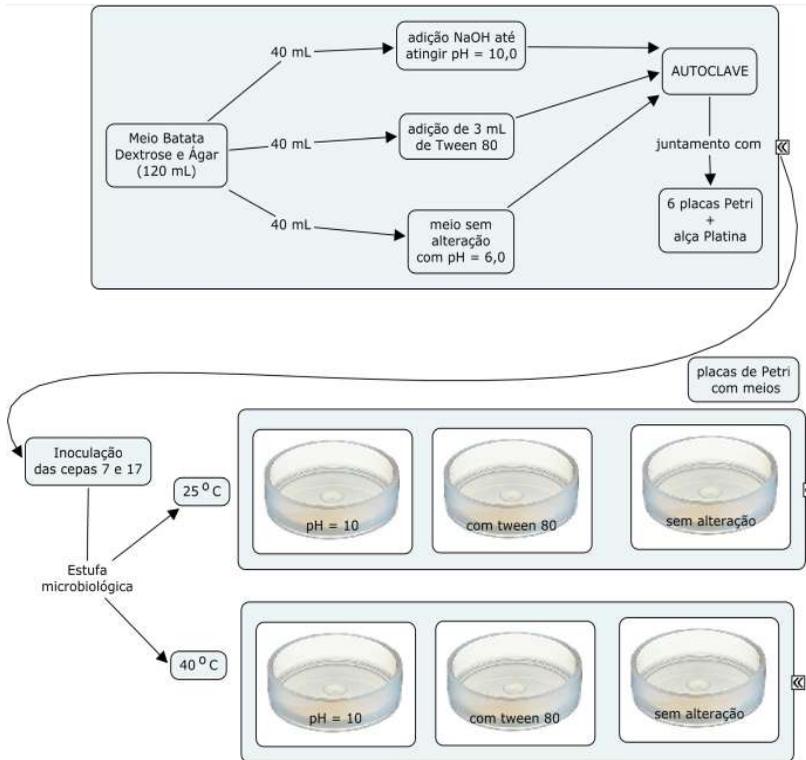


Figura I.4 - Método utilizado para análise da macrocolônia e medidas de crescimento micelial radial. O meio sem alteração foi considerado como controle negativo.

A velocidade de crescimento radial foi realizada com base no método desenvolvido por Gabiatti et al, (2004). Para isso os fungos foram previamente cultivados em garrafas de Roux de 1000 mL contendo 200 mL de meio BDA por 14 dias a 25 °C. O inóculo foi realizado através de uma solução obtida por meio da adição de 20 mL de

solução aquosa de 0,2% (v/v) de tween 80, seguido de raspagem da superfície do fungo com auxílio de uma alça de platina e filtração em gaze estéril para retenção dos fragmentos miceliais maiores. Esse procedimento foi adaptado de Salomão, Massaguer e Aragão (2008).

O crescimento radial foi medido através do diâmetro da colônia com auxílio de uma régua milimetrada em 8 direções ortogonais. As medidas foram realizadas a cada 5 dias, desde a inoculação até o vigésimo dia. A Figura I.5 ilustra os tipos de raias utilizadas para as leituras dos diâmetros das colônias.

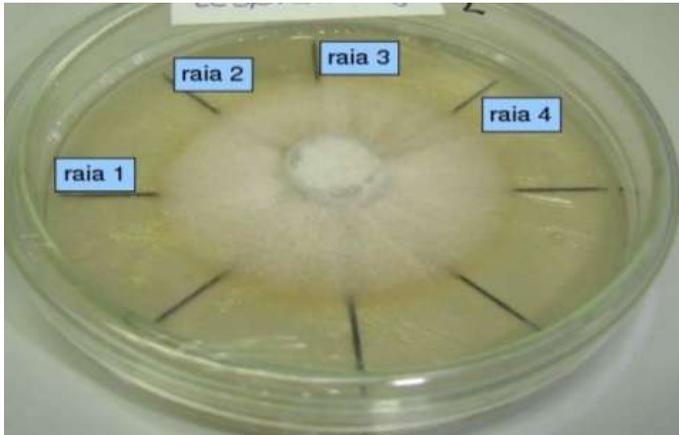


Figura I.5 - Raias traçadas nas placas de Petri para as leituras dos crescimentos miceliais radiais. Fonte: Pacheco; Morgado; Furigo Junior (2009).

A inoculação no ponto central da placa (local no qual as linhas das raias se cruzam) foi realizada através da adição de 10 μL da solução obtida seguindo o método descrito na seção (I.4.2.5).

Com base no trabalho realizado por Vendruscolo (2009), a velocidade de crescimento radial das colônias foi obtida pela declividade da regressão linear do raio da colônia em função do tempo de cultivo, conforme apresentado na Equação (I.1).

$$r(t) = V_{cr}.t+b \quad (I.1)$$

Onde r é o raio (cm), t é o tempo (h) e V_{cr} é a velocidade de crescimento radial (cm/h). O raio inicial foi considerado 0,4 cm, pois foi o valor que correspondeu ao raio obtido ao aplicar 10 μL da solução

para inoculação no centro da placa. A velocidade de crescimento foi calculada com base no tempo que correspondeu à fase linear de crescimento. O período da fase lag foi identificado com base na diferença entre o início da fase de crescimento linear e o início do crescimento da colônia (BALDRIAN E GABRIEL, 2002) (GABIATTI et al, 2004). Após o término do experimento, no vigésimo dia, o meio de cultura foi dissolvido em água fervente, no qual a biomassa fúngica foi recolhida, seca em estufa a 80 °C até massa constante, para a obtenção da massa fúngica seca (DONINI et al, 2006).

A partir dos resultados referentes à biomassa e ao crescimento radial foi possível obter características específicas de crescimento. Os experimentos foram realizadas em triplicata para cada tipo de meio e temperatura, sendo que os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Dunnett. O teste de Dunnett permite comparar cada um dos tratamentos com um tratamento em particular, que nesse caso tratou-se do controle negativo. Para isso foi utilizado o *software* MINITAB 14.

I.4.2.5 Análise de crescimento radial e características macroscópicas

Os isolados fúngicos foram previamente inoculados em garrafas de Roux de 1000 mL contendo 200 mL de meio BDA. Após a inoculação, as garrafas de Roux foram incubadas em estufa microbiológica, por 14 dias, a 25 °C. O inóculo foi realizado através de uma solução, que, por sua vez, foi obtida através da adição de 20 mL de solução aquosa de 0,2% (v/v) de tween 80, seguido de raspagem da superfície do fungo com auxílio de uma alça de platina e filtração em gaze estéril para retenção dos fragmentos fúngicos maiores. O esquema do método utilizado para a obtenção da solução utilizada para a inoculação dos isolados nas placas de Petri pode ser visualizado no quadro A da Figura I.6.

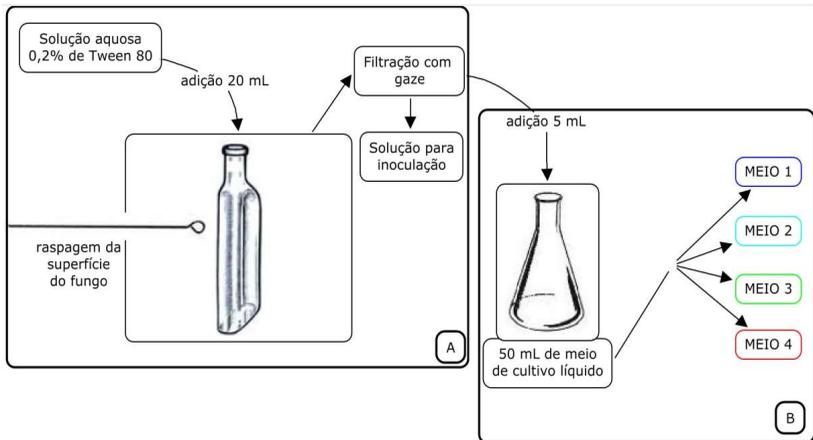


Figura I.6 - Processo para obtenção da solução usada para a inoculação dos isolados fúngicos nas placas de Petri para análise de crescimento radial (A) e para a obtenção do extrato bruto contendo enzimas extracelulares com atividade lipolítica (B). Fonte: Salomão; Massaguer; Aragão (2008).

Além dos meios descritos anteriormente, os isolados foram submetidos ao crescimento nos seguintes meios: Ágar sangue, Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (*brain heart infusion*), Ágar Sabouraud com cloranfenicol, Ágar Sabouraud com cicloheximida e BDA (batata, dextrose e ágar). Esse procedimento foi realizado no Setor de Micologia do LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública de Florianópolis, com o objetivo de visualizar algum tipo de estrutura de reprodução.

I.4.2.6 Obteção do extrato bruto dos isolados fúngicos selecionados

Os extratos brutos dos isolados fúngicos foram obtidos através do cultivo submerso dos mesmos. Para isso foi adicionado 5 mL de solução para inoculação obtida de acordo com o quadro A da Figura I.6. A inoculação da referida solução foi realizada em Erlenmeyers aletados de 250 mL contendo 50 mL de volume de trabalho (meio de cultivo), conforme ilustrado no quadro B da Figura I.6.

Foram utilizadas quatro formulações de meios de cultivo. O meio 1 apresentou a seguinte composição: NaNO_3 0,5% (m/v), KH_2PO_4 0,5 % (m/v), MgSO_4 1% (m/v) e tween 80 1% (m/v) (ROVEDA, 2007). Os

componentes foram solubilizados no efluente bruto do abatedouro de frangos filtrado com papel filtro Whatman, n. 1. O meio 2 consistiu da adição de todos os componentes citados no meio 1, porém, sem a adição do tween 80. O meio 3 consistiu apenas do efluente bruto filtrado e o meio 4 consistiu da adição de todos os componentes citados no meio 1, mas com a adição extra de peptona 2% (m/v) e extrato de levedura 0,1% (m/v). Além disso, este meio foi confeccionado com a solubilização de seus constituintes em água destilada e não no efluente. A Figura I.7 ilustra a constituição dos meios de cultivo citados. Após 10 dias de incubação em *shaker* foi realizada a análise de atividade enzimática, pH final e biomassa. Os experimentos para a obtenção do extrato bruto de lipase foram realizados em triplicata.

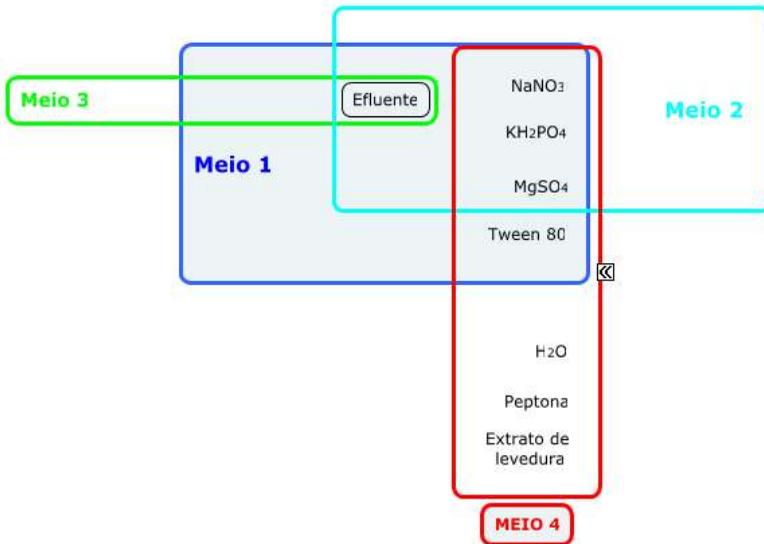


Figura I.7 - Constituição dos meios de cultivos 1, 2, 3 e 4.

I.4.2.7 Determinação da atividade enzimática

As análises da atividade enzimática foram realizadas utilizando-se o método de Chiou et al. (2004). Esse método se baseia na hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP) para o *p*-nitrofenol, que apresenta absorção em 410 nm, conforme ilustrado na Figura I.8.

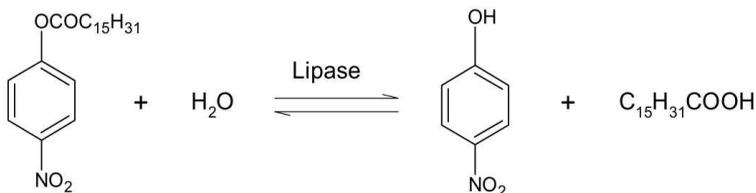


Figura I.8 - Reação de hidrólise enzimática do *p*-nitrofenilpalmitato.

Os dados foram obtidos com o auxílio de um espectrofotômetro UV-VIS VARIAN CARY 50. O procedimento consistiu na preparação do *p*-NPP dissolvendo-se 0,5 g do mesmo em 100 mL de álcool etílico absoluto. Para determinação da atividade foram utilizados: 100 μL de solução com lipase, 1000 μL de solução *p*-NPP e 1000 μL de tampão Tris-HCl pH 9,0. A solução resultante foi incubada à temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos em banho-maria. A reação foi encerrada através da adição de 2000 μL de uma de solução 0,5 N de carbonato de sódio. Foram retirados 2000 μL desta solução e adicionados em Eppendorfs para posterior centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi diluído em água destilada e submetido à análise espectrofotométrica (CHIOU et al., 2004).

Ainda com base no trabalho de Chiou et al. (2004), para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura, foi utilizado o valor de 15000 L/mol.cm relativo ao coeficiente de extinção molar.

O esquema para a determinação da atividade enzimática pode ser visualizado na Figura I.9. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima livre ou imobilizada necessária para hidrolisar 1 μmol de *p*-NPP por minuto.

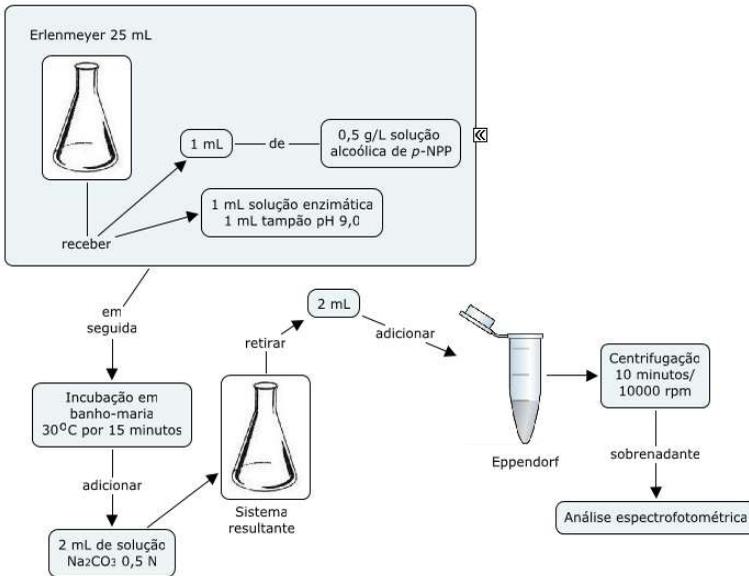


Figura I.9 - Método usado para análise de atividade enzimática. Fonte: Chiou et al. (2004).

I.4.2.8 Análise de biomassa

A análise da biomassa foi realizada através do método gravimétrico, a partir do qual os extratos brutos foram filtrados em papel filtro Whatman n. 1, previamente secos e pesados. O material retido nos filtros foi submetido ao processo de secagem com o uso de um forno micro-ondas da marca Panasonic, durante 10 minutos, sob potência de 180 W (OROZCO; PEREIRA; KILIKIAN, 2003). Em seguida, o conjunto (papel filtro + material retido seco) foi pesado em balança analítica BEL ENGINEERING® para determinação da biomassa seca. O filtrado foi utilizado para determinação de atividade enzimática e análise do pH final.

I.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.5.1 Caracterização do efluente bruto do abatedouro de frangos

Os resultados obtidos para a caracterização do efluente bruto do abatedouro de frangos encontram-se ilustrados na Tabela I.3. Para a realização de uma comparação com os dados obtidos por outros autores foi confeccionada a Tabela I.4.

A análise dos parâmetros citados na Tabela I.3 são importantes para se conhecer os gêneros de micro-organismos que eventualmente podem crescer no efluente em questão e se utilizar do mesmo para garantir suas exigências nutricionais.

Tabela I.3 - Resultados obtidos para as médias dos parâmetros físico-químicos do efluente bruto.

Parâmetro Analisado	Unidade	Valor Obtido
pH		7,31
condutividade	($\mu\text{S}/\text{cm}$)	887,90
P- PO_4^{-3}	(mg/L)	13,23
N- NH_3	(mg/L)	94,79
N- NO_2^-	(mg/L)	0,04
DBO ₅	(mg/L)	2799,41
DQO	(mg/L)	4567,76
OG	(mg/L)	901,83

Tabela I.4 - Valores de parâmetros físico-químicos de efluentes brutos de abatedouro de frango obtidos na literatura utilizando os mesmos métodos descritos neste trabalho.

Parâmetro analisado	Unidade	Bezerra et al. (2002)	Fernandes (2006)	Schoenthal; Sena; José (2006)	Brejinski et al. (2007)	Macagnan (2010)
pH		7,0	6,1	6,7	7,2	5,9
Condutividade	($\mu\text{S}/\text{cm}$)	ND	875	ND	974	ND
P- PO_4^{3-}	(mg/L)	ND	3,0	53,3	50	ND
N- NH_3	(mg/L)	5,9	221,8	11,04	84,91	56,1
N- NO_2^-	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND
DBO ₅	(mg/L)	1049	1050	ND	1500	ND
DQO	(mg/L)	1766	2899	1020	6336	6718
OG	(mg/L)	359	398,6	430	858	983

ND: Não determinado

Através dos resultados obtidos foi possível observar que o valor de pH manteve-se dentro da faixa de neutralidade. Esta situação pode ser atribuída à influência da fração oriunda da lavagem das caixas de deposição dos cortes de aves, onde normalmente se utiliza hipoclorito e outros produtos químicos de características alcalinas.

A condutividade elétrica é definida como a capacidade de conduzir corrente elétrica e também constitui um parâmetro importante para o crescimento. Para o efluente, objeto deste estudo, foi determinado um valor de condutividade elétrica que corrobora outros trabalhos citados na Tabela I.4. Uma hipótese que explica o fato desse tipo de efluente possuir o valor encontrado pode estar associada ao processo de lavagem das caldeiras, que contém diversos tipos de sais, fuligem e outros tipos de substâncias. Os valores obtidos para o fósforo na forma de fosfato também podem ter origem associada a detergentes. Além disso, tais valores também podem ser relacionados à degradação da matéria orgânica constituída por fosfolipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos. No que tange à associação deste parâmetro com crescimento fúngico é possível comentar que o fósforo é um macronutriente essencial. Segundo Griffin (1994), os fungos podem ter suas exigências nutricionais divididas em macronutrientes e micronutrientes. Os micronutrientes seriam aqueles que se tornam necessários em concentrações iguais ou inferiores a 10^{-6} mol/L. Os macronutrientes, com concentrações de aproximadamente 10^{-3} mol/L, englobam o hidrogênio, oxigênio, fósforo, nitrogênio, enxofre, magnésio e, principalmente, o carbono.

O efluente apresentou um valor para o nitrogênio amoniacal maior se comparado ao valor obtido para o nitrogênio na forma de nitrito. As formas existentes de nitrogênio nos efluentes indicam o tempo de vida do mesmo. Dessa forma, efluentes que possuem valores mais elevados de nitrito possuem um tempo de vida maior, devido ao processo de nitrificação encontrar-se em estágio mais avançado. Entretanto, em virtude do fato do efluente utilizado neste trabalho ter um tempo de vida curto, ele ainda possui elevadas concentrações de amônia. O valor obtido para o efluente em questão confirma em parte os valores apresentados nos trabalhos publicados e listados na Tabela I.4. A maior semelhança de valores obtidos para esse parâmetro foi encontrado no

trabalho de Brejinski et al. (2007) que, por sua vez, utilizou efluente semelhante. Os demais trabalhos possuem valores diferenciados por se tratarem de empresas que adotam outras sequências de linhas de produção, como por exemplo o caso de Fernandes (2006). Nesse caso o autor trabalha com um efluente que é produzido em uma linha de produção que agrega mais duas etapas de acúmulo da água residuária, um flotor primário e um flotor secundário. Possivelmente, em virtude deste acúmulo adicional do efluente houve um aumento significativo no valor obtido de nitrogênio amoniacal em relação ao valor obtido para o efluente utilizado neste trabalho. Esse comportamento pode ser explicado com base nas reações em sistemas aeróbios no qual parte da matéria nitrogenada, na forma de proteínas, é removida através de um processo de amonificação, que consiste na conversão da mesma por meio da ação de bactérias heterotróficas (SCHMIDELL et al., 2007).

De acordo com Griffin (1994), a amônia é altamente tóxica pelo fato de ser uma base forte. A toxicidade da amônia é ilustrada nos resultados publicados por Miranda et al. (1999). Esses autores estudaram a produção de lipase utilizando como fonte de carbono resíduos de uma refinaria de óleo vegetal da região nordeste do Brasil. Além disso, verificaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de lipase e constataram que o uso de amônia no meio de cultivo líquido acarreta em queda de 85% da produção de lipase, se comparado ao uso de sulfato de amônio.

Outro parâmetro indispensável nos estudos de caracterização dos efluentes industriais é o potencial de depleção de oxigênio causado pela matéria orgânica presente na água residuária em questão. A demanda de oxigênio pode ser avaliada através da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) ou demanda química de oxigênio (DQO⁸). Embora as duas técnicas tenham vantagens e desvantagens, a DQO é o parâmetro mais usado pela rapidez e simplicidade do método (AQUINO, 2003). A medida de DQO baseia-se na avaliação do potencial de matéria redutora de uma amostra, através de um processo de oxidação química em que se emprega um agente oxidante forte, como, por exemplo, o Dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇).

Segundo Schmidell (2007), a relação DBO₅⁹/DQO vem sendo

8 DQO - Quantidade de oxigênio necessária para oxidar quimicamente toda a matéria orgânica, levando-a a CO₂ e H₂O (SCHMIDELL, 2007).

9 DBO₅ - Quantidade de oxigênio necessária para oxidar biologicamente a matéria orgânica,

utilizada para medir o grau de biodegradabilidade de uma água residuária. Segundo o mesmo autor, quando o efluente possui um valor superior a 0,4, esse é um indício de que a água residuária em questão possui fácil biodegradabilidade. No caso do efluente utilizado neste trabalho o valor obtido foi de 0,6¹⁰.

Os valores de DBO também são utilizados como indicativo do possível impacto ambiental causado pelo efluente. Neste caso específico, um efluente com um alto valor de DBO deve possuir uma grande diversidade de micro-organismos envolvidos em sua degradação. O parâmetro mais importante analisado neste efluente é o elevado índice de óleos e graxas, pois em virtude de diversos processos evolutivos os micro-organismos desenvolveram formas de assimilar outras substâncias e utilizá-las como fontes de carbono, de acordo com a necessidade. Para exemplificar esta afirmação, podemos citar os fungos que produzem enzimas extracelulares com atividade lipolítica para hidrolisar lípidos a glicerol e ácidos graxos e possibilitar a assimilação de tais moléculas.

I.5.2 Isolamento dos fungos filamentosos a partir do efluente

O isolamento dos fungos filamentosos possíveis produtores de lipase foi realizado utilizando meios de cultivo seletivos através da adição do antibiótico cloranfenicol.

Para a verificação dos micro-organismos contidos no material lipídico tornou-se necessária a realização do pré-inóculo onde o efluente foi adicionado em um Erlenmeyer juntamente com extrato de levedura. O conjunto permaneceu em shaker orbital por 3 dias, a 25 °C e 100 rpm. Após o período de incubação, os Erlenmeyers, conforme ilustrado na Figura 1.10, foram retirados do *shaker* para a etapa posterior de inoculação do efluente enriquecido nos meios seletivos. Neste caso, o pré-inóculo é necessário para adaptar os micro-organismos que permaneceram com sua atividade metabólica estagnada em virtude do resfriamento do efluente após a realização de sua coleta.

degradada em 5 dias, sob condições padrão (T = 20 °C) (SCHMIDELL, 2007).

10 Valor obtido para a razão $DBO_5/DQO = 2799/4567=0,61$



Figura I.10 - Aspecto do efluente enriquecido com extrato de levedura após 3 dias de incubação em *shaker* orbital.

Com auxílio de uma alça de Drigalski, o efluente foi espalhado sobre a superfície do meio de cultivo e sucessivas inoculações das culturas de fungos filamentosos para novos meios de cultivo¹¹ contidos em placas de Petri foram realizadas até a obtenção das culturas axênicas. A Figura I.11 ilustra alguns dos isolados obtidos pelo método citado.

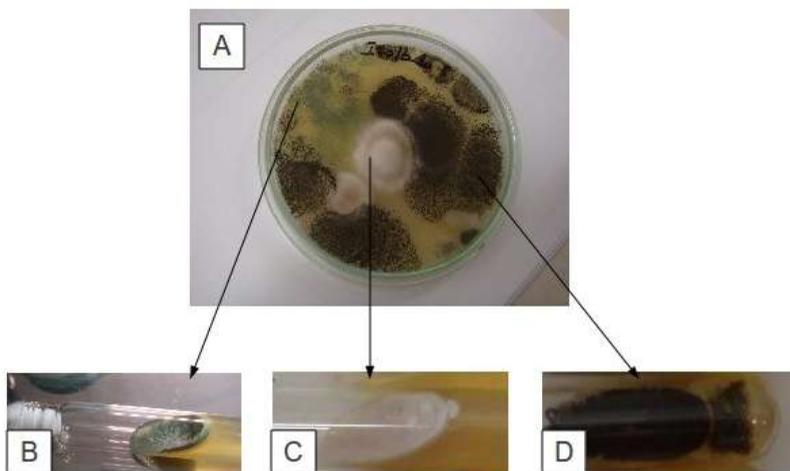


Figura I.11 - Fungos filamentosos crescidos em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol (A) e os mesmos fungos após processo de isolamento (Figuras B, C e D).

¹¹ Meio de cultivo: Ágar Sabouraud com cloranfenicol.

Após as etapas de isolamento dos fungos, foi possível obter 19 cepas que foram catalogadas de acordo com o aspecto da macrocolônia em termos de textura e cor do micélio formado. As culturas foram classificadas, quanto à sua textura, como: algodonosas, furfuráceas, penugentas, veludas, membranosas, glabras e cremosas. Foram manipuladas colônias com as características: aveludadas, algodonosas e pulverulentas, conforme lustrado na Figura I.12.

As cepas isoladas foram armazenadas em tubos de ensaio contendo o meio ágar Sabouraud com cloranfenicol inclinado e armazenadas em geladeira a 10 °C. A Figura I.13 mostra a foto de 12 dos 19 isolados fúngicos.

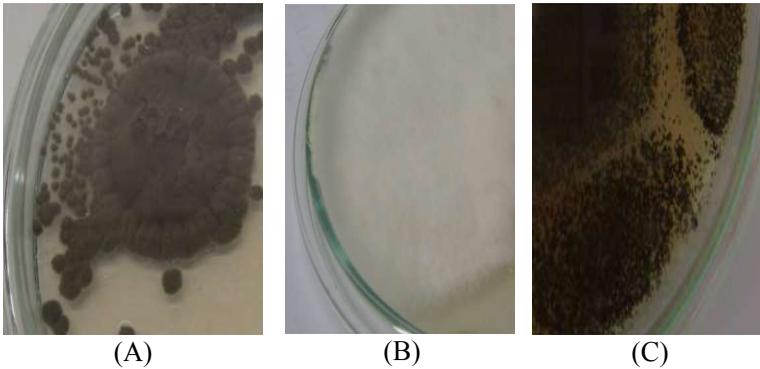


Figura I.12 - Aspecto das culturas oriundas da inoculação do efluente bruto de abatedouro de frangos em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol (A) aveludado; (B) algodonoso e (C) pulverulento ou furfurácea (com aspecto de farinha).



Figura I.13 - Imagem de 12 dos 19 isolados fúngicos armazenados em tubos de ensaio com meio inclinado de ágar Sabouraud e cloranfenicol.

O trabalho de Roveda (2007) ilustra o isolamento de 20 fungos filamentosos a partir de um efluente de laticínios, utilizando a mesma técnica de isolamento adotada neste trabalho. Das cepas isoladas por esse autor, as que produziram maior quantidade de lipase extracelular foram identificadas como: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum* e *Cladosporium herbarum*. A identificação dos fungos foi realizada através da técnica de microcultivo. No trabalho de Roveda (2007), um número semelhante de fungos foi isolado. Contudo, em outros trabalhos, observou-se um número menor de fungos filamentosos sendo isolados. Para exemplificar essa afirmação é possível citar o trabalho de Silva et al. (2007), que isolou 4 fungos filamentosos de águas residuárias de postos de combustíveis através do uso da técnica de Pour plate. Nessa análise, a técnica do microcultivo também foi utilizada para a identificação dos fungos: *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sp*, *Penicillium sp* e *Phoma sp*. O trabalho de Dartora et al. (2003) ilustra o uso de soro de queijo

para o isolamento de fungos filamentosos produtores de lipases. Nesse caso, os meios de cultivo foram desenvolvidos a partir do soro de queijo. O isolamento foi realizado por esgotamento em placas de Petri com meio de cultivo constituído por extrato de levedura, peptona, lactose e ágar. A identificação foi realizada através da observação microscópica das estruturas fúngicas. Foi possível verificar dois gêneros de fungos produtores de lipases: *Penicillium sp* e *Aspergillus sp*. Utilizando um tipo semelhante de efluente que o trabalho anterior, os resultados obtidos por Andretta, Damschi Junior e Onofre (2007) ilustram o isolamento de 6 cepas fúngicas: *Aspergillus flavus*, *Paecilomyces sp*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium herbarum* e *Aspergillus niger*. Os autores utilizaram a técnica de Pour plate com diluições seriadas do próprio efluente de laticínio no meio de cultivo constituído por ágar Sabouraud, peptona; extrato de levedura, tween 80 e amoxicilina, com o pH foi ajustado para 5,5.

I.5.3 Validação de métodos para determinação da atividade lipolítica

Os meios 1¹² e 2¹³ consistiram de duas formulações com o corante Rodamina B. Esse método se baseia no uso de um óleo vegetal como fonte de carbono e de substratos fluorimétricos para a identificação da atividade lipolítica. As amostras contendo enzima ou micro-organismo são inoculadas e quando ocorre resultado positivo, ou seja, quando ocorre atividade lipolítica, as colônias tornam-se rosa fluorescente, quando iluminadas com luz ultravioleta (LOCK, 2007).

A metodologia original correspondente ao meio 1 sugere o uso de uma concentração de Rodamina B de 0,001% e a visualização da formação do halo em 365 nm. Entretanto, os experimentos realizados com solução de lipase 100 % ou 1.200 U¹⁴/L tiveram uma visualização pouco nítida do halo, conforme a Figura I.14. Foi observado que apenas a adição de solução com porcentagens maiores de 20% de lipase comercial promoveram a formação de um pequeno halo fluorescente.

12 Meio 1: Ágar bacteriológico (15 g/L), Óleo de oliva 1% (m/v), Rodamina B 0,001 % (m/v) e tween 80 (0,001 g/L).

13 Meio 2: Ágar bacteriológico (15 g/L), Óleo de oliva 1% (m/v), Rodamina B 0,01% (m/v) e tween 80 (0,001 g/L).

14 U: Unidade de atividade enzimática ou quantidade de enzima livre necessária para hidrolisar 1 μmol de *p*-NPP por minuto e um litro de solução.

Essa constatação inviabiliza o uso deste método pelo fato de detectar apenas concentrações muito altas de lipase.

Com base nos resultados obtidos, uma variação do meio 1 foi realizada através da adição de uma porcentagem maior do corante Rodamina B, identificado como meio 2. Nesse meio, houve o surgimento de halos de formação, com soluções de diferentes porcentagens de lipase que variaram de 1 a 100%, conforme a Figura I.15. Foi constatado que os halos poderiam ser observados após 30 minutos, seguidos da adição das soluções enzimáticas nos orifícios. Além disso, os halos foram observados com porcentagens de enzima de aproximadamente 5%. Infelizmente, foi constatado que, sobre este meio, não houve o crescimento de micro-organismo. Apesar de não existir nenhum relato na literatura, aparentemente o aumento da concentração de Rodamina B promoveu a inibição do crescimento microbiano, conforme a Figura I.16. Apesar da inexistência de casos divulgados sobre a possível ação antimicrobiana da Rodamina B, o trabalho publicado por Moreira e Carvalho (2006) revela o possível efeito inibitório do crescimento de coliformes quando o corante é adicionado em sabões e produtos cosméticos. De qualquer modo, através desta constatação, pôde-se verificar que este meio não poderia ser utilizado para o rastreamento primário de micro-organismos produtores de lipases.

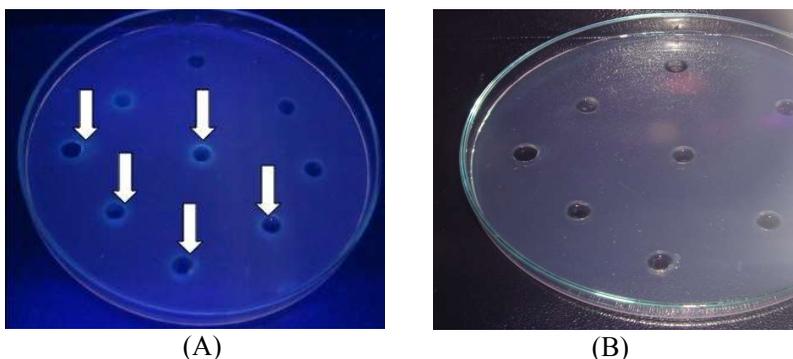


Figura I.14 - Placa de Petri com meio 1. Os orifícios foram preenchidos com soluções de diferentes porcentagens de lipase (5 a 100%). (A) Placa iluminada com luz UV 365 nm, onde as setas indicam os halos observados; (B) Placa iluminada com luz UV 256 nm.

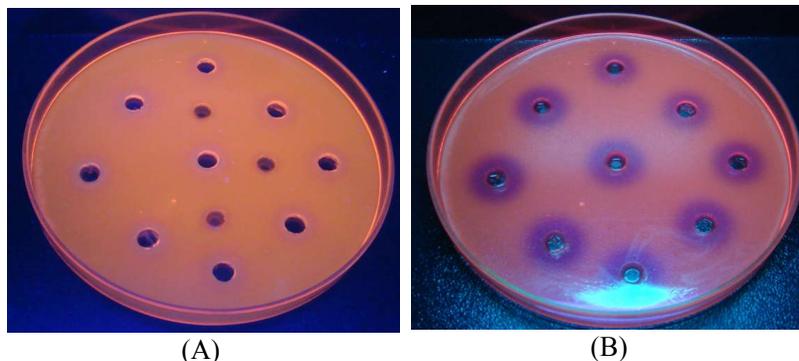


Figura I.15 - Placa de Petri com meio 2. Os orifícios foram preenchidos com soluções de diferentes porcentagens de lipase (5 a 100%). (A) Placa iluminada com luz UV 365 nm; (B) Placa iluminada com luz UV 256 nm.



Figura I.16 - Tubo de ensaio com meio 2, após sete dias decorridos da inoculação de *Penicillium sp.*

O teste seguinte foi realizado com o meio 3¹⁵, desenvolvido para avaliação da formação de sais de ácidos graxos identificados pelo precipitado em tubos de ensaio. Através deste meio foi possível avaliar a formação do precipitado relacionado à formação de éster de cálcio produzido pela ação da lipase extracelular sobre o tween 80 e o cloreto de cálcio no meio de cultivo (MACAGNAN, 2007). A formação do precipitado citado pode ser visualizado na foto da Figura I.17.

15 Meio 3: Ágar bacteriológico (20 g/L), Cloreto de cálcio anidro (0,5 g/L), Cloreto de sódio (5 g/L), Peptona bacteriológica (10 g/L) e tween 80 (10 g/L).



Figura I.17 - Setas indicando a formação do precipitado de ésteres de cálcio proveniente da produção de lipase extracelular de *Rhizopus oryzae* em tubo de ensaio com meio 3 inclinado, após 4 dias de incubação em estufa microbiológica a 25 °C.

Com o uso do meio 3, foi possível analisar os fungos produtores de lipase com o uso de um paquímetro para a determinação da altura de precipitado formado. A inoculação dos fungos no meio 3, ocorreu com o mesmo disposto de forma reta nos tubos de ensaio para facilitar as medidas.

Um ensaio realizado através da adição de 100 μ L de soluções com diferentes porcentagens de lipase comercial nos tubos com o meio 3 revelou que, através da medida da altura (cm) dos precipitados formados, foi possível obter uma curva de calibração, visando a determinação da concentração aproximada de lipase excretada pelos fungos (Figura I.18).

O último meio a ser testado foi o meio 4¹⁶, que também permitiu a visualização de halo. Entretanto, tal visualização só foi possível com adição de uma solução com porcentagem de no mínimo 80% (v/v)¹⁷ de lipase comercial (Figura I.19). Com base nos resultados apresentados, optou-se por utilizar, para o rastreamento primário, o meio 3, constituído por Ágar bacteriológico (20 g/L), Cloreto de cálcio anidro (0,5 g/L), Cloreto de sódio (5 g/L), Peptona bacteriológica (10 g/L) e tween 80 (10 g/L).

16 Meio 4: Ágar bacteriológico 2% (m/v), Cloreto de sódio 0,5% (m/v), Extrato de levedura 0,1% (m/v), Óleo de oliva 1% (m/v) e Peptona bacteriológica 2% (m/v).

17 Solução com atividade enzimática de 964,3 U/L.

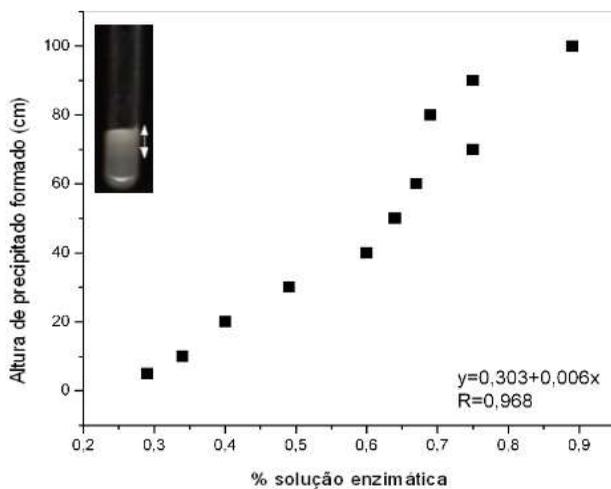


Figura I.18 - Curva de calibração obtida através da medida da altura do precipitado formado frente à adição de soluções com várias porcentagens de lipase comercial. No canto superior esquerdo da figura observa-se a formação do precipitado em um tubo de ensaio com o meio 3.

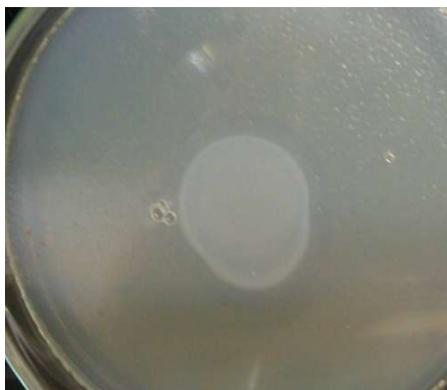


Figura I.19 - Observação da formação do halo de ésteres de cálcio através do gotejamento de uma solução 80% (v/v) de lipase.

As cepas fúngicas isoladas e as cepas adquiridas de coleções de culturas que reconhecidamente produzem lipase extracelular foram analisadas, de acordo com sua capacidade lipolítica, através do método que avalia a altura do precipitado formado em tubos de ensaio com o meio 3, constituído por Ágar bacteriológico (20 g/L), Cloreto de cálcio anidro (0,5 g/L), Cloreto de sódio (5 g/L), Peptona bacteriológica (10 g/L) e tween 80 (10 g/L). Os resultados encontram-se listados na Tabela I.5.

Através dos resultados obtidos foi possível observar que, das 19 cepas isoladas, apenas 3 apresentam atividade lipolítica, os isolados 7, 8 e 17. Na sequência da análise dos isolados fúngicos, foi realizada a reinoculação dos mesmos em um meio de cultivo constituído por ágar bacteriológico e o próprio efluente de abatedouro de frangos contido em uma placa de Petri. Após a inoculação, os fungos permaneceram em estufa microbiológica a 25 °C por 7 dias. Esse procedimento foi realizado para a obtenção do indício de que os referidos isolados eram originados do substrato de partida e não se tratavam de fungos anemófilos. Os resultados deste experimento mostraram que apenas os isolados 7 e 17 cresceram do referido meio. Desse modo e levando-se em consideração que o isolado 8 apresentou uma atividade lipolítica menor em relação aos isolados 7 e 17, conforme ilustrado na Tabela I.5, as próximas etapas passaram a ser conduzidas empregando-se apenas essas duas cepas.

Tabela I.5 - Resultados para o rastreamento primário de cepas fúngicas produtoras de lipase. Os símbolos (+++), (++) , (+) e (-) representam formação muito intensa de precipitado, formação média de precipitado, pequena formação de precipitado e nenhuma formação de precipitado, respectivamente.

Cepa fúngica testada	Resultado para a produção de lipase
<i>Monascus purpureus</i> (CCT 3802)	(+) ³
<i>Rhizopus oryzae</i> (ATCC 9092)	(+) ³
<i>Aspergillus niger</i>	(+ + +) ¹
<i>Penicillium simplicissimum</i> (CCT 6686)	(+ +) ²

Isolado #1	(-)
Isolado #2	(-)
Isolado #3	(-)
Isolado #4	(-)
Isolado #5	(-)
Isolado #6	(-)
Isolado #7	(+ +) ²
Isolado #8	(+) ³
Isolado #9	(-)
Isolado #10	(-)
Isolado #11	(-)
Isolado #12	(-)
Isolado #13	(-)
Isolado #14	(-)
Isolado #15	(-)
Isolado #16	(-)
Isolado #17	(+ +) ²
Isolado #18	(-)
Isolado #19	(-)

¹, ² e ³ Representam as proporções de precipitado formado. Baseando-se nos tubos com meio reto, foi possível verificar com auxílio de um paquímetro a formação do precipitado. Dessa forma: ¹ representa formação de 1 à 2 cm de precipitado ou aproximadamente a excreção de 1.394 à 3.394 U/L; ² representa a formação de 0,7 à 1 cm de precipitado ou aproximadamente a excreção de 794 à 1.394 U/L e ³ representa a formação de 0 à 0,7 cm de precipitado ou aproximadamente a excreção de até 794 U/L.

I.5.4 Análise das características dos isolados fúngicos

Após 2 e 6 dias de crescimento dos isolados com atividade lipolítica (7, 8 e 17) no aparato ilustrado na Figura I.13, a análise morfológica das estruturas dos fungos foi realizada com auxílio de um microscópio óptico. Para isso, as estruturas dos fungos foram coloridas com azul de lactofenol. Os principais aspectos analisados foram a morfologia das hifas e das estruturas reprodutivas (Figura I.20).

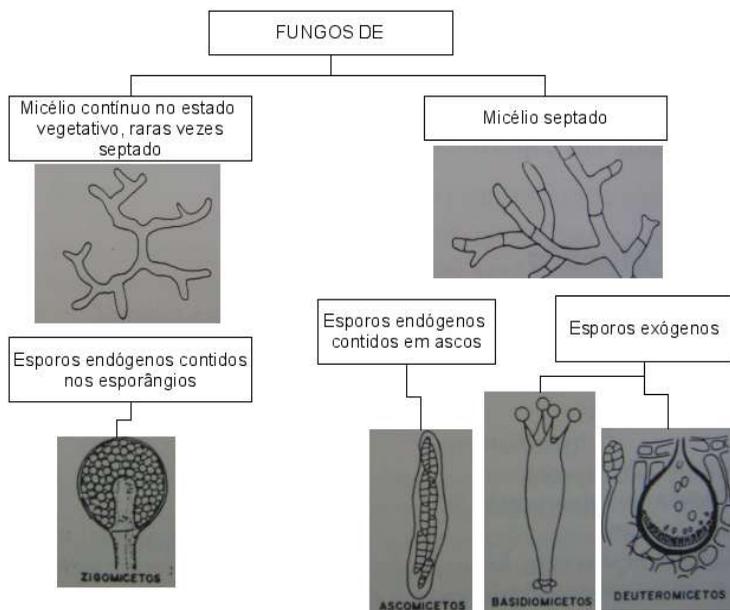


Figura I.20 - Chave das classes de fungos. Fonte: Silveira (1996).

Para o isolado 8, as imagens da Figura I.21 foram realizadas com aumento de 400X. Através das imagens da Figura I.21(A) foi possível verificar a presença de hifas septadas. Outra observação, realizada inclusive nas macrocolônias, foi quanto à presença de pigmento nas hifas conforme imagem da Figura I.21(B). Segundo Esposito e Azevedo

(2004), nesse caso o pigmento é a melanina. As melaninas possuem a função de proteger os organismos contra o stress ambiental, tais como exposição a metais pesados, dessecação, condições hiperosmóticas, temperaturas extremas, antagonismo com outros organismos, limitação de nutrientes, choque de pH, radiações ionizantes e luz ultravioleta (UV). Contudo, as melaninas fúngicas também promovem o desenvolvimento de hifas aéreas e conídios.

O microcultivo também possibilitou a visualização dos conídios, como ilustra a Figura I.21(C). Aqui, o conídio caracterizou-se por septos transversais, globosos, ovais ou elípticos, também chamados de feogramas. Outra observação importante é a presença de um apêndice terminal no ápice do esporo. De acordo com Lacaz, Porto e Martins (1991), a forma como os esporos estão dispostos - Figura I.21(D) - é característico do gênero *Alternaria*.



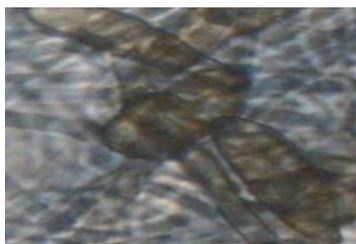
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura I.21 - (A) Detalhe de hifa septada; (B) Hifa demáceas; (C) Detalhe da morfologia do esporo; (D) Sequência dos conidióforos.

Para o isolado 17, as imagens da Figura I.22 foram realizadas com aumento de 400X, a partir do microcultivo. Através das Figuras I.22(A) e (B) foi possível observar que o fungo apresenta hifas septadas.

Também foi observado que o micélio não apresenta nenhum tipo de pigmentação, sendo formado por um micélio hialino. As estruturas apresentadas pelas Figuras I.22(C) e (D) representam um micélio septado, por meio do qual, aparentemente, ocorre fragmentação das hifas.

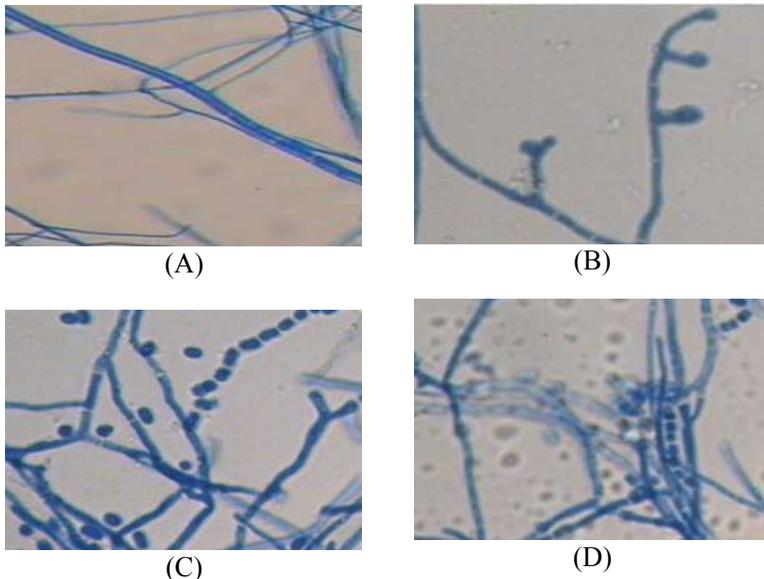


Figura I.22 - (A) e (B) Detalhes das hifas septadas; (C) e (D) Fragmentação das hifas.

Algumas das observações realizadas em microcultivos do isolado 7 encontram-se ilustradas na Figura I.23. Através das imagens foi possível observar que este fungo é constituído por hifas septadas e hialinas.



Figura I.23 - (A) e (B) Detalhe das hifas septadas.

Os isolados 7 e 17 também foram submetidos ao crescimento frente a diferentes meios de cultivo para posterior análise microscópica. Os fungos cresceram nos seguintes meios: Ágar sangue, Ágar BHI (*brain heart infusion*), Ágar Sabouraud com cloranfenicol, Ágar Sabouraud com cicloheximida e BDA (batata, dextrose e ágar), a 25 °C por 6 dias.

Os ensaios também revelaram que, através das análises microscópicas, foi possível observar apenas a presença de hifas, tal como ilustrado na Figura I.24. Essa constatação também foi feita mesmo quando os fungos cresciam em diferentes meios de cultivo. As observações da micromorfologia realizadas para os isolados 7 e 17 não foram conclusivas para a identificação em nível de gênero dos isolados selecionados.

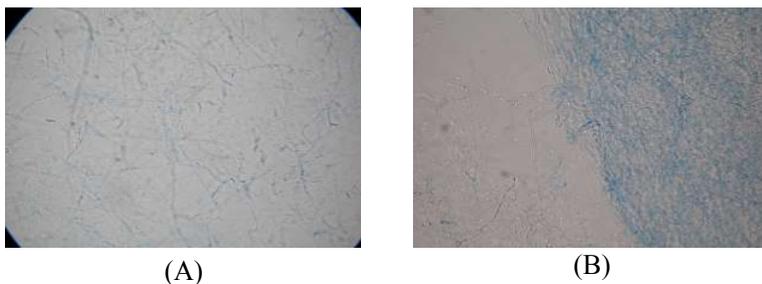


Figura I.24 - Análises microscópicas dos isolados 7 (A) e 17 (B) submetidos ao crescimento em meio BDA após 6 dias a 25 °C.

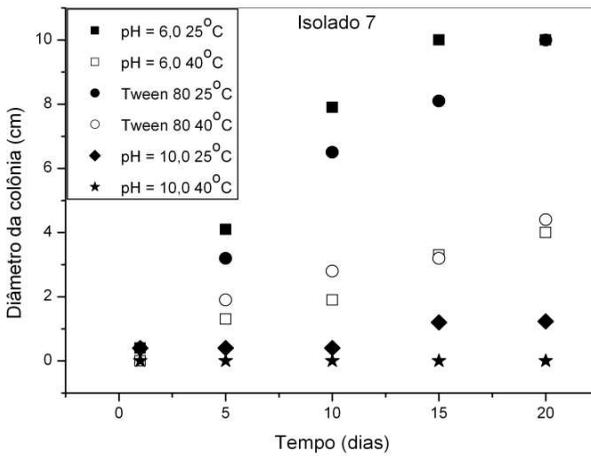
De acordo com Gherbawy e Voigt (2010), o crescimento de tais tipos de fungos em diferentes formulações de meios de cultivo ou

mesmo sob vários tipos de condições de incubação podem promover a esporulação dos fungos. Entretanto, segundo Guo, Hyde e Liew (2000), grande parte dos fungos isolados, especialmente os endofíticos, não produzem qualquer tipo de esporo e assim, não podem ser enquadrados com nomes taxonômicos. Segundo esse mesmo autor, os fungos que possuem essa característica são enquadrados em um grupo denominado por *Mycelia Sterilia*, que significa micélio estéril. No entanto, a organização em diferentes morfotipos não possibilita classificar tais tipos de fungos em seus diferentes gêneros e espécies.

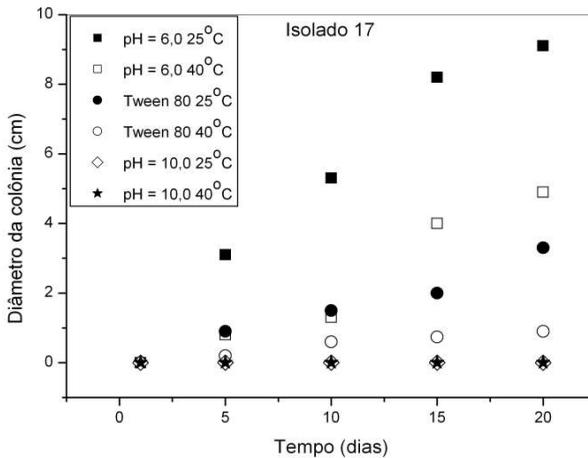
Outro aspecto interessante refere-se ao ciclo de vida dos fungos, que é diferente ao dos animais e das plantas, já que não é obrigatório, mas sim facultativo. Segundo Esposito e Azevedo (2004), se as condições do meio são ideais para o crescimento somático (vegetativo), então o crescimento deve ocorrer. Desse modo, é possível manter fungos vivos na sua forma somática (micelial ou leveduriforme) por longos períodos de tempo. Contudo, se o fungo ficar submetido a qualquer situação de stress, uma cadeia de eventos ocorre para o desenvolvimento da esporulação. Considera-se que as funções dos esporos são a produção de novos indivíduos, a dispersão para outro local e a sobrevivência do organismo até o retorno das condições mais adequadas para o seu crescimento (GRIFFIN, 1994). É possível dizer que a variabilidade morfológica dos esporos apresentadas pelos fungos é muito grande, sendo esta uma ferramenta estratégica para a identificação dos fungos em nível de gênero e até mesmo de espécie.

Buscando mais informações relacionadas aos aspectos das colônias, os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meios de cultivo com pH 10,0, pH 6,0 (controle negativo) e com a adição de tween 80 7,5% (v/v). A formulação desses meios foi realizada com o objetivo de promover stress no micro-organismo em função do elevado pH e da redução de oxigênio promovida pela adição do tween 80.

Tais resultados de crescimento foram obtidos com auxílio da metodologia de crescimento radial e da análise de biomassa. Através do método citado foi possível obter várias informações. Dentre elas, é possível citar as curvas de crescimento para os isolados fúngicos, que podem ser visualizadas na Figura 1.25.



(A)



(B)

Figura I.25 - Crescimento dos isolados 7 e 17 sobre meio de cultivo constituído por BDA pH 6,0 crescido a 25 °C ou Controle negativo, BDA + tween 80 crescido a 25 °C, BDA + tween 80 crescido a 40 °C e BDA pH 10,0

crescido a 25 °C.

Através da Figura I.25(A) é possível observar que o isolado 7 cresce mais rápido se comparado ao isolado 17, pois, quando a leitura de crescimento radial foi realizada no décimo quinto dia, o isolado 7 já havia crescido até as bordas da placa de Petri. Por outro lado, o isolado 17 cresceu até as bordas da placa após vinte dias de cultivo. De acordo com Anvisa (2011), o isolado 7 é considerado um fungo de crescimento intermediário e o isolado 17 é considerado um fungo de crescimento lento. A adição de tween aos meios de cultivo modificou a forma de crescimento dos isolados e, no caso do isolado 17, promoveu alteração na fase lag da curva de crescimento. As variações dos meios de cultivo sobre o crescimento dos isolados também pode ser visualizada através dos dados da Tabela I.6. Os dados relacionados à biomassa encontram-se ilustrados na Tabela I.7.

Tabela I.6 - Média de crescimento radial (cm/h) dos isolados 7 e 17 em diferentes meios e condições de cultivo.

Meio de cultivo	V _{CR} (cm/h)		Equação	
	7	17	7	17
BDA pH 6,0 25 °C*	0,689	0,543	$r=0,689t+0,260$	$r=0,543t+0,041$
BDA pH 6,0 40 °C	0,191-	0,360-	$r=0,191t+0,225$	$r=0,360t-2$
BDA + tween 80 25 °C	0,499	0,144-	$r=0,499t+0,546$	$r=0,144t+0,149$
BDA + tween 80 40 °C	0,192-	0,026-	$r=0,192t+0,579$	$r=0,026t+0,364$
BDA + pH 10,0 25 °C	0,083-	0-	$r=0,083t-0,302$	$r=0,4$
BDA + pH 10,0 40 °C	0-	0-	$r=0,4$	$r=0,4$

* Controle negativo

- Significativo e inferior ao controle negativo pelo teste de Dunnett ao nível de significância de 0,05.

Tabela I.7 - Média de biomassa fúngica (g) dos isolados em diferentes meios e condições de cultivo.

Meio de cultivo	Biomassa (g)	
Isolados	7	17
BDA pH 6,0 25 °C*	3,090	4,059
BDA pH 6,0 40 °C	2,360	1,90-
BDA + tween 80 25 °C	2,408	0,902 -
BDA + tween 80 40 °C	1,047 -	0,105 -
BDA + pH 10,0 25 °C	0,040 -	0,023 -
BDA + pH 10,0 40 °C	0,029 -	0,018 -

* Controle negativo

- Significativo e inferior ao controle negativo pelo teste de Dunnett ao nível de significância de 0,05.

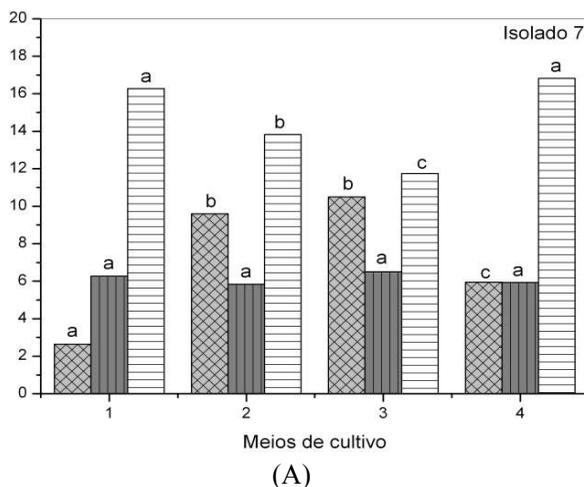
Com base nos resultados é possível verificar que a adição de tween 80 7,5% (v/v) inibiu o crescimento dos dois isolados de modo significativo assim como a elevação do pH. Após o término do cultivo dos fungos, uma lâmina com fragmentos dos fungos foi observada ao microscópio para verificar se houve a formação de estruturas de reprodução, tais como esporos sexuais. O resultado para esse teste foi negativo para ambos os fungos. Com relação ao isolado 7, não houve mudanças nos aspectos visuais da macrocolônia que, por sua vez, permaneceu com as mesmas características: forma filamentosa, com bordo filamento e elevação plana, sem pigmentação e com consistência seca. Quanto ao isolado 17 foi possível observar que suas características não seguiram o mesmo padrão nos diferentes meios e condições de cultivo. O fungo apresentou forma filamentosa no controle negativo. Porém, quando esse fungo foi submetido ao crescimento com meios contendo tween 80 e, especialmente, quando cresceu em temperatura de 40 °C e pH 6,0, o mesmo cresceu distinto ao anterior, possuindo forma irregular com bordo ondulado. A colônia adquiriu consistência

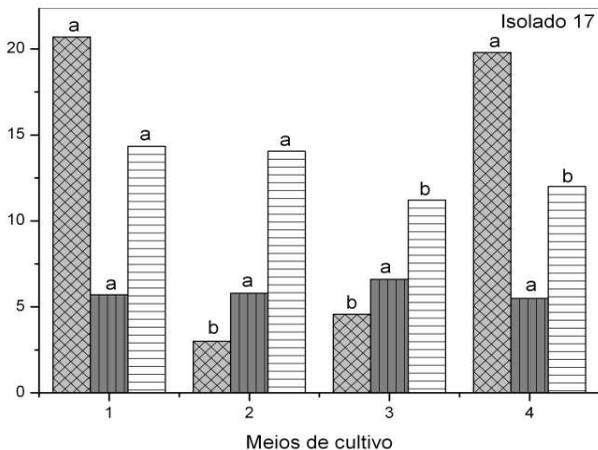
amanteigada e aspecto opaco.

I.5.5 obtenção do extrato bruto contendo lipase

Após o rastreamento primário, segundo Colen (2006), é usual submeter os isolados ao cultivo em substratos líquidos (submersos) para avaliação da produção da enzima. Além disso, é importante avaliar o desempenho do fungo quando exposto a diferentes condições de cultivo, o que permite identificar os fatores que significativamente influenciam na produção de lipase. Desse modo, o objetivo deste experimento foi selecionar, das duas cepas até então utilizadas, a cepa mais promissora para as etapas seguintes de otimização das condições do meio de cultivo para a obtenção do extrato bruto com maior atividade de lipase.

Conforme descrito anteriormente, os isolados fúngicos que se destacaram por sua atividade lipolítica em meio de cultura sólido foram submetidos ao processo de cultivo submerso para a obtenção do extrato bruto em quatro formulações de meios de cultivos diferentes descritos na Figura I.7. Os experimentos citados nessa seção também objetivaram selecionar e identificar os constituintes que mais afetaram a produção de lipase extracelular. Os resultados podem ser visualizados na Figura I.26 .





(B)

Figura I.26 - Representação das médias obtidas para as análises de atividade enzimática (U.mL⁻¹) (hachuras cruzadas), pH final (listras verticais), biomassa (mg) (listras horizontais) do extrato bruto produzido com os isolados 7 e 17 nos meios de cultivo 1, 2, 3 e 4. As médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

Através das análises foi possível observar que o isolado 17 foi o que possibilitou a produção de um extrato bruto com maior atividade enzimática. Os valores obtidos revelaram que o isolado 17 produziu 20,71 U/mL no meio 1 (NaNO₃ + KH₂PO₄ + MgSO₄ + tween 80 + efluente). Valor esse - aproximadamente o dobro do valor obtido para o mesmo meio 3 (efluente) - que favoreceu a maior produção de atividade enzimática pelo isolado 7, de 10,43 U/mL.

As análises de atividade enzimática não foram significativamente diferentes entre si em relação ao uso dos meios 2 (NaNO₃ + KH₂PO₄ + MgSO₄ + efluente) e 3 (efluente). Esse comportamento foi observado para os dois isolados. Também não houve diferença estatística visualizada entre os valores de atividade enzimática obtidos para os meio 1 (NaNO₃ + KH₂PO₄ + MgSO₄ + tween 80 + efluente) e 4 (NaNO₃ + KH₂PO₄ + MgSO₄ + tween 80 + peptona + extrato de levedura) para o isolado 17. Esses resultados ilustram que a adição do efluente parece ter efeito equivalente à adição das fontes orgânicas de nitrogênio. Em virtude das publicações que ilustram que a adição de fontes adicionais

de ácidos graxos induzem à produção de lipases e pelo fato do uso do efluente acarretar em um incremento em termos de fontes de carbono, nitrogênio e outros elementos, foi esperado que a atividade enzimática produzida com o meio 1 fosse mais elevada (MESSIAS et al., 2009; RIFAAT et al., 2010).

Sobre a importância da adição do efluente para a produção de lipase, é possível citar o trabalho de Roveda (2007). Esse trabalho ilustra o uso do efluente de laticínio tratado e não tratado sendo utilizado como meio de cultivo (acrescido de nitrato de sódio, fosfato monobásico de potássio, sulfato de magnésio e azeite de oliva) para fungos do gênero *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp, que anteriormente haviam sido isolados deste mesmo efluente. Os resultados revelaram que, após inoculação dos fungos e incubação por 4 dias a 30 °C e 130 rpm em *shaker* orbital, foi possível obter extratos brutos com atividades significativas, apresentando valores que variaram de 1250 a 2250 $\mu\text{molAG (mL.min)}^{18}$. Os valores citados foram obtidos com o uso do efluente bruto, pois o uso do efluente tratado não favoreceu a produção dos mesmos valores de atividade enzimática, principalmente porque esse efluente já possuía valores significativamente menores de carga orgânica e óleos e graxas.

Outros trabalhos ilustram a importância do uso de determinadas fontes de nitrogênio. O artigo de Rifaat et al. (2010) aponta que fontes de nitrogênio orgânicas possuem forte influência sobre a produção de lipase. Esse trabalho ilustra análises de atividade enzimática de cultivos submersos utilizando *Fusarium oxysporum* com várias fontes de nitrogênio, incluindo peptona, extrato de malte, nitrato de sódio e cloreto de amônio. Os resultados mostraram que o meio contendo peptona e extrato de malte foram os que mais favoreceram a produção de lipase. Por outro lado, o uso de ureia por esses mesmos autores inibiu não somente a produção de lipase, mas também a produção de biomassa. Esse mesmo trabalho ilustra que, em sete dias de cultivo submerso, foi obtido o maior valor de atividade enzimática, por outro lado, os valores de biomassa diminuíram após cinco dias de cultivo.

O uso de licor de milho e nitrato de amônio foram revelados como substratos que afetam significativamente e de forma positiva a produção de lipase no trabalho de Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004), o qual ilustra a otimização da produção de lipase por *Geotrichum* sp

18 Unidade de atividade enzimática: definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto por mL de meio fermentado, nas condições do ensaio (ROVEDA, 2007).

usando planejamentos fatoriais.

A importância de um meio constituído por óleos para atuarem como indutores da produção de lipase também pode ser conferida em diversas publicações, dentre as quais é possível citar o trabalho de Pinheiro (2006), que apresenta o uso de um meio de cultivo basal constituído por peptona bacteriológica, extrato de levedura e cloreto de sódio para a inoculação de *Penicillium verrucosum*. A este meio foram adicionados diferentes óleos para se verificar qual deles induzia mais a produção de lipase. Os resultados revelaram que o óleo de oliva foi o que proporcionou a obtenção de um extrato bruto com maior atividade de lipase. Dessa forma, é possível verificar que existem alguns componentes do meio que estimulam a produção de lipase, enquanto outros agem como inibidores. Segundo Lock (2007), a produção de lipase é inibida pelo catabolismo da glicose em seu metabolismo, como o caso da *Yersinia lipolytica*. Os indutores mais comuns para a produção de lipases são ácidos graxos e fontes orgânicas de nitrogênio, enquanto que os inibidores mais comuns são a glicose e o glicerol.

Com base nos resultados apresentados na Figura I.26, a produção de biomassa aparentemente não possui relação diretamente proporcional à produção de enzima. A produção de biomassa não foi significativamente diferente em relação aos quatro meios testados. Esses resultados corroboram as observações de Messias et al. (2009), que, por sua vez, realizaram a otimização da produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* e observaram que não havia relação existente entre a biomassa e a produção de lipase. O trabalho de Rifaat et al. (2010) ilustra o estudo da produção de lipase por *Fusarium oxysporum* utilizando vários tipos de carboidratos e óleos como fontes de carbono. De acordo com os resultados deste estudo, os autores também verificaram que os valores de massa celular não possuíam relação com a atividade enzimática, pois com o uso de glicose houve o maior crescimento fúngico (1,5 g/ 50 mL) sem a detecção de atividade enzimática. Por outro lado, o uso de óleo de oliva como fonte de carbono propiciou a obtenção de massa celular de 1,2 g/ 50 mL e atividade de 17 U/ mL. Lock (2006), que estudou a produção de lipase pela levedura *Debaryomyces melissophilus*, também fez uma constatação semelhante ao ilustrar que a maior produção de lipase não corresponde ao tempo de maior produção de biomassa. De acordo com esse mesmo autor, durante a fase log as proteínas consomem a maior parte das proteínas do meio. Contudo, durante a fase estacionária, existe

a necessidade de produzir proteínas, na forma de enzimas, para que seja possível o consumo de substratos, tais como o tween.

Em relação ao pH, foi possível verificar que não houve mudanças significativas entre os meios de cultivos utilizados. Essa constatação difere do trabalho de Lock (2006), que ilustra o estudo com a levedura *Debaryomyces melissophilus*. Nesse trabalho o autor utilizou peptona como um dos componentes do meio de cultivo e verificou que, ao longo do tempo, o pH sofreu aumento de 6,03 para 8,64, após 120 horas de cultivo. Segundo o autor, o aumento de pH ocorreu devido ao consumo de peptona que libera íons amônia ao ser degradada.

Os estudos até esta etapa mostraram que o isolado 17 produziu maiores valores de atividade enzimática, se comparado ao isolado 7. Dessa forma, a partir desta etapa, os estudos para a otimização das condições do meio de cultivo passaram a ser desenvolvidos com o isolado 17.

Os valores fixados de agitação para o *shaker* orbital e volume de trabalho do Erlenmeyer de 250 mL foram fixados em 100 rpm e 50 mL, respectivamente. Tais valores foram adotados com base no trabalho de Rifaat et al. (2010), que ilustra o estudo de produção de lipase por *Fusarium oxysporum* utilizando diferentes velocidades de agitação, que variaram de 0, 100, 150 e 200 rpm em diferentes volumes de trabalho em Erlenmeyers de 250 mL. Através desse estudo, os autores verificaram que não houve produção enzimática com agitação de 200 rpm. Porém, os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos com 100 e 150 rpm, havendo pequena diferença entre esses valores. Além disso, os maiores valores de atividade enzimática também foram obtidos utilizando o volume de trabalho de 50 mL para erlenmeyeres de 250 mL.

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efluente bruto de abatedouro de frangos foi submetido à caracterização físico-química, por meio do qual foi possível observar que o mesmo apresentou pH aproximadamente neutro e forma predominante de nitrogênio como amônia. Além disso, também foi observado que o efluente apresentou elevado valor para a razão DBO₅/DQO, comprovando sua característica muito biodegradável e um valor de óleos de graxas de 901,83 mg/L. O valor obtido para o parâmetro óleos de graxas foi semelhante a outros trabalhos que

ilustraram a caracterização de efluente com a mesma natureza ou de constituição química semelhante. A partir desse efluente foi possível isolar 19 cepas de fungos filamentosos, que, por sua vez, foram avaliadas em relação à sua atividade lipolítica. Para a realização deste experimento foi necessário testar diferentes métodos de detecção de micro-organismos lipolíticos em meios de cultivo sólidos contidos em placas de Petri. Os resultados obtidos revelaram que o meio mais adequado para a detecção de tais micro-organismos foi o que permitiu a visualização de precipitados de laurato de cálcio em tubos de ensaio com meio constituído por cloreto de cálcio e tween 80. Através desse método foi possível construir uma curva de calibração que relacionou soluções de diferentes porcentagens de lipase comercial e medida da altura do precipitado. A curva obtida apresentou um coeficiente de correlação de 0,968 e permitiu quantificar a lipase excretada pelos isolados fúngicos. Dos 19 isolados fúngicos obtidos, apenas 3 apresentaram atividade lipolítica: os isolados 7, 8 e 17. Através da técnica de microcultivo foi possível determinar que o isolado 8 possuiu microestruturas sugestivas do gênero *Alternaria*. Os demais isolados tiveram suas microestruturas observadas. Entretanto, não foi possível indicar os gêneros de tais micro-organismos devido à ausência de esporos. Apesar do fato dos isolados 7 e 17 não terem sido identificados, os mesmos foram selecionados para as etapas seguintes por apresentarem os maiores valores de atividades enzimáticas no meio citado anteriormente. Para favorecer o surgimento de esporos e verificar a velocidade de crescimento, os fungos foram submetidos ao crescimento em diferentes meios, temperaturas e pH(s), mas, ainda sim, nenhuma forma de estrutura de reprodução sexuada foi observada. Os fungos atingiram as taxas mais altas de crescimento quando foram cultivados em meio BDA, pH 6,0 a 25 °C. O isolado 17 apresentou o aspecto da macrocolônia distinta quando cresceu em temperatura de 40 °C, obtendo uma consistência amanteigada e aspecto opaco. Esta constatação indica a possibilidade do isolado 17 tratar-se de um fungo dimórfico. Os isolados 7 e 17 foram submetidos ao cultivo em meio submerso e sua capacidade de produzir lipase em 4 diferentes meios de cultivo foi analisada. Os resultados revelaram que o isolado 17 foi o que possibilitou a produção de um extrato bruto com maior atividade enzimática. Os valores obtidos revelaram que o isolado 17 produziu 20,71 U/mL no meio I ($\text{NaNO}_3 + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4 + \text{tween } 80 + \text{efluente bruto de abatedouro de frangos filtrado}$). Valor esse,

aproximadamente o dobro do valor obtido para o mesmo meio 3 (Efluente bruto de abatedouro de frangos filtrado), que favoreceu a maior produção de atividade enzimática pelo isolado 7, de 10,43 U/mL.

CAPÍTULO II

ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A MAIOR PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR POR FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO DE FRANGOS

II.1 RESUMO

Neste trabalho estudou-se a otimização de produção de lipase pelo isolado fúngico obtido de efluente de abatedouro de frangos. Para isso, o fungo foi cultivado em meios submersos a uma temperatura de 25 °C, agitação de 100 rpm por 10 dias. Com o uso do planejamento do tipo Plackett-Burman foi possível rastrear os fatores que mais influenciaram na produção de lipase pelo isolado fúngico. Neste caso, foi possível verificar que os fatores óleo de vísceras e tween 80 foram os que influenciaram significativamente e de forma positiva na produção de lipase. O meio de cultivo que permitiu a obtenção do maior valor de atividade enzimática, de 37,37 U/mL, foi constituído pelos maiores níveis de óleo de vísceras, tween 80, extrato de levedura, NH₄Cl, NaNO₃ e KH₂PO₄ e pelos menores níveis de peptona, pH inicial, óleo de oliva e MgSO₄ e efluente para solubilização dos componentes citados. Foi verificado, com o uso de um planejamento composto central rotacional, que as melhores condições para a produção enzimática foram obtidas no meio de cultivo contendo 3,41% (m/v) de óleo de vísceras e 2,00% (m/v) de Tween 80 acrescentados ao meio de cultivo basal. Quando o isolado cresceu sobre este meio foi obtido um valor de atividade enzimática de 43,51 U/mL. A otimização da concentração do extrato bruto enzimático foi realizada testando-se três métodos diferentes envolvendo o uso de sulfato de amônio, acetona e etanol. Os melhores valores de atividade específica e rendimento foram obtidos através do uso do agente precipitante sulfato de amônio à 40%.

II.2 ABSTRACT

In this work, it was studied the optimization of lipase production by the fungal isolate obtained from a chicken slaughterhouse effluent. To this end, the fungus was cultivated in submerged culture for 10 days at temperature of 25 °C and stirring of 100 rpm. By using Plackett-Burman experimental design, it was possible to trace the factors that most influenced the production of lipase by the fungal isolate. In this case, it was possible to verify factors viscera oil and Tween 80 affected significantly and positively the production of lipase. The culture that allowed the fungal isolate to achieve the highest enzyme activity value

of 37.37 U/mL, was constituted by the highest levels of viscera oil, Tween 80, yeast extract, NH_4Cl , NaNO_3 , KH_2PO_4 and the lowest levels of peptone, initial pH, olive oil, MgSO_4 and effluent for solubilization of the mentioned components. It was verified, by using rotational, central and composite design that the best conditions for enzyme production were obtained from the culture containing 3.41% (w/v) of viscera oil and 2.00% (w/v) of Tween 80 added to the basal culture. When the fungal isolate grew on that culture, it was obtained an enzymatic activity value of 43.51 U/mL. The concentration optimization of enzymatic raw extract was performed by testing three different methods involving the use of ammonium sulfate, acetone and ethanol. From the results, it was found the best obtained values for enzymatic activity; specific activity and yield were obtained through the use of precipitating agent ammonium sulfate at 40%.

II.3 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de ácidos graxos de cadeia longa a partir de acilgliceróis, geralmente atuando na interface óleo-água. Atualmente, as lipases, vêm sendo consideradas como o grupo de enzimas com maior potencial de emprego tanto em pesquisas científicas quanto em processos tecnológicos devido às suas características de estabilidade em solventes orgânicos, de quimioseletividade, de regioseletividade e de estereoseletividade. Elas estão disponíveis em grandes quantidades, podendo ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas. As lipases extraídas de microorganismos possuem características muito diversificadas e são obtidas em grandes quantidades (SAID; PIETRO, 2004; COLEN, 2006).

Segundo Illanes (2008), as lipases microbianas são produzidas principalmente por cultivo submerso. Muitos estudos têm sido realizados para a obtenção de um meio com as exigências nutricionais ideais para a produção de lipases. A obtenção desta enzima é fortemente influenciada por uma ampla gama de parâmetros de cultivo, tais como fontes de nitrogênio e carbono, pH, temperatura, agitação, concentração de oxigênio dissolvido e presença de uma fonte lipídica.

Das exigências nutricionais requeridas, a fonte de carbono é a mais importante para a síntese de lipases. Tal produção normalmente é induzida pela presença de óleos, ácidos graxos, triacilgliceróis, tweens, sais biliares e glicerol. Outras fontes de carbono, tais como açúcares,

soro de leite, polissacarídeos e aminoácidos, também influenciam fortemente a produção de lipase (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Para exemplificar essa afirmação é possível citar o trabalho de Wang, Xu e Shan (2008), que ilustra o estudo do efeito de diferentes ácidos graxos utilizados como substratos para a produção de lipase de *Rhizopus chinensis*. Nesse caso, os autores observaram que o ácido oléico foi o que influenciou mais fortemente a produção de lipase pelo fungo citado. Messias et al. (2009) realizaram a otimização da produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* e verificaram que os extratos brutos contendo as maiores atividades enzimáticas foram produzidos através do uso de Triton X-100 com ácido esteárico, ácido palmítico e ácido oléico. No trabalho de Volpato (2009), foram determinadas as condições necessárias para a máxima produção de lipase por *Staphylococcus warneri*. As condições determinadas foram: temperatura de 36 °C; pH 8,1; 30 g/L de glicerol; 3,0 g/L de óleo de oliva e 2,5 g/L de óleo de soja. Para Gordilho et al. (1998), que estudaram a produção de lipase por *Candida rugosa*, o óleo de oliva foi o melhor indutor, principalmente devido ao seu alto conteúdo de ácido oléico. No trabalho de Dalmau et al. (2000), é ilustrado um estudo do efeito de diferentes fontes de carbono (carboidratos, álcoois, ácidos e lipídeos) sobre a produção de lipase por *Candida rugosa*. Os autores verificaram que arabinose, ácido oxálico, álcool esteárico não foram utilizados como fonte de carbono pelo micro-organismo. O micro-organismo teve um bom crescimento, mas não produziu lipase nos meios suplementados com glicose, sorbitol, glicerol, ácido acético, ácidos succínico, ácido cítrico e ácido láctico como única fonte de carbono. Nessa circunstância, os melhores valores de atividade enzimática foram obtidos utilizando ácido palmítico no meio de cultivo. Os mesmos autores utilizaram fontes de carbono misturadas, por exemplo, um ácido graxo e um carboidrato, para avaliar o efeito de indução e fornecer ao micro-organismo a oportunidade de utilizar ambas fontes de carbono de modo simultâneo ou sequencial. Os resultados revelaram que o uso de misturas de fontes de carbono não aumentou a produção enzimática, embora a produção de biomassa tenha sido maior em alguns casos, sugerindo a possibilidade de um efeito de competição de alguma fonte de carbono solúvel ou uma relação entre produção de atividade extracelular e o consumo de ácidos graxos. De acordo com Carlile e Watkinson (1997), grande parte dos fungos utilizam carboidratos como fonte de carbono, o que indica a existência de uma gliconeogênese. Como o ciclo dos ácidos tricarbóxicos está

presente em quase todos os fungos, os intermediários do ciclo, tais como ácido cítrico e succínico, podem ser utilizados como fonte de carbono. Para os fungos que produzem lipases, a sua maioria utiliza o glicerol como fonte de carbono, devido à função de tais enzimas na hidrólise de lipídeos a glicerol e ácidos graxos.

Estudos publicados sobre a fisiologia da produção das lipases têm revelado que os mecanismos de regulação da biossíntese variam largamente em diferentes micro-organismos. Para ilustrar essa afirmação é possível citar o trabalho de Pokorny, Friedrich e Cimerman (1994), que estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de lipase de *Aspergillus niger*. Os autores verificaram que a biossíntese de lipase ocorreu em meio de cultivo sem lipídeos. Contudo, para aumentar tal produção, tornou-se necessária a adição de um indutor lipídico. Nesse caso, a atividade enzimática aumentou significativamente com a adição de óleo de oliva. No trabalho de Paparaskevas et al. (1992), um estudo de otimização de produção de lipase de *Rhodotorula glutinis* foi realizado. Os autores testaram diversas fontes de carbono, tais como óleos de origem vegetal e animal, carboidratos e ácidos graxos. Os resultados mostraram que, independente da fonte de carbono utilizada, a lipase foi produzida. Entretanto, a adição de óleo de palma ao meio de cultivo promoveu um aumento de atividade enzimática 12 vezes maior se comparado ao meio suplementado com frutose. No trabalho de Li, Cheng e Chen (2001), os autores realizaram um estudo de otimização da produção de lipase por *Acinetobacter radioresistens* utilizando ácido oléico, tween 80 e óleo de oliva. Os autores verificaram que apesar dos substratos induzirem significativamente a produção de lipase, a mesma foi produzida mesmo sem a adição de indutores lipídicos. Os resultados obtidos por esses autores mostraram que a produção de lipase parece ser constitutiva, embora a presença de uma fonte lipídica aumente a produção enzimática. Por outro lado, Sharma, Chisti e Banerjee (2001), comentaram que, em alguns casos, foi detectada a necessidade em se acrescentar uma fonte lipídica ao meio de cultivo para a produção de lipase. Para exemplificar essa afirmação é possível citar o trabalho de Gopinath et al. (2003). Os autores realizaram uma otimização da produção de lipase de *Geotrichum candidum* e verificaram a necessidade da adição da fonte lipídica para a síntese enzimática.

Em relação à espécie da fonte de carbono também é possível comentar que, de modo geral, o uso de carboidratos inibem a síntese de

lipase. Entretanto, no trabalho de Lin e Ko (2005) são divulgados resultados que mostram a necessidade da adição de glicose para aumentar a produção de lipase por *Antrodia cinnamomea*.

Outro importante fator para a produção de lipase é a natureza da fonte de nitrogênio. O nitrogênio orgânico é o mais indicado por influenciar positivamente na produção de lipase. Para exemplificar, as fontes de nitrogênio orgânico mais utilizadas são a peptona e o extrato de levedura. O meio contendo milhocina como fonte de nitrogênio foi utilizado por Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004) para produzir extrato bruto constituído pela maior atividade de lipase utilizando *Geotrichum* sp. Fontes de nitrogênio inorgânico como o cloreto de amônio e nitrato de amônio influenciam na produção de lipase, por alguns micro-organismos, conforme alguns relatos. Além da influencia da fonte de nitrogênio, também foi possível verificar que existem trabalhos que ilustram a influência de íons metálicos sobre a produção enzimática. No trabalho de Nudel et al. (2001), é ilustrado um aumento significativo da atividade de lipase por *Acinetobacter calcoaceticus* na presença de FeCl_3 . Porém, mais uma vez é possível notar que os resultados são bastante contraditórios. Também existem dados publicados por Sharma et al. (2002) sobre a exigência de Ca^{2+} para induzir a produção de lipase em *Bacillus* sp. Por outro lado, esses mesmos autores ilustram que a presença de íons metálicos, tais como o Fe^{+3} , inibiram a produção enzimática.

Outros parâmetros de cultivo submerso, tais como temperatura, pH, agitação e taxa de aeração também são importantes na produção de lipase microbiana.

A análise dos parâmetros que afetam significativamente a produção de lipase é de suma importância para a determinação das melhores condições de sua obtenção. A determinação de tais condições pode ser realizada através da metodologia de planejamento experimental, que, por sua vez, representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos com o objetivo de determinar a influência de diversos fatores nos resultados de um processo. Essa metodologia permite determinar os fatores mais influentes nos resultados, reduzir o número de ensaios sem prejuízo na qualidade da informação, determinar a confiabilidade dos resultados e representar o processo estudado através de expressões matemáticas.

Com base no contexto descrito, o presente estudo foi realizado com o objetivo de otimizar as condições experimentais para a obtenção da

máxima atividade de lipase pelo fungo previamente isolado do efluente de abatedouro. Neste trabalho também serão apresentados os métodos utilizados para a determinação da concentração da lipase contida no extrato bruto.

II.4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos o material e os métodos utilizados na realização das etapas de otimização das condições experimentais para a obtenção da máxima atividade de lipase pelo fungo isolado do efluente de abatedouro, denominado nesse trabalho como isolado 17. Além disso, neste capítulo, também encontram-se ilustrados os métodos utilizados para a concentração da lipase contida no extrato bruto, procedimento, este, que antecedeu sua imobilização no suporte sólido constituído por quitosana/argila. O esquema ilustrado na Figura II.1 descreve resumidamente as etapas experimentais do capítulo II.

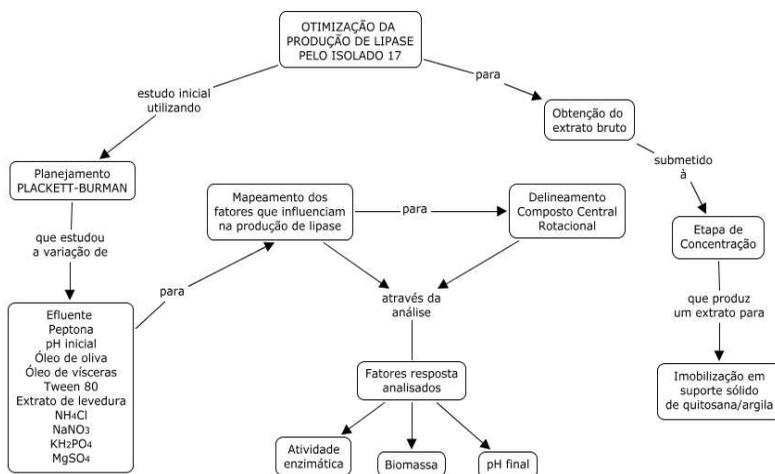


Figura II.1 - Resumo dos métodos realizados para o cumprimento das etapas do capítulo II - Estudos de otimização das condições experimentais para a maior produção de lipase extracelular por fungo filamentosso isolado de efluente de abatedouro de frangos.

II.4.1 Material

O efluente bruto e o óleo de vísceras foram adquiridos de um abatedouro de frangos da região da grande Florianópolis. O óleo de oliva, grau alimentar, foi adquirido da BUNGE. O álcool etílico 99% e os sais NH_4Cl , NaNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram obtidos da NUCLEAR. A Peptona bacteriológica e Extrato de levedura utilizados foram da DIFCO e a Acetona da SYNTH.

II.4.2 Métodos

II.4.2.1 Variação dos constituintes do meio de cultivo para a produção de lipase pelo fungo isolado do efluente de abatedouro de frangos

O isolado fúngico selecionado com base na sua atividade lipolítica foi submetido ao processo de cultivo submerso para a obtenção do extrato bruto. Para isso, a inoculação do isolado fúngico foi realizada através da adição de 5 mL de solução para inoculação obtida de acordo com o quadro A da Figura I.9. A referida inoculação foi realizada em Erlenmeyers aletados de 250 mL contendo 50 mL de volume de trabalho (meio de cultivo). Os Erlenmeyers foram adicionados em *shaker* orbital a 25 °C, 100 rpm por 10 dias.

Para avaliar o efeito de diversos componentes do meio de cultivo, em relação à produção de lipases, citados pela literatura e utilizados na constituição dos meios do experimento anterior, foi realizado um delineamento experimental. O delineamento utilizado neste trabalho é do tipo Plackett-Burman (PB), que, por sua vez, costuma a ser empregado para rastrear muitos fatores que potencialmente podem interferir no fator resposta, através de um número relativamente pequeno de experimentos (RUCHI; ANSHU; KHARE, 2008). Um conjunto de 12 ensaios foi construído com auxílio do *software* MINITAB 14 para 11 variáveis independentes: Efluente bruto de abatedouro de frangos, Peptona, pH inicial, Óleo de oliva, Óleo de vísceras, tween 80, Extrato de levedura, NH_4Cl , NaNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 . A Tabela II.1 ilustra o planejamento experimental confeccionado pelo *software* citado. O planejamento levou em consideração a inserção de mais 3 pontos centrais para que os principais efeitos das variáveis em estudo pudessem ser avaliados. Cada componente foi testado em dois níveis de

concentração, denominados alto e baixo. A faixa de concentração para cada componente foi: Efluente (0 – 50 mL), Peptona (0,5 – 2,0% m/v), pH inicial (5,5 – 6,5), Óleo de oliva (0,25 – 1,00% m/v), Óleo de vísceras (0,25 a 1,00% m/v), Tween 80 (0,25 a 1,00% m/v), Extrato de levedura (0,5 – 2,00% m/v), NH_4Cl (0,5 – 1,00% m/v), NaNO_3 (0,01 – 0,1% m/v), KH_2PO_4 (0,01 – 0,1% m/v), MgSO_4 (0,01 – 0,05% m/v). Os valores apresentados para as faixas de concentração foram baseados em relatos de publicações que possuíam como tema central a produção de biodiesel (ROVEDA, 2007; RUCHI; ANSHU; KHARE, 2008). Os fatores que influenciaram de forma significativa no fator resposta mapeados pelo planejamento PB foram utilizados como subsídio para a fase posterior de otimização do processo de produção de lipase, realizado através da metodologia de superfície de resposta ou também conhecida pela sigla MSR para obter a concentração ótima dos fatores individuais.

Tabela II.1 - Delineamento experimental PB para o estudo de 11 fatores com 15 ensaios. Ilustração das variáveis codificadas com valores reais. X₁: Efluente (mL); X₂: Peptona (% m/v); X₃: pH inicial; X₄: Óleo de oliva (% m/v); X₅: Óleo de víscera (% m/v); X₆: tween 80 (% m/v); X₇: Extrato de levedura (% m/v); X₈: NH₄Cl (% m/v); X₉: NaNO₃ (% m/v); X₁₀: KH₂PO₄ (% m/v); X₁₁: MgSO₄ (% m/v).

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁
1	50,00	0,50	6,50	0,25	0,25	0,25	2,00	1,00	0,10	0,01	0,05
2	50,00	2,00	5,50	1,00	0,25	0,25	0,50	1,00	0,10	0,10	0,01
3	0,00	2,00	6,50	0,25	1,00	0,25	0,50	0,50	0,10	0,10	0,05
4	50,00	0,50	6,50	1,00	0,25	1,00	0,50	0,50	0,01	0,10	0,05
5	50,00	2,00	5,50	1,00	1,00	0,25	2,00	0,50	0,01	0,01	0,05
6	50,00	2,00	6,50	0,25	1,00	1,00	0,50	1,00	0,01	0,01	0,01
7	0,00	2,00	6,50	1,00	0,25	1,00	2,00	0,50	0,10	0,01	0,01
8	0,00	0,50	6,50	1,00	1,00	0,25	2,00	1,00	0,01	0,10	0,01
9	0,00	0,50	5,50	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00	0,10	0,01	0,05
10	50,00	0,50	5,50	0,25	1,00	1,00	2,00	1,00	0,10	0,10	0,01
11	0,00	2,00	5,50	0,25	0,25	1,00	2,00	0,50	0,01	0,10	0,05

127

12	0,00	0,50	5,50	0,25	0,25	0,25	0,50	1,00	0,01	0,01	0,01
13*	25,00	1,25	6,00	0,63	0,63	0,63	1,25	0,63	0,06	0,06	0,03
14*	25,00	1,25	6,00	0,63	0,63	0,63	1,25	0,63	0,06	0,06	0,03
15*	25,00	1,25	6,00	0,63	0,63	0,63	1,25	0,63	0,06	0,06	0,03

* Ponto central

II.4.2.1 Aplicação da metodologia rsm para otimização da produção de lipase pelo isolado fúngico

Um estudo através do delineamento composto central rotacional (CCD²) foi utilizado e desenvolvido com auxílio do *software* STATISTICA 6.0. O CCD foi utilizado para otimizar a concentração dos fatores que significativamente influenciam no aumento da produção de lipase e que, por sua vez, foram identificados no item anterior. Dessa forma, uma variação de óleo de vísceras e tween 80 foi estudada conforme ilustrado na Tabela II.2.

Tabela II.2 - Delineamento experimental CCD com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 4 repetições do ponto central. Ilustração das variáveis codificadas e reais.

Ensaio	X ₁	X ₂	Óleo de Vísceras (% m/v)	Tween 80 (% m/v)
1	-1	-1	1,00	1,00
2	-1	1	1,00	3,00
3	1	-1	3,00	1,00
4	1	1	3,00	3,00
5	-1,41	0	0,59	2,00
6	1,41	0	3,41	2,00
7	0	-1,41	2,00	0,59
8	0	1,41	2,00	3,41
9*	0	0	2,00	2,00
10*	0	0	2,00	2,00
11*	0	0	2,00	2,00
12*	0	0	2,00	2,00

* Ponto central

Os fatores resposta foram analisados pelo *software* STATISTICA 6.0, o qual possibilitou a geração de superfícies de resposta indicando a concentração ótima ou o caminho a ser explorado para obtenção da mesma e além da interação entre os fatores estudados. Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers aletados de 250 mL com 50 mL de volume de trabalho e com pH corrigido para 5,5 com auxílio de uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L. Os Erlenmeyers foram incubados em *shaker* por 10 dias, a 25 °C e 100 rpm.

II.4.2.3 Concentração do extrato bruto

De acordo com Saxena et al. (2003), a maioria das aplicações comerciais para as lipases não exigem que a mesma seja utilizada com elevado grau de pureza, pois 80% dos procedimentos de pré-purificação envolvem etapas de precipitação das proteínas. Ainda, segundo os mesmos autores, dos procedimentos de precipitação mencionados, 60% ocorrem com a adição de sulfato de amônio e 35% ocorrem através do uso de etanol, acetona ou algum tipo de ácido. Dessa forma, nesta etapa, foram testados três procedimentos de precipitação envolvendo o uso de sulfato de amônio, acetona e etanol.

O teste envolvendo o uso do sulfato de amônio pode ser visualizado através da Figura II.2. Neste caso, um volume de 50 mL de extrato bruto foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado na fase superior 12,15 g de sulfato de amônio para obtenção de um precipitado de proteínas. A adição da referida massa de sulfato de amônio corresponde à obtenção de uma solução com 40% de saturação. Após a adição da massa de sulfato de amônio, a solução permaneceu em repouso por 4 horas, à temperatura de aproximadamente 4 °C. Outras massas de sulfato de amônio também foram testadas anteriormente para a obtenção de soluções com 20 e 30% de saturação. Porém, a formação de precipitado só foi possível com 40% de saturação. Na sequência, o sobrenadante foi separado por centrifugação e o precipitado resultante foi ressuspendido em 2 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 8,0) (ZERAİK et al., 2008).

O método envolvendo o uso da acetona e etanol está ilustrado no esquema da Figura II.3. O mesmo procedimento foi aplicado para os

dois solventes citados.

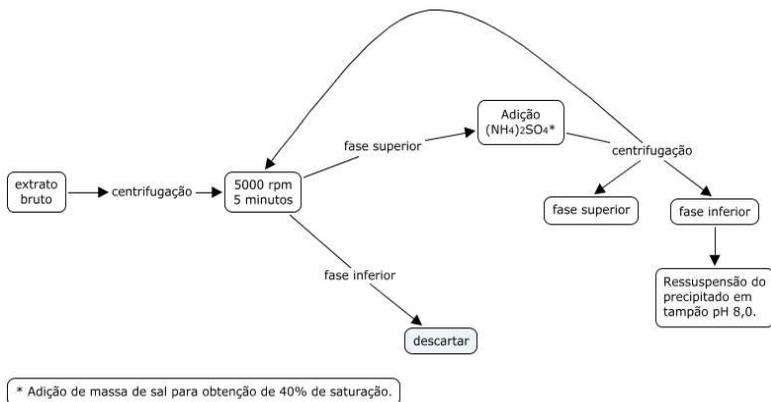


Figura II.2 - Método adotado para a concentração do extrato bruto utilizando o sulfato de amônio. Fonte: Zeraik et al. (2008).

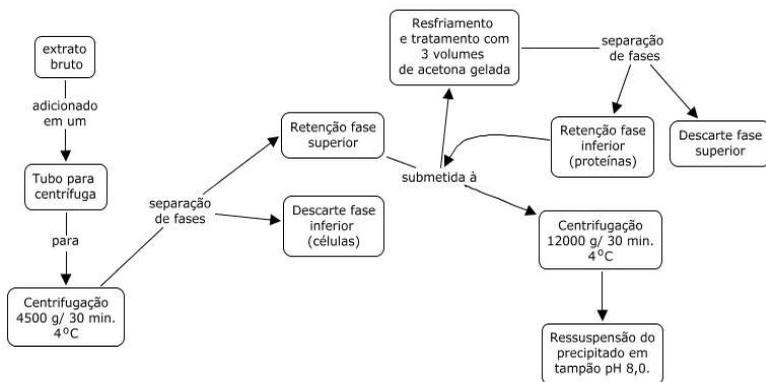


Figura II.3 - Método adotado para a precipitação de proteínas utilizando a acetona e etanol. Fonte: Yu; Qin; Tan (2007).

II.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.5.2 Estudo da variação dos constituintes do meio de cultivo para a produção de lipase pelo fungo isolado do efluente de abatedouro de frango

Segundo Rodrigues e Iemma (2005), quando mais de cinco variáveis independentes são investigadas, o método de Plackett-Burman pode ser utilizado para encontrar as variáveis significativas que são otimizadas em estudos posteriores. Essa técnica permite a avaliação de $X-1$ variáveis em X experimentos. O valor de X deve ser um múltiplo de 4 (4, 8, 12, 16, 20, 24). O delineamento de PB é excelente para uma avaliação prévia das variáveis e para a seleção daquelas que devem ser consideradas até se chegar no delineamento composto central rotacional. Para isso neste trabalho foi realizado o planejamento PB para avaliar a influência de 11 fatores ou variáveis sobre a produção de lipase. A Tabela II.3 ilustra os fatores analisados e o fator resposta, através do qual foi possível verificar que, para o ensaio 10, foi obtido o maior valor de atividade enzimática. Os resultados adicionais à atividade enzimática, relacionados ao pH final e à biomassa, podem ser visualizados na Figura II.4(A).

Tabela II.3 - Delineamento experimental PB e resultados. Ilustração das variáveis codificadas com valores reais. X₁: Efluente (mL); X₂: Peptona (% m/v); X₃: pH inicial; X₄: Óleo de oliva (% m/v); X₅: Óleo de víscera (% m/v); X₆: tween 80 (% m/v); X₇: Extrato de levedura (% m/v); X₈: NH₄Cl (% m/v); X₉: NaNO₃ (% m/v); X₁₀: KH₂PO₄ (% m/v); X₁₁: MgSO₄ (% m/v); X₁₂: Atividade enzimática (U/mL).

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂
1	50,00	0,50	6,50	0,25	0,25	0,25	2,00	1,00	0,10	0,01	0,05	0,61
2	50,00	2,00	5,50	1,00	0,25	0,25	0,50	1,00	0,10	0,10	0,01	12,07
3	0,00	2,00	6,50	0,25	1,00	0,25	0,50	0,50	0,10	0,10	0,05	16,34
4	50,00	0,50	6,50	1,00	0,25	1,00	0,50	0,50	0,01	0,10	0,05	18,60
5	50,00	2,00	5,50	1,00	1,00	0,25	2,00	0,50	0,01	0,01	0,05	20,13
6	50,00	2,00	6,50	0,25	1,00	1,00	0,50	1,00	0,01	0,01	0,01	34,50
7	0,00	2,00	6,50	1,00	0,25	1,00	2,00	0,50	0,10	0,01	0,01	11,56
8	0,00	0,50	6,50	1,00	1,00	0,25	2,00	1,00	0,01	0,10	0,01	21,05
9	0,00	0,50	5,50	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00	0,10	0,01	0,05	26,82
10	50,00	0,50	5,50	0,25	1,00	1,00	2,00	1,00	0,10	0,10	0,01	37,36
11	0,00	2,00	5,50	0,25	0,25	1,00	2,00	0,50	0,01	0,10	0,05	21,34

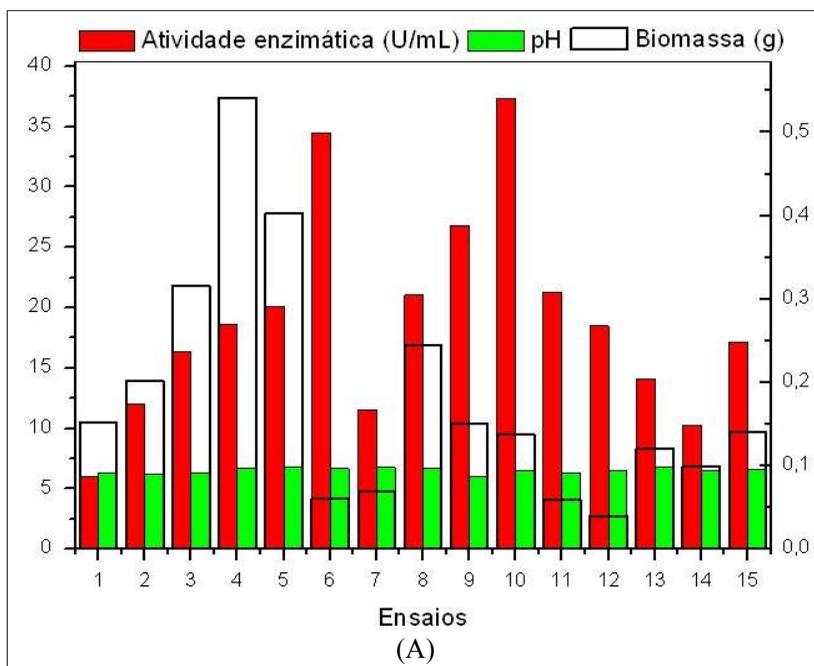
133

12	0,00	0,50	5,50	0,25	0,25	0,25	0,50	1,00	0,01	0,01	0,01	18,51
13*	25,00	1,25	6,00	0,63	0,63	0,63	1,25	0,63	0,06	0,06	0,03	14,09
14*	25,00	1,25	6,00	0,63	0,63	0,63	1,25	0,63	0,06	0,06	0,03	10,23
15*	25,00	1,25	6,00	0,63	0,63	0,63	1,25	0,63	0,06	0,06	0,03	17,15

* Ponto central

A condição que acarretou na obtenção do maior valor de atividade enzimática possui como característica o uso do efluente para solubilização dos componentes, uso dos maiores níveis para óleo de vísceras, tween 80, extrato de levedura, NH_4Cl , NaNO_3 e KH_2PO_4 e uso dos menores níveis para peptona, pH inicial, óleo de oliva e MgSO_4 .

Com base nos dados da Tabela II.3, foi possível verificar o comportamento da atividade enzimática, pH final e biomassa ao longo dos ensaios, conforme visualizado na Figura II.4(A). Com os dados da Tabela II.3, foi realizada análise estatística através da qual foi possível conhecer os efeitos das variáveis sobre a atividade enzimática. Esses resultados encontram-se ilustrados na Figura II.4(B). A figura mostra que a variável que interfere de forma significativa - ao nível de confiança de 90% - sobre a atividade enzimática foi o óleo de vísceras e o tween 80.



Termo	Efeito	Coefficiente	T	p
Efluente	1,275	0,638	0,64	0,589
Peptona	-1,168	-0,584	-0,58	0,619
pH inicial	-5,595	-2,798	-2,79	0,108
Óleo de oliva	-3,072	-1,536	-1,53	0,265
Óleo de vísceras	12,252	6,126	6,12	0,026
Tween 80	10,245	5,122	5,12	0,036
Extrato de levedura	-2,465	-1,233	-1,23	0,343
NH ₄ Cl	-1,018	-0,509	-0,51	0,662
NaNO ₃	-4,895	-2,448	-2,44	0,134
KH ₂ PO ₄	2,438	1,129	1,22	0,347
MgSO ₄	-5,202	-2,601	-2,60	0,122

(B)

Figura II.4 - (A) Resultados para atividade enzimática (U/mL), pH final e biomassa (g) para os 15 ensaios planejados; (B) Resultados dos efeitos e coeficientes para o planejamento PB.

O fato de o planejamento experimental realizado neste trabalho não ter revelado influencia significativa dos diferentes níveis das fontes de nitrogênio sobre a atividade enzimática difere de boa parte dos trabalhos apresentados na literatura. Dentre os quais é possível citar o trabalho de Rifaat et al. (2010), que ilustra a produção de lipase utilizando diferentes fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico com o *Fusarium oxysporum*. Os autores desse trabalho observaram que o uso de peptona, extrato de malte e caseína propiciaram a produção dos maiores valores de atividade enzimática.

Segundo Freire et al. (1997), fontes complexas de nitrogênio, tais como extrato de levedura, peptona e água de maceração de milho, têm sido tradicionalmente utilizadas para a produção de lipase. Ainda segundo esses mesmos autores, o uso da peptona promoveu um aumento da produção de atividade de lipase por cepas por *Penicillium* por conter cofatores e aminoácidos que induzem o processo.

A ureia não foi selecionada para ser avaliada neste trabalho como

fonte de nitrogênio devido ao fato de haver publicações ilustrando que a mesma inibe o crescimento do fungo e a produção de lipase (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; RIFAAT et al., 2010).

Através da foto ilustrada na Figura II.5 foi possível observar o aspecto do meio de cultivo do ensaio 10 que possuiu o maior valor de atividade enzimática. A turbidez do meio pode ser associada ao tween adicionado. Devido ao fato do tween ser um surfactante não aniônico, geralmente é utilizado para obtenção de emulsões do tipo óleo em água. Essa característica deve fazer com que o mesmo seja importante para aumentar o contato do fungo com as substâncias presentes no meio de cultivo, especialmente o óleo de vísceras.

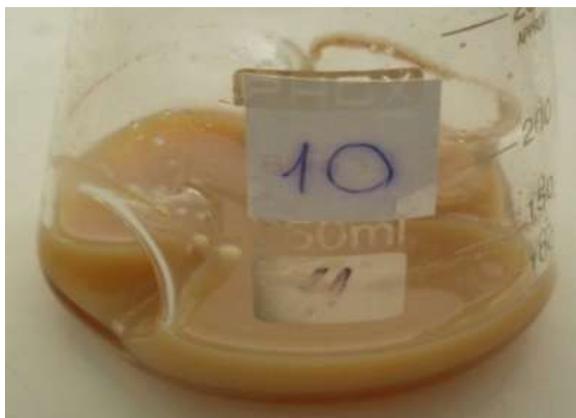


Figura II.5 - Erlenmeyer contendo meio descrito pelo ensaio 10 (50 mL efluente, 0,5% (m/v) de peptona, pH 5,5, 0,25% (m/v) de óleo de oliva, 1% (m/v) de óleo de vísceras, 1% (m/v) de tween 80, 2% (m/v) de extrato de levedura, 1% (m/v) de NH_4Cl , 0,1% (m/v) de NaNO_3 , 0,1% (m/v) de KH_2PO_4 , 0,01% (m/v) de MgSO_4) após 10 dias de incubação com o isolado 17 a 25 °C e 100 rpm.

A partir dos resultados ilustrados, um novo planejamento foi idealizado. Foi selecionado o delineamento composto central rotacional (CCD), elaborado através da variação dos fatores (óleo de vísceras e tween 80), conforme ilustrado na Tabela II.2. Os demais constituintes do meio de cultivo foram mantidos em seus menores níveis.

II.5.2.2 Aplicação da metodologia rsm para otimização da produção de lipase pelo fungo isolado do efluente de abatedouro de frangos

Dando seqüência ao processo de otimização da produção de lipase e levando-se em consideração os dados obtidos no experimento anterior, um novo delineamento experimental foi traçado com o objetivo de se atingir uma condição ótima de produção enzimática oriunda de um cruzamento de variáveis. Para isso, foi utilizado o delineamento experimental com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 4 repetições do ponto central. A Tabela II.4 ilustra as variáveis independentes e as variáveis dependentes originadas do planejamento citado.

Tabela II.4 - Delineamento experimental CCD com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 4 repetições do ponto central. Representação das variáveis com valores reais.

Ensaio	Óleo de vísceras (% m/v)	Tween 80 (% m/v)	Atividade enzimática (U/mL)	pH final	Biomassa (mg)
1	1,00	1,00	22,52	6,6	0,182
2	1,00	3,00	25,36	6,3	0,126
3	3,00	1,00	37,83	6,2	0,262
4	3,00	3,00	38,04	6,3	0,245
5	0,59	2,00	21,86	7,1	0,128
6	3,41	2,00	43,51	6,6	0,493
7	2,00	0,59	26,67	7,3	0,169
8	2,00	3,41	36,73	7,7	0,359
9*	2,00	2,00	36,08	7,6	0,110
10*	2,00	2,00	33,23	6,9	0,204
11*	2,00	2,00	29,95	7,1	0,160
12*	2,00	2,00	26,89	7,5	0,058

* Ponto central

Através dos dados obtidos pela Tabela II.4 foi possível observar que o maior valor de atividade enzimática obteve-se com o meio de cultivo constituído pela maior concentração de óleo de vísceras. Através da análise exploratória dos dados obtidos observou-se que os mesmos ajustam-se de maneira satisfatória a uma distribuição normal. Nesse caso, não há necessidade de tratamento matemático dos dados para promover melhor ajuste dos mesmos a uma reta normal, conforme ilustrado na Figura II.6.

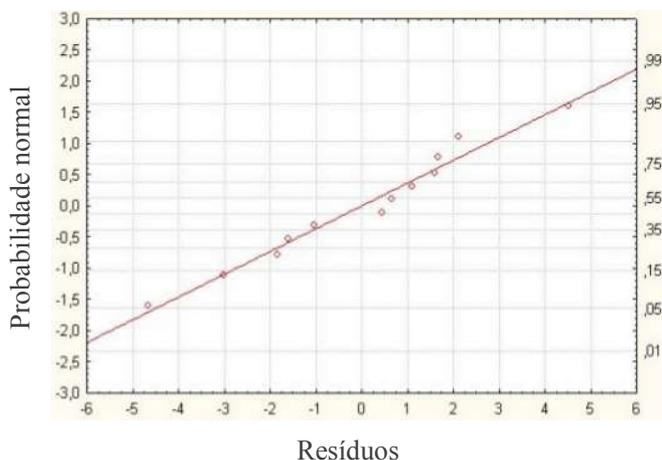


Figura II.6 - Gráfico dos valores dos resíduos *versus* probabilidade normal.

Com base na tabela dos coeficientes de regressão (Figura II.7), foram considerados significativos os parâmetros com p valores menores que 0,1. Dessa forma, apenas foi considerado como significativo os termos lineares do óleo de víscera e do tween 80. Os demais termos, quadráticos para o óleo de víscera e para o tween 80, foram considerados não significativos.

Fator	Coeficientes de regressão; variável resposta: Atividade; Coeficiente de correlação = 0,86975			
Variáveis	Coeficiente de regressão	Erro padrão	Teste t	p-valor
Média	12,58466	2,901677	4,337028	0,001886
Óleo de vísceras (L)	7,32597	0,985651	7,432617	0,000040
Tween 80 (L)	2,15962	0,985651	2,191064	0,056153

Figura II.7 - Coeficientes de regressão para a variável resposta. Os termos lineares são representados pela letra L.

A validação do modelo foi feita através da análise de variância (ANOVA). Verificou-se que o valor de F calculado para o coeficiente de regressão relacionado ao termo linear do óleo de vísceras foi de 55,24, um valor altamente significativo, conforme ilustrado na Figura II.8.

O modelo com as variáveis reais que representam a atividade enzimática em U/mL em função da concentração de óleo de vísceras e tween 80 encontra-se demonstrado na Equação (II.1).

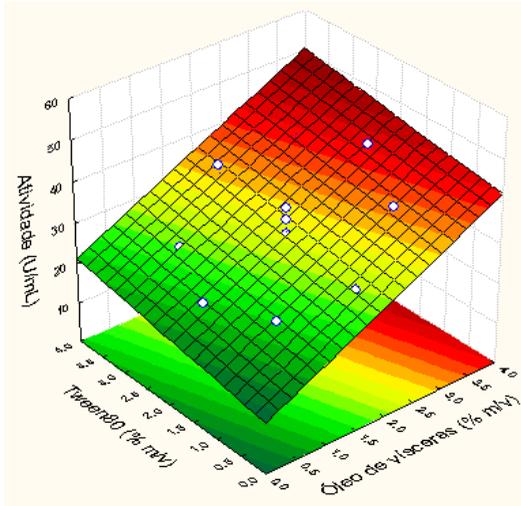
$$A = 12,58 + 7,32 \cdot ov + 2,16 \cdot tw \quad (II.1)$$

Onde A é a atividade enzimática em U/mL; ov é o óleo de vísceras em % (m/v); tw é o tween 80 em % (m/v). O R² obtido foi de 87,47%, o que demonstra que o modelo se ajusta de forma razoável aos dados experimentais.

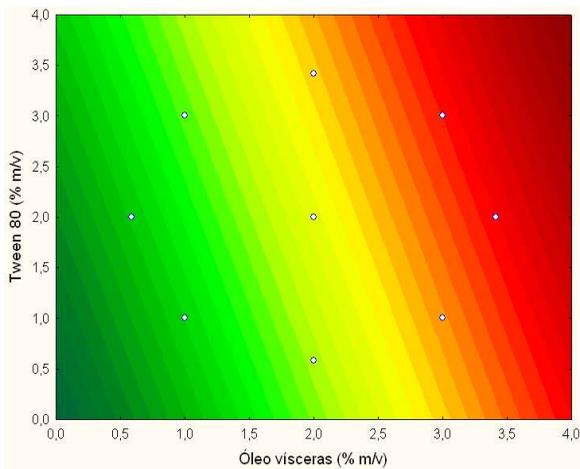
Fator	ANOVA – variável resposta: Atividade; Coeficiente de correlação = 0,86975				
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p-valor
(1) Óleo de vísceras (L)	429,3582	1	429,3582	55,24380	0,000040
(2) Tween 80 (L)	37,3118	1	37,3118	4,80076	0,056153
Erro	69,9485	9	7,7721		
Total	536,6185	11			

Figura II.8 - ANOVA para a resposta atividade de lipase.

Através do modelo gerado foi possível obter uma superfície de resposta de resposta que pode ser visualizada na Figura II.9.



(A)



(B)

Figura II.9 - (A) Superfície de resposta e (B) curvas de contorno para atividade enzimática obtida na otimização das condições para produção de

lipase.

Através dos resultados foi possível obter uma espécie de plano inclinado obliquamente em relação a um dos eixos e com sentido ascendente indo da esquerda para a direita. Deste modo verificou-se que os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos quando utilizada maior concentração de óleo de vísceras. Ao diminuir a concentração do óleo de vísceras concomitante à concentração do tween 80, há diminuição da produção lipásica.

Com base nos resultados foi verificado que, para se atingir maiores rendimentos, deve-se deslocar a região experimental para maiores valores do óleo de vísceras. Dessa forma, em tese, um aumento da concentração do óleo de vísceras acarretaria em um aumento da produção de lipase. Para verificar a viabilidade em se utilizar um meio de cultivo com maiores concentrações de óleo de vísceras, um teste foi realizado com 4,5% (m/v) de óleo de vísceras. O meio foi realizado mantendo-se as mesmas porcentagens dos outros componentes relacionados ao ensaio 6 descrito na Tabela II.4. Entretanto, foi observado que, ao submeter o fungo a estas condições, houve um comprometimento do crescimento do mesmo, possivelmente em virtude da falta de oxigênio no meio.

O fato do isolado fúngico produzir mais lipase com o uso do óleo de vísceras em relação ao óleo de oliva pode ser explicado porque o óleo de vísceras possui uma composição de ácidos graxos mais rica quanto a sua saturação. O óleo de vísceras possui 30,38% de ácidos graxos saturados, já o óleo de oliva, 20,09%. A diferença de composição entre a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados é importante para explicar a diferença de comportamento do óleo de vísceras em relação ao óleo de oliva, indicando que o micro-organismo deve consumir preferencialmente ácidos graxos saturados, presentes em maior quantidade no óleo de vísceras. Esse mesmo comportamento foi observado por Burkert (2003), que estudou a produção da lipase produzida por *Geotrichum candidum* e verificou que a mesma foi obtida com maiores rendimentos quando utilizado como indutor o óleo que possuiu maior porcentagem de ácidos graxos saturados.

II.5.2.3 Concentração da lipase contida no extrato bruto

Com o objetivo de promover a concentração das moléculas de enzima contidas no extrato bruto e consequentemente maximizar o processo de imobilização das mesmas, diferentes agentes de precipitação foram utilizados para a purificação parcial da lipase. Os melhores valores obtidos para atividade enzimática, atividade específica e rendimento foram obtidos através do uso do sulfato de amônio 40%. Os dados encontram-se ilustrados na Tabela II.5.

Tabela II.5 - Resumo dos resultados relativos aos procedimentos utilizados para a concentração do extrato bruto obtido através do cultivo submerso com o isolado fúngico. Ilustração das variáveis codificadas com valores reais . P_t: proteínas totais (mg/mL); A: Atividade enzimática (U/mL); A_s: Atividade específica (U/mg); η: Rendimento (%); F_p: Fator purificação.

Método utilizado	P _t	A	A _s	η	F _p
Extrato bruto*	3,58	32,17	8,98	100	1,00
(NH ₄) ₂ SO ₄ **	2,06	25,52	12,38	79,33	1,38
Acetona**	1,85	16,68	9,02	51,84	1,00
Etanol**	0,78	8,45	10,84	26,27	1,21

* Valores de proteínas totais e atividade enzimática obtidos através da análise de 50 mL de extrato bruto.

** Valores de proteínas totais e atividade enzimática obtidos através de 2 mL de material ressuspensão em tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 8,0.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram aqueles apresentados por Menoncin (2008). Este autor realizou um planejamento experimental fatorial completo 2² para verificar a influência das diferentes porcentagens de sulfato de amônio e tempo de precipitação sobre o extrato enzimático de *Penicillium verrucosum*. Através dos ensaios realizados pelo autor citado, o nível de saturação de 40% foi o mais adequado para obtenção de um extrato com maior atividade específica. Quando esse autor utilizou um nível de saturação de 100%, observou perda total da atividade de lipase. O autor também observou

que não houve necessidade da realização de diálise no extrato bruto, pois o valor de atividade específica obtida anterior ao processo foi maior que o valor obtido após a diálise. O trabalho de Kharrat et al. (2011) igualmente ilustrou o procedimento de precipitação com solução de sulfato de amônio a um nível de saturação de 65% sem a realização de diálise.

Muitos dos artigos pesquisados ilustram o uso de solução de 80% de saturação de sulfato de amônio, seguido de diálise para a realização da concentração do extrato bruto obtido. Porém, os resultados ilustrados variam significativamente. Para confirmar essa afirmação é possível citar o estudo de Supakdamrongkul, Bhumiratana e Wiwat (2010), que caracterizou a lipase produzida por *Nomuraea rileyi* e obteve uma atividade específica de 55,0 U/mg e um percentual de purificação de 19,6% utilizando a concentração citada acima de sulfato de amônio. No trabalho de Demir e Tukel (2010), a atividade específica atingida foi de 7,08 U/mg e o percentual de purificação foi de 93,33%.

O estudo de Rifaat et al. (2010) apresenta o uso de soluções de sulfato de amônio, etanol e acetona em várias concentrações diferentes para a concentração do extrato bruto produzido por *Fusarium oxysporum*. Nesse trabalho, os autores observaram que os melhores valores para atividade específica e para o rendimento foram obtidos com o uso de solução de 30% de saturação de sulfato de amônio. Quando as porcentagens de saturação deste sal foram maiores que 60%, iniciou-se um decréscimo severo na atividade do extrato bruto.

II.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do uso do planejamento proposto por Plackett e Burman foi possível rastrear, dentre 11 fatores, aquelas que mais influenciaram na produção de lipase pelo isolado fúngico. Nesse caso, foi possível verificar que os fatores óleo de vísceras e tween 80 foram os que influenciaram significativamente e de forma positiva na produção de lipase. O meio de cultivo que permitiu a obtenção do maior valor de atividade enzimática, de 37,37 U/mL, foi o meio 10. Esse meio foi constituído pelos maiores níveis de óleo de vísceras, tween 80, extrato de levedura, NH_4Cl , NaNO_3 e KH_2PO_4 e pelos menores níveis de peptona, pH inicial, óleo de oliva e MgSO_4 e efluente para solubilização dos componentes citados. Também foi observado que o aumento de biomassa não esteve diretamente relacionado ao aumento de atividade

enzimática, sendo que o tipo de meio que acarretou na maior atividade enzimática foi o mesmo que promoveu um dos menores valores de biomassa.

As variáveis que apresentaram influência significativa para a atividade enzimática foram selecionadas para o planejamento seguinte, constituído por um delineamento composto central rotacional (CCD). Através dos resultados obtidos para o planejamento CCD, verificou-se que o valor de F calculado para o coeficiente de regressão relacionado ao termo linear do óleo de vísceras foi de 55,24. A superfície de resposta gerada pelo modelo caracterizou-se como um plano inclinado obliquamente em relação a um dos eixos. Para dar continuidade à otimização, um deslocamento para maiores concentrações do óleo de vísceras deveria ser realizado para a obtenção de uma nova região experimental. Para verificar a viabilidade em se utilizar um meio de cultivo com maiores porcentagens de óleo de vísceras, um teste foi realizado com 4,5% (m/v) do óleo citado. O resultado obtido demonstrou que, nas condições descritas, o crescimento do fungo foi severamente comprometido, possivelmente devido à diminuição de oxigênio do meio de cultivo. Desse modo, a produção de lipase passou a ser realizada com as mesmas concentrações descritas originalmente no ensaio 6 (Tabela II.4).

A otimização da concentração do extrato bruto enzimático também foi realizada, testando-se três métodos diferentes envolvendo o uso de sulfato de amônio, acetona e etanol. Através dos resultados obtidos constatou-se que os melhores valores obtidos para atividade enzimática, atividade específica e fator de purificação foram obtidos através do uso do agente precipitante sulfato de amônio à 40%.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO DE FRANGOS NA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA COM POSTERIOR AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE BODIESEL

III.1 RESUMO

Neste estudo foi realizada a imobilização da lipase contida no extrato bruto produzido por uma cepa fúngica selvagem isolada de um efluente de abatedouro de frangos. O suporte utilizado para a imobilização do biocatalisador foram esferas de quitosana/argila. Obteve-se um rendimento de imobilização de 80% após contato direto da solução do extrato bruto concentrado com as esferas ativadas com glutaraldeído 3% (v/v). Na sequência, as enzimas na forma livre (extrato bruto) e na forma imobilizada nas esferas de quitosana/argila foram submetidas à caracterização através da análise de atividade enzimática em diversas condições físicas e químicas. Os resultados revelaram que o processo de imobilização promoveu um aumento de vida útil das enzimas, sem alterar o perfil de temperatura e pH ótimo. A enzima imobilizada também adquiriu maior estabilidade frente a diferentes tipos de solventes, íons metálicos e um período de estocagem de 10 dias a 12 °C. Apesar dos resultados terem sido positivos para estabilidade e aumento de vida útil, a enzima não apresentou uma estabilidade operacional satisfatória. A produção de ésteres étlicos foi realizada utilizando a lipase comercial (Novozym 435), óleo de soja, óleo de vísceras e lipase do extrato bruto. Os resultados revelaram que os ensaios utilizando óleo de soja com a lipase comercial e com a lipase do extrato bruto acarretaram nos maiores valores de conversão em ésteres. Para o sistema com óleo de soja e Novozym foi obtido 90,32% e para o sistema de óleo de soja e extrato bruto foi obtido 54,58% de conversão em ésteres.

III.2 ABSTRACT

In this study was performed the immobilization of lipase present in the raw extract produced by a wild fungal strain isolated from a chicken slaughterhouse effluent. The supports used for the immobilization of the biocatalyst were chitosan/clay spheres. The immobilization yield was 80% after direct contact of the concentrated raw extract solution with the activated spheres presenting 3% (v/v) glutaraldehyde. After the immobilization procedure the enzyme in free form (raw extract) and immobilized form in chitosan/clay support were subjected to

characterization by analysis of enzymatic activity under various physical and chemical conditions. The results revealed that the immobilization process promoted an increase in enzyme lifespan, without changing the profile of optimum temperature and pH. The immobilized enzyme also acquired greater stability against different types of solvents, metallic ions and a storage period of 10 days at 12 °C. Although the results were positive for stability and lifespan, the enzyme did not show a satisfactory operational stability. The production of ethyl esters was performed using the commercial lipase (Novozym 435), soybean oil, viscera oil and lipase from the raw extract. The data obtained from the experiments showed that using soybean oil with a commercial lipase and lipase from raw extract resulted in higher values of conversion into esters. The conversion into esters was 90.32% and 54.58% for the system with soybean oil and Novozym and the system of soybean oil and raw extract, respectively.

III.3 INTRODUÇÃO

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas amplamente utilizadas para catalisar hidrólise, esterificação, alcoólise e transesterificação de ésteres carboxílicos. Entretanto, assim como qualquer biocatalisador, as lipases estão sujeitas à inativação por diversos fatores químicos, físicos e biológicos. Tais características impulsionam diversos estudos no sentido de aumentar a vida útil das lipases e facilitar sua recuperação e utilização, especialmente em processos industriais. Dentre os métodos pesquisados para ampliar e intensificar as aplicações das lipases e das enzimas, de modo geral, é possível citar os processos de imobilização enzimática (VILLENEUVE et al., 2000).

Segundo Tan et al. (2010), as enzimas imobilizadas são definidas como "enzimas fisicamente confinadas" ou localizadas em uma determinada região com a retenção de sua atividade catalítica, e que podem ser utilizadas várias vezes seguidas. Dependendo da técnica de imobilização adotada, as propriedades das enzimas, tais como: estabilidade, seletividade, valores de $V_{m\acute{a}x}$, K_m , perfil de atividade enzimática em diferentes pHs e temperaturas podem ser significativamente alteradas, em alguns casos potencializando essas características. As estratégias de imobilização mais amplamente empregadas podem ser visualizadas na Figura III.1.

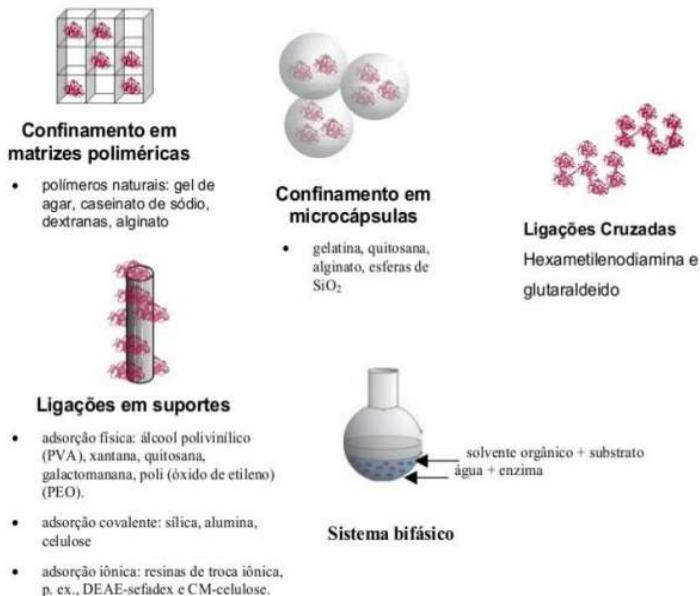


Figura III.1 - Principais métodos de imobilização. Fonte: Ferraz (2006).

Existem vários métodos para a imobilização enzimática fundamentados em mecanismos físicos e químicos. Dentre os métodos de imobilização química é possível citar: a) ligação da enzima no suporte através de ligações iônicas; b) ligação da enzima no suporte através de ligações covalentes; c) ligação cruzada entre a enzima e o suporte e d) ligação da enzima no suporte promovida por reagentes multifuncionais. Os assim chamados reagentes multifuncionais são moléculas que possuem a capacidade de ligar a enzima no suporte. Vários reagentes multifuncionais podem ser utilizados, envolvendo diferentes tipos de aminoácidos das enzimas e grupos funcionais do suporte. Entre os agentes multifuncionais mais utilizados pode-se destacar o glutaraldeído, carbodiimida (EDC) e γ -aminopropiltriétoxissilano (γ -APTS). Os métodos físicos envolvem o encerramento das moléculas de enzima dentro dos poros de uma matriz polimérica, micelas reversas, microcápsulas ou entre membranas

macroscópicas (DURÁN et al., 2002). Outro método utilizado para aumentar a vida útil das enzimas e que não pode ser classificado como um método físico ou químico é o sistema bifásico, que é formado por duas fases. Nesse caso, a enzima fica localizada na fase aquosa e na fase orgânica se encontra o substrato. A interação das duas fases ocorre através de agitação mecânica (FABER, 1997).

Todos os métodos citados possuem vantagens e desvantagens que dependem de vários fatores. Segundo Durán et al. (2002), os métodos de imobilização química tendem a reduzir a atividade da enzima, onde as ligações químicas podem perturbar a estrutura tridimensional da enzima nativa, alterando conseqüentemente sua especificidade. Por outro lado, os métodos de imobilização física alteram menos a estrutura tridimensional da enzima e, conseqüentemente, provocam menos alteração das propriedades da mesma. Essas informações indicam que a seleção de um método de imobilização está associada a vários fatores. Ainda de acordo com Durán et al. (2002), usualmente, é preferível obter uma enzima com menor atividade enzimática, mas com maior estabilidade do que uma enzima com uma alta atividade enzimática, mas que possui uma pequena estabilidade. Vários tipos de suportes com características hidrofóbicas e hidrofílicas vêm sendo estudados para a imobilização das lipases, dentre os quais é possível citar aerogéis (KHARRAT et al., 2011), resinas (MINOVSKA et al., 2005), polímeros sintéticos (BAYRAMOGLU et al., 2002; DAVE; MADAMWAR, 2006; YONG et al., 2008), sílicas (*shakerI*; KAWAKAMI, 2009; CRUZ; PFROMM; REZAC, 2009), nanopartículas (TZIALLA et al., 2010) e biopolímeros como a alginato, agarose e quitosana (TING et al., 2006; FORESTI; FERREIRA, 2007).

A quitosana é obtida por reação de hidrólise alcalina da quitina, resultando no biopolímero constituído predominantemente de unidades β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (Figura III.2) e apresentando em sua cadeia aproximadamente 70-90% de grau de desacetilação (FURLAN, 1997).

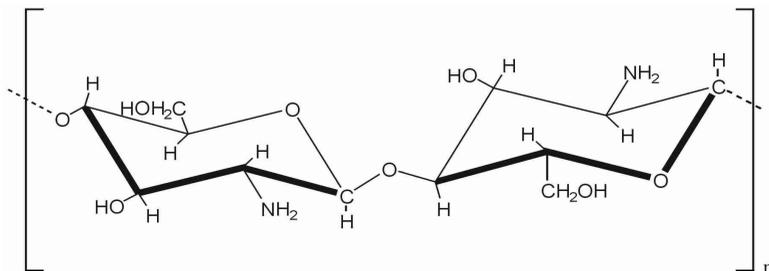


Figura III.2 - Representação da estrutura química da quitosana.

A quitosana foi descoberta em 1859 pelo professor Rouget, quando o mesmo adicionou quitina a uma solução de hidróxido de potássio em ebulição. Atualmente, a produção comercial de quitosana ocorre essencialmente através do uso do precursor, a quitina oriunda principalmente do exoesqueleto de crustáceos marinhos (THARANATHAN e KITTUR, 2003).

A quitosana é insolúvel em água, porém é solúvel na maioria dos ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido fórmico e ácidos inorgânicos, incluindo o ácido clorídrico. A solubilidade da quitosana em certos ácidos pode ser associada à presença de grupos amino livres nesse polímero. Além disso, seu caráter de polieletrólito e suas propriedades físicas, químicas e biológicas tornam esse polímero muito versátil quimicamente para diversas aplicações (DASH et al., 2011).

Para ilustrar a potencialidade do uso da quitosana como substrato para a imobilização enzimática é possível citar o trabalho de Betigeri e Neau (2002). Nesse trabalho é realizado um estudo comparativo de produção de esferas de três polímeros hidrofílicos e posterior imobilização de lipase de *Candida rugosa*. Os polímeros estudados foram agarose, alginato e quitosana. Os resultados obtidos mostraram que as esferas de agarose sofreram inchamento e se desintegraram em meio aquoso. Por outro lado, as esferas de alginato e quitosana possuíram boa resistência mecânica e apresentaram porcentagens de imobilização enzimática semelhantes. Entretanto, nas esferas de alginato a retenção de atividade enzimática foi de apenas 9%. Dessa forma, os autores concluíram que o melhor suporte para a imobilização da lipase foi a quitosana.

A quitosana vem sendo intensamente utilizada no formato de

esferas e microesferas em diversas áreas da biotecnologia, principalmente como veículos de transporte e liberação de drogas ou substâncias no organismo (SINHA et al., 2004), tratamento de água e efluentes no que tange a remoção de metais (NGAH; FATINATHAN, 2010) e pigmentos (CHATTERJEE; LEE; WOO, 2010) e imobilização de biocatalisadores (CRUZ, 2007; HASRUL et al., 2010).

Segundo Goy, Assis e Campana-Filho (2004), o formato esférico é preferencialmente desejado por possuir a vantagem de uma melhor caracterização superficial, o que permite o estabelecimento dos parâmetros geométricos para a reprodutibilidade do processo e para demais comparações, além dos aspectos de otimização de empacotamento em reatores e dispositivos de filtração. Apesar das vantagens do uso da quitosana na forma de esferas, também existem desvantagens, como, por exemplo, problemas operacionais devido ao fato de a densidade das mesmas possuir um valor próximo ao da água (causando flutuação). Esta característica é limitante em muitos processos industriais e pode ser amenizada quando a quitosana é misturada com alguns materiais sólidos que aumentam a sua densidade e resistência mecânica, estendendo, dessa forma, suas aplicações (CHANG; JUANG, 2007). O trabalho de Chang e Juang (2004) ilustra um estudo comparativo de imobilização de α -amilase, β -amilase e glicamilase em esferas de quitosana confeccionadas com mesma proporção de argila ativadas com glutaraldeído. Os resultados mostraram que as esferas foram capazes de imobilizar com eficiência as três enzimas, além de possuírem características mecânicas mais desejáveis para aplicações industriais se comparado às esferas confeccionadas exclusivamente com quitosana. Ainda no sentido de melhorar as propriedades das esferas de quitosana e comprovar sua potencialidade para a imobilização enzimática, os mesmos autores publicaram, em outro trabalho, o uso de argila ácida na mesma proporção da quitosana para a confecção das esferas de quitosana para imobilização de b-glicosidase (CHANG; JUANG, 2007). Os resultados ilustraram o efeito positivo da adição da argila para a formação das esferas e uma eficiência no processo de imobilização, permitindo obter uma enzima mais estável e que pôde ser utilizada 50 vezes sem perda significativa da atividade enzimática.

Em relação à argila, de acordo com a INTERNACIONAL ASSOCIATION OF THE STUDY OF CLAY e a CLAY MINERALS

SOCIETY, o termo se refere a materiais presentes na natureza, constituídos por minerais com pequenas dimensões os quais geralmente exibem comportamento plástico com certas quantidade de água e que sofrem endurecimento após secagem ou cozimento. Apesar de a argila ser constituída por filossilicatos, também pode conter outros materiais como quartzo, calcita, dolomita, feldspato, óxidos, hidróxidos e outros materiais orgânicos, que não interferem no comportamento descrito anteriormente. A classificação desse grupo é feita em função das suas propriedades estruturais, tais como o tipo de arranjo ao longo dos eixos cristalográficos, que definem as espécies de um mesmo grupo mineralógico. Nesse grupo têm-se os seguintes subgrupos: A) Caulinitas; B) Esmectitas (Figura III.3); C) Vermiculitas; D) Micas hidratadas ou hidrômicas; E) Cloritas; F) Argilas de camadas mistas ou interestratificadas; G) Outros minerais de camadas 2:1¹⁹ (BORMANS, 2004).

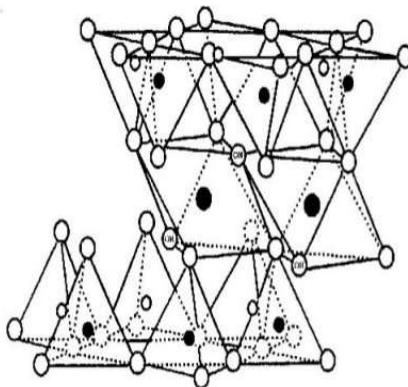


Figura III.3 - Estrutura da esmectita. Os círculos cheios menores representam Si(IV) e os maiores representam Al(III) ou Mg(II); os círculos abertos são átomos de oxigênio. Fonte: Luna; Schuchardt (1999).

Para modificar algumas das características das argilas, as mesmas podem ser submetidas ao processo de ativação em meio ácido. As consequências desse processo são evidenciadas principalmente pelo

¹⁹ 2:1 trata-se do tipo de empilhamento formado entre os grupamentos tetraédricos e octaédricos.

aumento da área específica.

Com base no contexto descrito, o presente estudo foi realizado com o objetivo de produzir esferas de quitosana/argila e estudar suas características físicas e reológicas. Este estudo também objetivou utilizar as esferas como suporte para a imobilização da lipase contida no extrato bruto concentrado. Após o processo de imobilização, realizou-se a caracterização bioquímica da lipase do isolado 17 na forma livre²⁰ e imobilizada. Em seguida, verificou-se a aplicação da lipase imobilizada na catálise de reações de esterificação utilizando óleo residual e etanol.

III.4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos o material e os métodos adotados para a confecção do suporte utilizado para imobilizar a lipase produzida pelo fungo isolado do efluente de abatedouro de frango, ou também denominado isolado 17. O suporte foi constituído por esferas de quitosana/argila e submetido a um processo de caracterização de suas propriedades físico-químicas e reológicas. Além disso, esse capítulo também objetiva descrever o método usado para a imobilização da lipase contida no extrato bruto concentrado e também descrever os métodos adotados para a caracterização da lipase do isolado 17 na forma livre e imobilizada. Após a imobilização da lipase, a mesma foi estudada para avaliar seu potencial para a produção de biodiesel. O esquema ilustrado na Figura III.4 descreve resumidamente as etapas experimentais do capítulo III.

20 Enzima livre: este termo passará a ser adotado e se refere à enzima contida no extrato bruto produzido pelo isolado 17 por cultivo submerso.



Figura III.4 - Resumo dos métodos realizados para o cumprimento das etapas do capítulo III - Caracterização da lipase de fungo filamentosso isolado de efluente de abatedouro de frangos na forma livre e imobilizada com posterior avaliação do seu potencial para a produção de biodiesel.

III.4.1 Material

A quitosana foi doada pelo Laboratório QUITTECH - Departamento de Química (UFSC). A argila esmectítica foi coletada do município de Palmeira (SC) e ativada com ácido clorídrico à úmido, conforme método apresentado no trabalho de Morgado (1998). O p-nitrofenilpalmitato e o glutaraldeído foram adquiridos da VETEC. A enzima CALB de *Candida antarctica* foi doada pela NOVOZYMES. Os óleos de girassol, soja e oliva foram adquiridos da BUNGE e possuíam grau alimentar. O óleo de mamona foi doado pela ABOISSA – ÓLEOS VEGETAIS LTDA. O óleo de vísceras de frango filtrado foi obtido de um abatedouro de frangos da região da grande Florianópolis. Os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico, sendo obtidos de outras

fontes comerciais.

III.4.2 Métodos

III.4.2.1 Confeção e caracterização do suporte para imobilização da lipase concentrada do extrato bruto

O suporte para a imobilização enzimática foi confeccionado com quitosana e argila. A quitosana utilizada neste trabalho foi caracterizada por Villela (2006) que, por sua vez, utilizou o mesmo material. Nesse caso, a quitosana apresentou as seguintes características: Massa molar média de 83,79 kDa, Grau de desacetilação de 72,45% e Área específica de 4,86 m²/g.

A argila esmectita apresentou as seguintes características: pH de 4,24, Umidade de 14,53% e Área específica de 181,44 m²/g.

As esferas foram obtidas através do processo de coagulação com soluções de diferentes concentrações de argila esmectita ácida e quitosana, preparadas sob agitação 2060 rpm.

O processo de coagulação trata-se do gotejamento das soluções de argila/quitosana em solução de NaOH 1 mol/L com auxílio de uma bomba peristáltica PERIMAX 12 SPETEC. Logo após, as esferas obtidas permaneceram no banho de precipitação por 24 horas. Na sequência, as mesmas foram lavadas com água ultrapura até o pH da solução resultante ter atingido um valor próximo a 8,0 (GOY; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2004)

Foram utilizadas quatro composições diferentes de soluções para o preparo das esferas: 1) (0,5 g de argila e 0,5 g de quitosana); 2) (0,5 g de argila e 1,0 g de quitosana); 3) (1,0 g de argila e 0,5 g de argila) e 4) (1,0 g de argila e 1,0 g de quitosana) em 50 mL de solução de ácido acético 1,0 mol/L sob agitação 2060 rpm. As esferas foram analisadas quanto ao seu aspecto visual e aos parâmetros geométricos (porosidade, densidade e diâmetro das esferas).

III.4.2.1 (a) Determinação de porosidade, densidade e diâmetro das esferas

A determinação da porosidade, densidade e diâmetro das esferas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Gonçalves (1996). Para isso, em um balão volumétrico de 10 mL, previamente

pesado, foram adicionadas 20 esferas previamente filtradas em funil de Büchner. Após a adição das esferas, o balão foi novamente pesado e na sequência o volume do mesmo foi preenchido com água destilada, pesando-o novamente. Para os cálculos foram utilizadas as seguintes equações:

$$M_s = m_2 - m_1 \quad (\text{III.1})$$

Onde M_s é a massa das esferas de quitosana/argila (g); m_2 é a massa do balão volumétrico após adição das esferas (g) e m_1 é a massa do balão volumétrico vazio (g).

$$M_a = m_3 - m_2 \quad (\text{III.2})$$

Onde M_a é a massa de água (g); m_3 é a massa do balão volumétrico com água e esferas (g) e m_2 é a massa do balão volumétrico após adição das esferas (g).

$$V_a = \frac{M_a}{\rho_a} \quad (\text{III.3})$$

Onde V_a é o volume de água em mL; M_a é a massa de água (g) e ρ_a é a densidade da água (g/mL)²¹.

$$V_s = 10 - V_a \quad (\text{III.4})$$

Onde V_s é o volume das esferas de quitosana (mL); 10 é o valor referente ao volume do balão volumétrico (mL) e V_a é o volume de água (mL).

$$\rho_s = \frac{M_s}{V_s} \quad (\text{III.5})$$

Onde ρ_s é a densidade das esferas de quitosana/argila (g/mL); M_s é a massa das esferas (g) e V_s é o volume das esferas (mL).

$$R_m = \left(\frac{3}{4\pi} \cdot \frac{V_s}{N_s} \right)^{1/3} \quad (\text{III.6})$$

Onde R_m é o raio médio (cm); V_s é o volume em cm^3 ; N_s é o

21 A temperatura da água foi medida para cálculo de sua densidade (ρ_a). Foi obtido uma temperatura de 23,5 °C que corresponde a uma densidade de 0,99745 g/mL.

número de esferas.

Para a determinação da porosidade foi utilizado o método gravimétrico (III.7), no qual uma determinada massa de esferas permanece na estufa em 60 °C por 24 horas. Após esse período, foi possível conhecer a massa de água perdida. Assumiu-se, então, que o resíduo resultante foi constituído apenas pelo polímero e argila.

$$\varepsilon = \frac{M_{ap}}{\rho_a \cdot V_s} \quad (\text{III.7})$$

Onde ε é a porosidade; M_{ap} é a massa de água perdida durante o período de exposição das esferas na estufa (g); ρ_a = densidade da água (g/mL) e V_s é o volume das esferas (mL) (GONÇALVES, 1996).

III.4.2.1 (b) Estudo do comportamento reológico das soluções de argila/quitosana

O comportamento reológico das soluções de partida para a produção das esferas de quitosana/argila foi analisado através do uso de um viscosímetro HAAKE 6 L a 25 °C localizado na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química (UFSC).

III.4.2.2 Ativação das esferas com glutaraldeído

Para ativação de 30 esferas de quitosana/argila foi utilizado 2 mL de solução de glutaraldeído 3% (v/v). A solução de glutaraldeído foi preparada utilizando como solvente tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 8,0. As esferas permaneceram em contato com a solução de glutaraldeído por 24 horas (ADRIANO et al., 2003). Na sequência, as mesmas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído e impedir a polimerização do glutaraldeído em excesso com a enzima.

III.4.2.3 Análise da atividade enzimática

Os valores de absorbância foram obtidos com um espectrofotômetro. O procedimento consistiu na preparação do *p*-NPP dissolvendo-se 0,5 g do mesmo em 100 mL de álcool etílico absoluto. Para determinação da atividade foram utilizados: 100 μ L de solução

enzimática ou 0,07 g de suporte com enzima imobilizada, 1000 μL de solução *p*-NPP e 1000 μL de tampão pH 9,0. A solução resultante foi incubada à temperatura de 30 °C por 5 minutos em banho-maria em um tubo de ensaio. A reação foi encerrada através da adição de 2000 μL de uma solução 0,5 N de carbonato de sódio. Foram retirados 2000 μL desta solução e adicionados em Eppendorfs para posterior centrifugação por 10 minutos em 10000 rpm. O sobrenadante foi diluído em água destilada e submetido à análise espectrofotométrica.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima livre ou imobilizada necessária para hidrolisar 1 μmol do substrato *p*-NPP por minuto.

III.4.2.4 Imobilização da lipase do extrato bruto concentrado

As esferas de quitosana previamente ativadas com solução de glutaraldeído 3% (v/v) foram incubadas com 15 mL do extrato bruto concentrado. A imobilização ocorreu em Erlenmeyer de 50 mL com agitação branda e temperatura de 25 °C, por 5 horas. Os valores utilizados para imobilização da lipase foram baseados no trabalho de Cruz (2007), que, por sua vez, realizou a otimização da imobilização de lipase de *Candida antarctica B* em esferas de quitosana. Após o procedimento descrito, alíquotas foram retiradas para análise de atividade enzimática, conforme item III.4.2.3 e proteínas totais no sobrenadante. Após a determinação da atividade enzimática e proteínas totais, foi possível calcular o rendimento de proteína aderida às esferas de quitosana/argila (HUNG, CHIOU, WU, 2003) e o rendimento de imobilização utilizando as equações (III.8) e (III.9), respectivamente.

$$\eta_p = 1 - \frac{P_f}{P_i} \quad (\text{III.8})$$

Sendo η_p o rendimento de proteínas aderidas às esferas; p_f o valor de proteínas totais do sobrenadante após 5 horas de incubação com as esferas (mg/mL) e p_i o valor de proteínas totais do sobrenadante no tempo de 0 horas de incubação com as esferas (mg/mL).

$$\eta_i = 1 - \frac{A_f}{A_i} \quad (\text{III.9})$$

Sendo η_i o rendimento de imobilização, A_f a atividade enzimática

do sobrenadante após 5 horas de incubação com as esferas (U/mL) e A_1 o valor da atividade enzimática do sobrenadante no tempo de 0 horas de incubação com as esferas (U/mL).

III.4.2.5 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada com o auxílio de um espectrofotômetro a 595 nm com Coomassie Blue (BRADFORD, 1976). O conteúdo de proteína foi calibrado com soluções de albumina bovina, de concentrações que variaram de 0 a 2000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O coeficiente de regressão linear (r^2) foi de 0,9991.

III.4.2.6 Determinação da termoestabilidade

As enzimas livre e imobilizada foram adicionadas em tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 7,0 e pré-incubadas a temperaturas de 30, 36, 50, 64 e 70 °C. As análises de atividade enzimática residual foram realizadas nas alíquotas retiradas após 54 minutos de incubação. Para a manutenção da temperatura dos frascos de reação foi utilizado um banho termostático da marca MICROQUÍMICA EQUIPAMENTOS LTDA, modelo MQBTC 99-20.

A determinação da atividade enzimática relativa foi realizada através da razão entre a atividade enzimática final após incubação nas temperaturas citadas e atividade enzimática inicial.

III.4.2.7 Efeito de diferentes pHs sobre a atividade enzimática

A mesma reação utilizada para a análise de atividade enzimática foi acompanhada à temperatura de 25 °C em soluções tampão (0,1 mol/L) de: tartarato pH 3,0/ 4,0/ 5,0, fosfato pH 6,0/ 7,0/ 8,0 e Tris-HCl pH 9,0/ 10,0 e 11,0 com o objetivo de determinar qual pH a enzima livre ou imobilizada apresenta a maior atividade enzimática. Os resultados finais foram apresentados em termos de atividade enzimática relativa determinada através da razão entre a atividade enzimática final, após 5 minutos de incubação com a solução tampão e atividade enzimática inicial (atividade enzimática analisada imediatamente à adição da solução tampão).

III.4.2.8 Efeito de diferentes solventes sobre a atividade enzimática

O efeito de diferentes solventes sobre a atividade da lipase foi avaliado conforme método descrito por Kamini et al. (2000). Para isso, as enzimas na forma livre e imobilizada foram incubadas com soluções de heptano, hexano, acetona, éter, álcool metílico, álcool etílico e clorofórmio em concentrações de 50% (v/v) em tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 7,0 e sua atividade enzimática relativa foi calculada através da razão entre a atividade enzimática final após incubação com os solventes citados e atividade enzimática inicial (atividade enzimática analisada imediatamente após a adição dos solventes). Os meios reacionais foram adicionados a Erlenmeyers de 250 mL e incubados em *shaker* orbital por 6 dias a 25 °C e 100 rpm. Foram retiradas alíquotas de cada frasco para análise de atividade enzimática nos dias 0, 2, 4 e 6. Além dos solventes citados, também foi verificada a influência da solução de glutaraldeído 3% (v/v) sobre a atividade enzimática da lipase nas mesmas condições descritas.

III.4.2.9 Efeito de diferentes íons sobre a atividade enzimática

As enzimas imobilizadas foram incubadas com soluções de diferentes íons metálicos: FeSO₄, ZnSO₄, NaCl, CaCl₂, MgCl₂ e CuSO₄. Além desses, também foi verificado o efeito da adição de solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) sobre a atividade enzimática. As substâncias mencionadas foram testadas de modo que a solução final atingisse a concentração de 1 mmol/L. Os sistemas reacionais foram mantidos em banho termostatizado a 30 °C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram retiradas para análise da atividade enzimática utilizando o método com o *p*-nitrofenilpalmitato. Os dados foram representados em termos de atividade enzimática relativa determinada através da razão entre a atividade enzimática final (após incubação de 30 minutos com as soluções citadas) e atividade enzimática inicial (atividade enzimática analisada sem a adição das soluções dos íons metálicos e EDTA) (PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003).

III.4.2.10 Estabilidade frente à estocagem

As enzimas na forma livre e imobilizada foram submetidas a um teste de estabilidade durante um período de estocagem de 10 dias nas

condições apresentadas na Tabela III.1.

Tabela III.1: Condições utilizadas para o teste de estabilidade com a enzima livre e imobilizada.

Temperatura	Meio de estocagem	Estado da enzima
12 °C	Próprio meio*	Livre
12 °C	Água destilada	Imobilizada
12 °C	Seca**	Imobilizada

* O próprio extrato bruto (não concentrado) foi armazenado;

** Nesse caso, as esferas contendo a enzima imobilizada foram filtradas com auxílio de uma peneira e armazenadas sem a adição de qualquer líquido.

Após o período de estocagem, as amostras foram analisadas. Os dados foram tabulados em termos de atividade enzimática relativa determinada através da razão entre a atividade enzimática final, ou seja, valor obtido para a atividade enzimática após incubação de 10 dias a 12 °C e a atividade enzimática inicial (atividade enzimática analisada a partir do momento em que a temperatura atingiu 12 °C) (WANG; XU; SHAN, 2008).

III.4.2.11 Atividade de esterificação

A atividade sintética das enzimas na forma livre e imobilizada foi quantificada com base no método descrito por Menoncin (2007), com modificações. Esse método se baseia no consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e glicerol, com razão molar ácido:álcool de 3:1, à temperatura de 60 °C, com 100 µL de solução enzimática ou aproximadamente 0,07 g de suporte com enzima imobilizada mantida sob agitação por 60 minutos. A reação foi iniciada após adição da enzima ao meio reacional em um Erlenmeyer de 250 mL. Na sequência, alíquotas de 8 mL foram retiradas e adicionadas a um Erlenmeyer de 100 mL contendo 16 mL de solução acetona:etanol 1:1. O objetivo da adição da solução de acetona e álcool é de cessar a reação. A esse sistema também foi adicionado 3 gotas do indicador ácido-base fenolftaleína. A quantidade de ácido láurico consumida foi determinada

pela titulação com NaOH 0,1 mol/L.

Através desse método foi possível definir que uma unidade de atividade enzimática é a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 μ mol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas. A Equação (III.10) foi utilizada para determinação da atividade enzimática.

$$A_e = \frac{(V_n - V_b) \cdot M}{t \cdot V_c} \quad (\text{III.10})$$

Sendo A_e atividade de esterificação (U/mL), V_n o volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL), V_b o volume de NaOH gasto na titulação do branco (mL), V_c o volume da amostra usada na reação (mL), t o tempo de reação (minutos) e M a concentração da solução de NaOH (mol/L).

III.4.2.12 Atividade de esterificação frente a diferentes substratos

Para a determinação da atividade de esterificação frente a diferentes substratos, o meio reacional foi constituído por 1 g de substrato (óleo de girassol, soja, mamona, oliva e óleo de vísceras), 0,3 mL de Tween 80, 4 mL de tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 7,0, 100 μ L de solução enzimática e 3 gotas de fenolftaleína. Em seguida o sistema foi adicionado em *shaker* orbital por 30 minutos, a 30 °C e 150 rpm. Na sequência, alíquotas de 8 mL foram retiradas e adicionadas a um Erlenmeyer de 50 mL contendo 16 mL de solução acetona:etanol 1:1. A atividade foi medida pela titulação dos ácidos graxos liberados com solução de NaOH (0,05 mol/L) usando fenolftaleína como indicador. O cálculo da unidade de atividade enzimática foi realizado utilizando a equação (III.10) (PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003). Nesse caso, uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio.

III.4.2.13-Efeito do uso repetido sobre a atividade residual da enzima imobilizada

As esferas contendo a enzima imobilizada foram adicionadas em um tubo de ensaio para efetuar o procedimento para determinação de

atividade enzimática utilizando como substrato o *p*-nitrofenilpalmitato. Após o período de 5 minutos em banho-maria, as esferas foram removidas do meio com auxílio de uma peneira de plástico, lavadas com tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 7,0 e novamente submetidas ao mesmo meio reacional. Esse procedimento foi repetido cinco vezes. Deste modo, a possibilidade de reuso da enzima foi averiguada e os resultados finais foram apresentados em termos de atividade enzimática relativa determinada através da razão entre a atividade enzimática inicial (atividade enzimática analisada no primeiro ciclo de uso) e atividade enzimática final (atividade enzimática analisada no quinto ciclo de uso).

III.4.2.14-Análise do uso da lipase para produção de biodiesel

Os experimentos consistiram na síntese de ésteres utilizando o caldo bruto enzimático concentrado obtido através do cultivo submerso do isolado 17 e solução da lipase comercial Novozym 435. As reações foram realizadas em Erlenmeyers de 250 mL utilizando o óleo de soja e o óleo de vísceras adquirido do abatedouro avícola. Com base nas massas molares médias dos óleos utilizados²², foi possível calcular a massa a ser utilizada nas reações visando obedecer a razão molar de 3:1 (álcool/óleo), com 1,5 mL da solução de enzima. As soluções enzimáticas utilizadas apresentavam aproximadamente os mesmos valores de atividade enzimática, de 88 U/mL. Dessa forma, a solução comercial foi diluída em água destilada para que a sua atividade se tornasse o mais próxima possível da solução do extrato bruto. As reações foram conduzidas em *shaker* orbital a uma temperatura de 30 °C, rotação de 200 rpm e período de tempo de 24 horas.

Após o período da reação, o conteúdo dos Erlenmeyers foram adicionados a um funil de separação. Na fase superior ficaram retidos os ésteres etílicos e na fase inferior ficaram retidos os demais componentes da reação que não foram transformados em ésteres (resíduos) e principalmente o glicerol (TASHTOUSH; AL-WIDYAN; AL-JARRAH, 2004). Na sequência, uma amostra de aproximadamente 1 g da fase superior citada anteriormente, foi adicionada em um tubo de ensaio com tampa, juntamente com aproximadamente 1 mL de hexano e 1 mL de

22 As massas molares médias dos óleos foram obtidas através das massas moleculares dos triacilgliceróis ponderadas com a composição molar obtida a partir do perfil de ácidos graxos ilustrados na Tabela 5 (LOPES et al., 2010). Os valores de massa molar média do óleo de vísceras e do óleo de soja foi de 867,58 e 889,58 g/mol, respectivamente.

etanol. Em seguida, o tubo foi agitado com auxílio de um vortex por 2 minutos. Após 15 minutos de repouso, uma amostra da fase orgânica foi cuidadosamente coletada com auxílio de uma pipeta Pasteur, adicionada em um eppendorf e encaminhada à Central de Análises do Departamento de Química (UFSC) para realização da análise dos ésteres por Cromatografia Gasosa. O resumo das etapas realizadas encontram-se no esquema da Figura III.5.

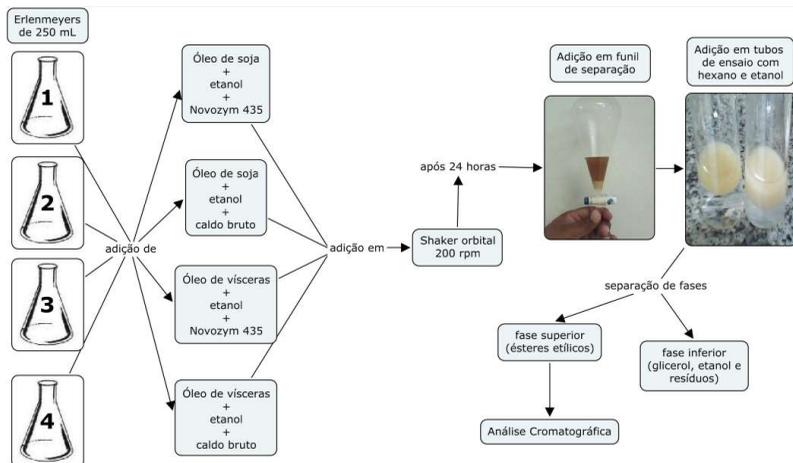


Figura III.5 - Método utilizado para a obtenção de ésteres etílicos de óleo de soja e óleo de vísceras.

III.4.2.14 (a) Determinação da conversão em ésteres

Os ésteres etílicos foram analisados através de um Aparelho CG-17A SHIMADZU com uma coluna DB 5 30 mt x 0,25 mm x 0,025 mm, Detector FID. Inicialmente, a temperatura utilizada foi de 50 °C, com rampa de aquecimento de 5 °C por minuto e temperatura final de 300 °C. A temperatura do injetor foi ajustada para 230 °C e a temperatura do detector ajustada para 300 °C. Foram utilizados os seguintes padrões cromatográficos: laurato de etila, meristato de etila 99%, oleato de etila 98% (ALDRICH), palmitato de etila > 99%, estearato de etila 99% e linoleato de etila > 99% (SIGMA).

A identificação dos picos foi realizada através da comparação com tempo de retenção dos padrões citados. A quantificação dos picos foi realizada por normalização das áreas.

Com base no trabalho de Faccio (2004), a obtenção da concentração de cada composto foi realizada por meio dos cromatogramas, que permitiram calcular a conversão da reação de acordo com a equação química:

1 mol de óleo + 3 moles de etanol → 3 moles de ésteres + 1 mol de glicerol

Para a obtenção do valor da máxima massa de ésteres que pode ser obtida foi utilizada a equação (III.12).

$$n_e = 3 \cdot n_o \quad (\text{III.12})$$

Onde n_e é o valor relacionado ao máximo número de moles de ésteres que podem ser obtidos na reação (mol/L) e n_o é o número de moles do óleo (mol/L).

Para a obtenção da conversão da reação em porcentagem foi utilizada a equação (III.13).

$$X = \frac{C}{M_e} \quad (\text{III.13})$$

Onde X é a conversão da reação em etil ésteres; C é a massa em etil ésteres (g), M_e é a massa máxima de ésteres que pode ser obtida na reação entre o óleo e o etanol (g).

III.4.2.15- Caracterização do óleo de vísceras

As análises físico-químicas, índice de acidez, índice de peróxido, índice de saponificação e densidade foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica – UFSC. Tais análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos a um tratamento estatístico com auxílio do *software* STATISTICA 6.0 para a verificação de diferenças estatísticas significativas entre as médias em nível de significância de 5%.

As análises de infravermelho foram realizadas com auxílio de um Espectrofotômetro FT PERKIN ELMER 16PC da Central de Análises do Departamento de Química - UFSC. Para isso as amostras de óleo foram colocadas entre placas de KBr com espaçadores. Pressionando-se levemente a amostra líquida entre as placas planas produziu-se um filme de espessura de 0,01 mm ou menos. As placas foram mantidas juntas por capilaridade. Foram utilizados aproximadamente 0,5 mg de amostra.

III.4.2.15 (A) Índice de acidez

A determinação do índice de acidez foi realizada de acordo com as normas estabelecidas pela AOCS (AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY). As amostras foram adicionadas em erlenmeyers de 250 mL previamente pesados. A massa de amostra adicionada foi de 5 g, que, por sua vez, foi solubilizada em 50 mL de álcool etílico 95% (v/v). Na sequência, foi adicionado ao sistema 2 mL de uma solução indicadora de fenolftaleína 1% (v/v). Os Erlenmeyers com a mistura citada foram titulados com uma solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 mol/L até o aparecimento da cor rosa. Os resultados foram expressos como índice de acidez em ácido oléico, calculado pela Equação (III.14):

$$IA = \frac{(M_{OH} \cdot V_{OH}) \cdot MM_{ac}}{m_o} \quad (III.14)$$

Onde IA é o índice de acidez de ácido oléico (%); M_{OH} é a concentração da solução de NaOH utilizada na titulação (mol/L); V_{OH} é o volume da solução de NaOH gasto na titulação; MM_{ac} é a massa molar de ácido oléico (g/mol) e m_o é a massa da amostra de óleo (g).

III.4.2.15 (B) Índice de saponificação

A análise do índice de saponificação foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Moretto e Fett (1989), que se baseia no número de miligramas de KOH requerido para saponificar um grama de lipídeos.

Para a análise foi adicionado a um Erlenmeyer 2 g de óleo e 20 mL de solução alcoólica de KOH a 4% (m/v). O Erlenmeyer foi adaptado a um condensador de refluxo e aquecido por um período de aproximadamente 30 minutos. Após o resfriamento da solução foi adicionada à mesma 2 gotas de fenolftaleína 1% (v/v). Na sequência, a amostra foi titulada com uma solução de HCl 0,5 M previamente padronizada até o aparecimento da cor rosa.

Após a titulação da amostra, foi realizada a titulação do branco pelo mesmo aparato e reagentes, porém sem a adição do óleo. A diferença entre os volumes de HCl gastos nas duas titulações é equivalente à quantidade de KOH gasto na saponificação. O índice de saponificação é definido como sendo a quantidade em mg de KOH

necessárias para saponificar 1 g de óleo. O cálculo utilizado para a determinação do índice de saponificação encontra-se na equação

$$IS = \frac{MM_{KOH} \cdot n_{KOH}}{m_o} \quad (III.15)$$

Onde IS é o índice de saponificação (mg de KOH/ g de óleo); MM_{KOH} é a massa molar do KOH (g/mol); n_{KOH} é o número de mols de KOH necessários para reagir com a massa de óleo; m_o é a massa da amostra de óleo (g).

III.4.2.15 (D) Densidade

A determinação da densidade foi realizada de acordo com as normas estabelecidas pela AOCS (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY), método Cc 10a-25. Utilizou-se um picnômetro para obter o valor referente à razão entre a massa de 10 mL de amostra a 25 °C e o volume de 10 mL de amostra, também a 25 °C. Para isso o picnômetro com a amostra de óleo foi pesado. Antes da realização da pesagem o sistema permaneceu em um banho termostaticado a 25 °C.

III.4.2.15 (E) Análise de ácidos graxos

Inicialmente, os ácidos graxos constituintes da amostra de óleo foram submetidos a um processo de esterificação. Esse processo foi realizado pelo LABCAL – Laboratório de Análises do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC. A esterificação foi realizada de acordo com as normas estabelecidas pela AOCS (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY), método CE 2-66. Para isso, 25 mg da amostra de óleo foram transferidos para frascos de esterificação. Na sequência, no mesmos frascos foram adicionados 3 mL de hexano, 15 mL de solução de ácido sulfúrico 2% (v/v em metanol) e algumas pérolas de vidro. O aquecimento dos frascos foi realizado sob refluxo por 1 hora. Em seguida, foi adicionado aos frascos 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio sob agitação por 1 minuto. A adição da solução de cloreto de sódio ocorreu até a visualização da fase orgânica, que é constituída pelos ésteres metílicos (AOAC, 1995).

A análise de ésteres da amostra de óleo de vísceras foi realizada pela Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. A

amostra foi analisada através da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) marca Shimadzu, modelo 2010, coluna – restek - modelo RTX-5MS. As análises foram realizadas utilizando-se uma rampa de aquecimento que foi iniciada em 100 °C, com aumento de 8 °C por minuto até 300 °C, obtendo-se uma isoterma de 10 minutos. A temperatura do injetor foi de 280 °C com interface e fonte de íons a 300 °C, divisor de fluxo (split) 1/50. A injeção de 1 µL de amostra foi feita em modo manual e o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio.

III.5 RESULTADOS

III.5.1 Preparação e Caracterização das Esferas de Quitosana/Argila

Foram utilizadas quatro composições diferentes de soluções para o preparo das esferas: 1) (0,5 g de argila e 0,5 g de quitosana); 2) (0,5 g de argila e 1,0 g de quitosana); 3) (1,0 g de argila e 0,5 g de quitosana) e 4) (1,0 g de argila e 1,0 g de quitosana) em 50 mL de solução de ácido acético 1,0 mol/L sob agitação 2060 rpm. As esferas foram analisadas quanto ao seu aspecto visual e aos seus parâmetros geométricos (porosidade, densidade e raio médio das esferas). A Figura III.6 ilustra a imagem das esferas obtidas.

Através dos resultados foi possível observar que as esferas preparadas com as soluções 2 (0,5 g de argila e 1,0 g de quitosana) e 4 (1,0 g de argila e 1,0 g de quitosana) apresentaram maior resistência mecânica. Esse comportamento está associado aos valores mais elevados de densidade obtidos em relação à solução 1 (0,5 g de argila e 0,5 g de quitosana), conforme ilustrado na Figura III.7. Foi observado, especialmente no caso do preparo na solução 1, a formação de corpo de fundo durante o preparo da solução de argila e quitosana. Este fenômeno também foi visualizado, porém de forma mais sutil, no preparo da solução 3 (1,0 g de argila e 0,5 g de argila). O corpo de fundo era constituído por argila e pode estar associado ao fato das esferas produzidas com estas soluções possuírem baixa resistência mecânica. As esferas preparadas com as soluções 1 e 3 também possuíram menores valores de porosidade.

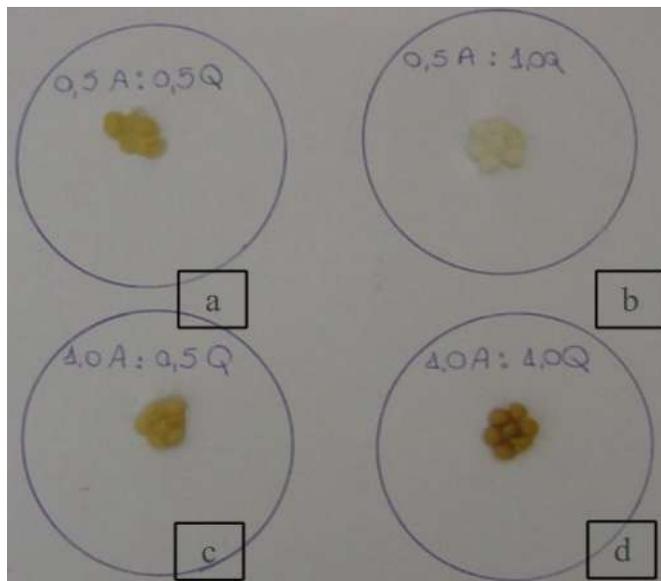


Figura III.6 - Esferas obtidas com as solução (a) 0,5 g argila e 0,5 g de quitosana; (b) 0,5 g de argila e 1,0 g de quitosana; (c) 1,0 g de argila e 0,5 g de quitosana e (d) 1,0 g de argila e 1,0 g de quitosana.

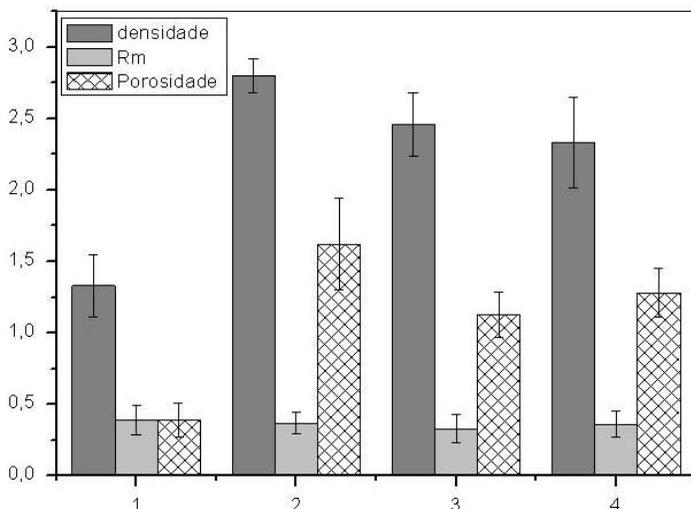


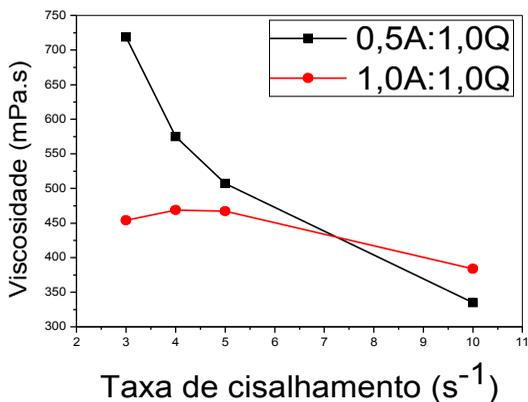
Figura III.7 - Modificação dos parâmetros geométricos (densidade, raio médio e porosidade) das esferas obtidas com as soluções (1) 0,5 g argila e 0,5 g de quitosana; (2) 0,5 g de argila e 1,0 g de quitosana; (3) 1,0 g de argila e 0,5 g de quitosana; (4) 1,0 g de argila e 1,0 g de quitosana. As barras representam o desvio padrão de cinco repetições.

Os resultados confirmam aqueles apresentados por Chang e Juang (2007), que por sua vez, visualizaram que um aumento da massa de quitosana está relacionado ao aumento da densidade das esferas. Na presente tese, foi possível verificar que a solução 2 constituída por 0,5 g de argila e 1,0 g de quitosana foi a que produziu as esferas com maior densidade. Os referidos autores também observaram que um aumento da massa de argila está relacionado com o aumento de porosidade das esferas. Esse mesmo comportamento foi observado neste trabalho onde as esferas produzidas com a solução 2 constituída pela maior massa de argila foi a que possuiu o maior valor de porosidade.

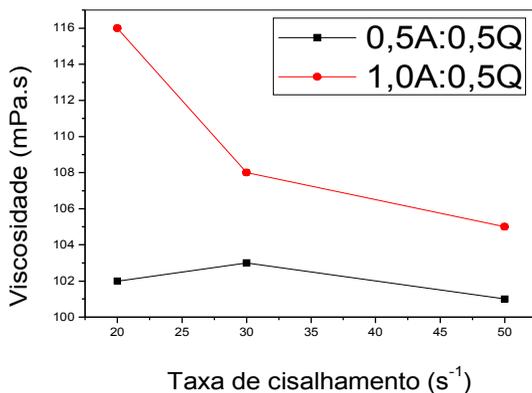
Outro estudo realizado neste trabalho foi a determinação do comportamento reológico das soluções de partida. Com base nos resultados obtidos foi possível observar que as soluções apresentaram um comportamento pseudoplástico conforme ilustrado pela Figura III.8. Acredita-se que o gel formado pela quitosana auxilia no aprisionamento das partículas de argila, impedindo a precipitação da mesma. Entretanto, as soluções 1 e 3 mostraram baixa viscosidade, causando a

sedimentação das partículas de argila e conduzindo à formação das esferas com menor porosidade. Os resultados referentes ao comportamento reológico das soluções 1 e 3 podem ser visualizados através da Figura III.8(B).

Levando-se em consideração o fato da solução 4 (1 g de quitosana e 1 g de argila) conduzir à formação de esferas com maior resistência mecânica e com elevado valor de densidade e porosidade, se comparado com a solução 1, é que esta solução foi escolhida para os estudos seguintes como suporte para imobilização de biocatalisador.



(A)



(B)

Figura III.8 - Curva de viscosidade do composto quitosana/argila das soluções 2 e 4 (A) e das soluções 1 e 3 (B). As letras A e Q correspondem respectivamente a argila e quitosana.

As esferas de quitosana/argila confeccionadas com a solução selecionada foram submetidas a um processo de ativação com solução de glutaraldeído 3% (v/v). Após o processo de ativação foi possível observar que as esferas tornaram-se mais escuras e resistentes. Novamente os parâmetros geométricos das esferas obtidas foram analisados e os seguintes resultados foram obtidos (Figura III.9).

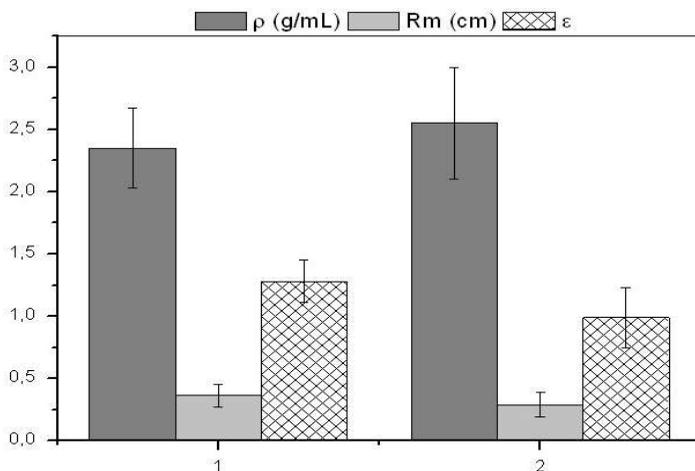


Figura III.9 - Parâmetros geométricos (densidade, raio médio e porosidade) das esferas de quitosana/argila. As esferas confeccionadas com a solução 4 são representadas pelo número 1 e as esferas confeccionadas com a solução 4 seguidas do processo de ativação com glutaraldeído 3% (v/v) são representadas pelo número 2 . As barras representam o desvio padrão de cinco repetições.

Através do gráfico visualizou-se a queda de porosidade das esferas ativadas com a solução de glutaraldeído. Além disso, também foi possível observar o aumento da densidade das esferas. A modificação dos parâmetros geométricos citados também foram constatados no trabalho de Villela (2006), que realizou a ativação de esferas de quitosana com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído e observou que, ao utilizar soluções com maiores porcentagens de glutaraldeído, as esferas tornaram-se mais escuras, com raio médio menor e resistência mecânica. O fato do aumento da porcentagem de glutaraldeído diminuir a porosidade e o raio médio das esferas está relacionado com o tipo de ligação que é formada na superfície do polímero de quitosana. O aumento de moléculas de glutaraldeído na superfície do polímero promove um aumento na formação de ligações imino ocasionando aproximação das cadeias poliméricas da quitosana (Figura III.10). O aumento do número de moléculas de glutaraldeído promove uma série de ligações entrecruzadas, diminuindo desse modo a porosidade da esfera e seu raio médio. Por outro lado, a ativação com

soluções constituídas por porcentagens muito baixas de glutaraldeído acarreta em pouca modificação na superfície do suporte com baixa ativação dos grupos amino (SISO et al., 1997).

Dessa forma, os trabalhos de otimização da porcentagem da solução de glutaraldeído a ser utilizada para ativar o suporte são importantes. Neste trabalho, foi utilizada uma solução de glutaraldeído 3% (v/v), pois o processo de imobilização com lipase foi previamente otimizado pelo grupo de grupo de Biotecnologia Aplicada à Produção de Biocombustíveis do Laboratório de Engenharia Bioquímica, divulgado no trabalho de Cruz (2007).

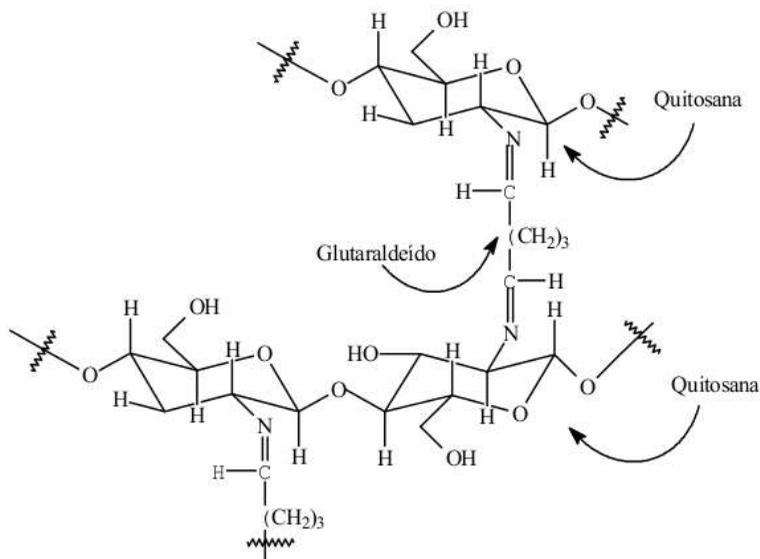


Figura III.10 - Representação das ligações cruzadas entre duas cadeias poliméricas de quitosana com o glutaraldeído. Fonte: Villela (2006).

III.5.2 imobilização da lipase do extrato bruto concentrado

Nessa etapa, a lipase contida no extrato bruto concentrado - obtido através do cultivo submerso do isolado fúngico selecionado do efluente de abatedouro de frango ou também denominado isolado 17 - foi submetida ao processo de imobilização no suporte sólido de

quitosana/argila. Para tanto, as esferas foram sujeitas a um processo prévio de ativação com glutaraldeído. A imobilização foi realizada através do contato direto da solução enzimática com as esferas de quitosana ativadas. Também é válido comentar que a porcentagem da solução de glutaraldeído utilizada para a ativação das esferas é importante não somente para promover modificações nos parâmetros geométricos das esferas, mas também porque está associada às modificações estruturais provocadas na enzima após ativação. As moléculas de glutaraldeído se ligam aos grupos amino da quitosana dando origem a grupos imino ($\text{CH}=\text{N}$) e é através desses grupos que a lipase reage fixando-se covalentemente ao suporte, conforme ilustrado na Figura III.11.

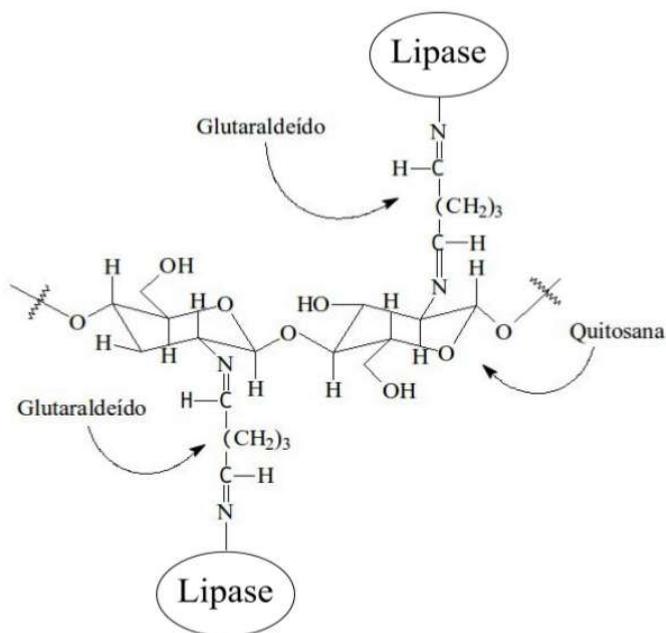


Figura III.11 - Representação estrutural da enzima imobilizada sobre o suporte (esferas de argila/quitosana) com auxílio do glutaraldeído Fonte: Jiang et al. (2005).

De acordo com Jiang et al. (2005), o excesso de moléculas de

glutaraldeído na superfície do suporte pode acarretar em um aumento de ligações com a molécula da enzima, promovendo um enrijecimento na estrutura tridimensional da enzima que pode levar a mesma à perda de sua atividade biológica. Também é válido comentar que a ativação das esferas de quitosana/argila com glutaraldeído ocorreu em um meio com pH alcalino para favorecer a formação dos grupos imino. De acordo com Morrison e Boyd (1996), a formação de tais ligações ocorre preferencialmente em pH alcalino, pois neste pH os grupos amino encontram-se desprotonados.

Para o processo de imobilização, além da realização da ativação das esferas e do contato das mesmas com solução enzimática, foram realizadas análises de atividade enzimática e de proteínas totais das esferas e do sobrenadante para verificar se houve modificação desses valores nos dois meios e se, de fato, ocorreu imobilização da lipase do extrato bruto. Para ilustrar melhor a eficiência da imobilização foram utilizadas as equações (III.8) e (III.9) para determinar o rendimento de proteínas aderidas ao suporte e rendimento de imobilização. Dessa forma, após o período 5 horas foi obtido em média 77,4% de proteínas acopladas e 80,9% de rendimento de imobilização.

É válido comentar que inicialmente os estudos de imobilização foram realizados com solução comercial de lipase. Verificou-se que, ao utilizar soluções com valores de atividade enzimática maiores de 700 U/mL, não ocorria modificação significativa nos valores de atividade enzimática do sobrenadante. Entretanto, neste caso, as esferas possuíam atividade enzimática. Essa observação pode estar associada ao fato de que, quando as moléculas da enzima migraram para o suporte em virtude solução original conter um elevado número de moléculas da enzima, tal diferença não foi visualizada.

O tempo de imobilização foi de 5 horas, conforme tempo adotado no trabalho de Villela (2006) que também utilizou esferas de quitosana. Segundo Jiang et al. (2005), é preciso tomar cuidado com períodos de tempo longos para o processo de imobilização e com a concentração da enzima utilizada. Para esse mesmo autor, um excesso de moléculas de enzima na superfície do suporte também pode promover perda da atividade enzimática.

III.5.3 Caracterização da lipase livre e imobilizada

Algumas características bioquímicas da lipase livre e imobilizada

foram determinadas com o objetivo de se conhecer possíveis modificações da estrutura tridimensional da enzima e, conseqüentemente, em sua atividade. É sabido que, de um modo geral, as enzimas imobilizadas apresentam propriedades superiores se comparadas às enzimas livres, no que tange ao tempo de vida útil. Entretanto, segundo Zanin e Moraes (2004), várias mudanças são descritas sobre as propriedades das enzimas. Podem ocorrer: efeitos conformacionais, efeitos estereoquímicos, efeitos microambientais e efeitos difusionais. Para detectar as possíveis mudanças sobre a atividade enzimática, analisou-se o efeito de diferentes agentes físicos e químicos sobre a lipase do caldo bruto imobilizada em esferas de quitosana/argila e realizou-se um estudo comparativo com a mesma enzima na forma livre.

III.5.3.1 Determinação da termoestabilidade

Para determinar a termoestabilidade enzimática foi utilizada a reação para determinação de atividade enzimática que se baseia na hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato. Nesse caso, o volume de 100 µL de enzima livre ou 0,07 g de esferas de quitosana/argila contendo a enzima imobilizada foi adicionado em tubos de ensaio contendo tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 7,0 e o substrato citado. As análises de atividade enzimática residual foram realizadas nas alíquotas retiradas após 54 minutos de incubação em temperaturas que variaram de 30, 36, 50, 64 e 70 °C. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura III.12.

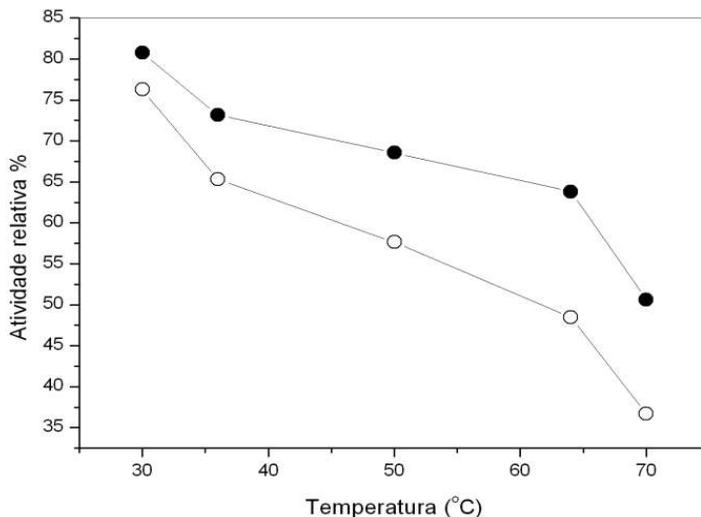


Figura III.12 - Determinação da atividade enzimática relativa de hidrólise da enzima livre (símbolo aberto) e imobilizada (símbolo fechado) em tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 7,0, após um período de incubação de 54 minutos em temperaturas que variaram de 30 a 70 °C.

Os resultados obtidos revelaram que a enzima imobilizada adquiriu uma termoestabilidade superior quando comparada à enzima livre. Essa diferença foi observada especialmente na temperatura de 64 °C, na qual a enzima imobilizada foi 20% mais ativa se comparada à enzima livre na mesma temperatura. Na temperatura de 70 °C a atividade relativa da enzima livre foi de 35%, enquanto que a enzima imobilizada foi de 50%.

Com base nos resultados obtidos foi possível observar um abrandamento da perda de atividade. O trabalho de Kharrat et al. (2011) ilustrou as características bioquímicas da lipase de *Rhizopus oryzae* antes e após imobilização em aerogel de sílica. Os resultados desses autores revelaram um comportamento de termoestabilidade semelhante ao obtido neste trabalho. A imobilização promoveu um aumento do potencial biotecnológico da enzima, uma vez que a mesma tornou-se mais estável, especialmente nas temperaturas maiores que 45 °C. Os autores citados observaram que em temperatura de 60 °C, a lipase livre

já encontrava-se sem nenhuma atividade enzimática. Por outro lado, quando a mesma enzima foi adicionada na forma imobilizada, a sua atividade relativa²³ foi de 80 %.

O trabalho de Desai, Dave e Devi (2006) ilustra a caracterização bioquímica de lipase pancreática imobilizada em esferas de quitosana ativadas com solução 0,02% (v/v) de glutaraldeído. Nesse estudo, os autores observaram que a lipase imobilizada possuiu uma termoestabilidade muito superior se comparada à enzima livre, pois quando as mesmas foram incubadas por duas horas à temperatura de 50 °C a enzima imobilizada possuiu uma atividade relativa de 80%, enquanto a enzima livre já encontrava-se sem nenhuma atividade.

A lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada no trabalho de Simões et al. (2011) em matriz de SiO₂-quitosana e suas características bioquímicas foram determinadas com auxílio de um delineamento experimental 2² estrela rotacional com quatro pontos axiais e quatro replicatas no ponto central. Através dos resultados obtidos os autores observaram um deslocamento dos valores obtidos para temperatura ótima em direção a regiões mais elevadas de temperatura. Esses autores utilizaram a referência de Said e Pietro (2004) para explicar esse comportamento. Segundo a referência citada, normalmente, quando as enzimas são imobilizadas em suportes sólidos, há deslocamento da temperatura ótima para valores mais elevados, uma vez que ocorrem interações entre a enzima e o suporte. Essas interações frequentemente resultam em uma estrutura mais rígida da molécula proteica, conferindo à conformação globular ativa do biocatalisador maior estabilidade frente à temperatura. O comportamento citado também foi observado por Palomo et al. (2002), que por sua vez, imobilizaram lipases de *Candida antarctica*, *Candida rugosa* e *Mucor miehei* em suporte hidrofóbico denominado Octadecil sepabeads. Nesse caso, para a lipase de *Candida rugosa* houve um deslocamento na temperatura ótima de 45 °C para 55 °C.

Em suma, considerando os resultados apresentados, foi possível verificar que a molécula da enzima adquiriu resistência térmica após o processo de imobilização e ilustra as possíveis aplicações que podem ser conferidas à lipase imobilizada nos mais diversos processos industriais

23 A atividade relativa trata-se do valor obtido para a razão entre a atividade enzimática final (analisada após um determinado período de tempo incubado em uma determinada temperatura) e atividade enzimática inicial (analisada antes da incubação a uma determinada temperatura).

envolvendo temperaturas mais elevadas.

III.5.3.2 Efeito de diferentes pHs sobre a Atividade Enzimática

O perfil de atividade enzimática relativa²⁴ da enzima livre e imobilizada frente à vários pHs foi determinado e os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura III.13. Nesse caso, foi determinada a atividade de hidrólise da enzima utilizando como substrato o *p*-nitrofenilpalmitato a 25 °C.

Através dos resultados obtidos verificou-se que o processo de imobilização não provocou modificação do pH ótimo da enzima, pois ambas formas enzimáticas apresentaram maiores valores de atividade enzimática relativa no pH 7,0. A enzima na forma imobilizada apresentou maiores valores de atividade enzimática na faixa de pH de 4,0 a 9,0. Porém, nos pHs mais extremos, de 3,0 e 10,0, os valores foram muito semelhantes entre as diferentes formas de enzimas.

O fato do pH 7,0 ter promovido a máxima atividade relativa observada fortalece muitos trabalhos citados na literatura que ilustram lipases que apresentam máximos valores de atividade enzimática em pHs semelhantes. Entretanto, também foi possível observar que existe grande variação dos resultados em relação a esse aspecto, conforme ilustra a Tabela III.2. Tais informações complementam as afirmações fornecidas anteriormente sobre a grande diversidade das características bioquímicas das lipases microbianas.

24 Neste caso, a atividade relativa tratou-se do valor obtido para a razão entre a atividade enzimática final (analisada após 5 minutos de incubação em diferentes pHs) e atividade enzimática inicial (analisada antes da incubação de 5 minutos em diferentes pHs).

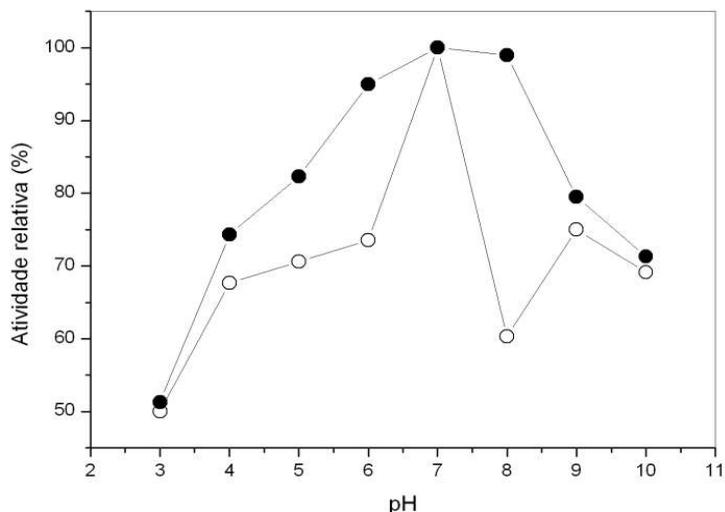


Figura III.13 - Efeito de diferentes pHs sobre a atividade enzimática de hidrólise relativa da enzima livre (símbolo aberto) e imobilizada (símbolo fechado) a temperatura de 25 °C.

Tabela III.2 - Detecção do pH que acarretou nos maiores valores de atividade enzimática para lipases microbianas obtidas por outros autores.

Origem da lipase	pH ótimo detectado	Referência
<i>Penicillium</i> sp.	8,5	Wolski et al. (2009)
<i>Burkholderia cepacia</i>	6,0	Jegannathan; Chan; Ravindra (2009)
<i>Penicillium</i> sp.	4,88	Wolski (2008)
<i>Bacillus megaterium</i>	7,5	Baron (2008)
<i>Penicillium verrucosum</i>	8,5	Menoncin (2007)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	8,0	Yu; Qin; Tan (2007)
<i>Candida rugosa</i>	7,0	Ting et al. (2006)
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	8,5	Kumar et al. (2005)

<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	6,5	Lima et al. (2004)
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	7,0	Kamini et al. (2000)
<i>Rhizopus oryzae</i>	8,5	Essamri; Deyris; Comeau (1998)
<i>Candida rugosa</i>	7,0	Gomes et al. (2006)

Contrariando os resultados apresentados neste trabalho, muitos autores ilustram uma modificação nos valores de pH ótimo da enzima após a imobilização em quitosana (TING et al., 2006; VILLELA, 2006; SIMÕES et al., 2011). Para Goldstein, Levin e Katchalski (1964), muitas vezes o comportamento de deslocamento do pH ótimo da enzima pode ser relacionado à existência de uma diferença na concentração de íons H^+ entre o microambiente, no qual a enzima está imobilizada, e a solução que envolve este suporte. A concentração de íons H^+ ao redor de um polieletrólito com carga negativa é maior que na solução. Esse comportamento se inverte quando o polieletrólito tem carga positiva. Dessa forma, a curva de pH *versus* atividade de enzima imobilizada em suporte com carga elétrica pode deslocar-se para regiões mais alcalinas, quando o suporte é carregado negativamente, e para regiões mais ácidas, quando o suporte é carregado positivamente. Seguindo este raciocínio, foi esperada uma mudança no pH ótimo da lipase imobilizada em direção a valores mais baixos de pH, pois o suporte utilizado (quitosana) é policatiônico. No entanto, é possível observar publicações que ilustram um perfil diferente do esperado. O trabalho de Ting et al. (2006) ilustra a imobilização de lipase de *Candida rugosa* em esferas de quitosana, submetidas à ativação binária utilizando glutaraldeído e EDC 1-etil-3-(3-carbodiimidimidetilaminopropil) cloreto. Nesse caso, os autores observaram um deslocamento do pH ótimo em direção a uma região mais alcalina, ou seja, a enzima livre possuiu um valor máximo de atividade enzimática no pH 7,0, enquanto que a enzima imobilizada possuiu um valor máxima de atividade no pH 8,0. O trabalho de Villela (2006) ilustra um comportamento semelhante. A enzima lacase foi imobilizada em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído 3% (v/v). Então, a enzima imobilizada apresentou deslocamento do pH ótimo em direção a uma região alcalina, onde inicialmente a máxima

atividade foi detectada no pH 4,0 e, após imobilização, a máxima atividade foi detectada no pH 5,5. Simões et al. (2011) imobilizaram lipase de *Candida rugosa* em matriz híbrida SiO₂-quitosana ativada com epícloridrina. A atividade do derivado foi avaliada em meio aquoso na hidrólise do azeite de oliva emulsificado com goma arábica. A atividade catalítica máxima da lipase solúvel foi em pH 7,0 e do derivado imobilizado foi em pH 7,5.

De acordo com Lante et al. (2000 apud Goldstein; Levin e Katchalski, 1964), as diferenças de gradientes de íons H⁺ entre os ambientes próximo à enzima e seu suporte é uma ferramenta útil para explicar os fenômenos de mudança de pH ótimo após os processos de imobilização. No entanto, é importante citar que essas mudanças podem estar associadas a outros fatores, além da carga do polímero. A posição do centro catalítico da enzima e o tamanho da molécula a ser biocatalisada são dois fatores envolvidos na distância do processo de reação da superfície do suporte e, conseqüentemente, de sua exposição à superfície carregada.

III.5.3.3 Efeito de diferentes solventes sobre a atividade enzimática

A estabilidade em solventes orgânicos é uma característica importante das lipases e pode determinar a forma na qual a enzima será utilizada, por exemplo, como catalisador em reações de síntese orgânica. O fato é que a maioria das lipases de origem microbiana é ativa em interfaces hidrofílicas-lipolíticas e toleram solventes orgânicos em diversos tipos de reações. Essas propriedades fazem das lipases o grupo de biocatalisadores mais utilizados em química orgânica (SAID e PIETRO, 2004). A escolha de um solvente para ser utilizado em sistemas de biocatálise está diretamente relacionada à sua hidrofobicidade. Para classificar os solventes em relação a esta característica, o parâmetro mais utilizado é o coeficiente de partição (log P). O log P é calculado com base no logaritmo do coeficiente de partição de um solvente em um sistema padrão octanol/água. Em outras palavras, o log P é a razão entre as concentrações do solvente na fase orgânica e aquosa. Segundo Zaks e Klivanov (1985), solventes hidrofílicos (-2,5 < log P < 0), tais como acetona e éteres, são incompatíveis com a atividade enzimática devido à remoção de água de solvatação da estrutura proteica.

Com base nas informações citadas é possível conferir a

importância em se caracterizar a atividade enzimática da lipase produzida pelo isolado fúngico frente a diferentes solventes. Na Tabela III.3 é possível observar os valores de log P dos solventes testados nesse trabalho.

Tabela III.3 - Valores de log P para os solventes utilizados neste trabalho.

Solvente	Log P
Metanol	-0,82
Etanol	-0,24
Acetona	-0,23
Éter etílico	0,83
Clorofórmio	2,00
Hexano	3,50
Heptano	4,00

Através dos resultados obtidos e ilustrados nas Figuras III.14,III.15,III.16 e III.17, foi possível observar que o solvente que provocou maior declínio da atividade enzimática foi a acetona (Figura III.15B).

De fato, neste caso, a imobilização da enzima não acarretou no aumento da vida útil da mesma. Curiosamente, a acetona não foi o solvente mais polar testado, porém foi o que acarretou no maior declínio da atividade das enzimas. Este mesmo comportamento foi observado por Essamri, Deyris e Comeau (1998), que analisaram a atividade enzimática da lipase produzida por *Rhizopus oryzae* em solventes com polaridades diferentes. No referido trabalho, a acetona foi o solvente que acarretou na maior desnaturação da enzima, enquanto que o hexano foi o solvente em que obteve os maiores atividades enzimáticas ao longo de um período de 8 dias (Figura III.14A). Segundo esses mesmos autores, o comportamento ocorreu porque as lipases possuem pouca compatibilidade em solventes hidrofílicos, mas, possuem alta compatibilidade com solventes hidrofóbicos, pois os mesmos retêm a atividade enzimática por não removerem moléculas de água de

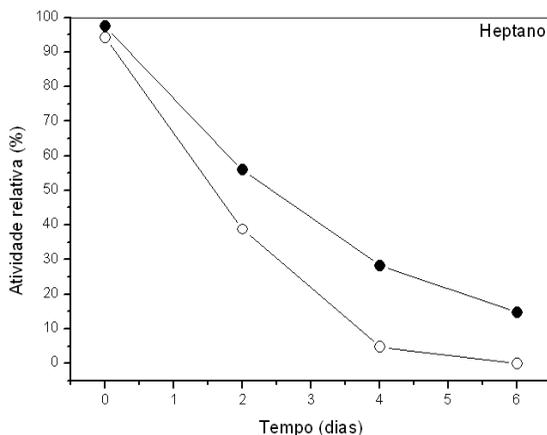
solvatação da superfície da enzima. No trabalho de Karra-Châabouni et al. (2008), que realizou a caracterização da lipase de *Rhizopus oryzae* em fibras de celulose frente a diferentes solventes, este comportamento também foi observado. Os autores citados verificaram que a lipase sofreu completa perda de atividade após 120 minutos de incubação com acetona e sofreu perda de 50% de atividade enzimática na presença de acetonitrila. A explicação para esse comportamento, dada pelos autores, também foi baseada no fato de tais solventes serem polares e interagirem com a água de solvatação da superfície da enzima.

Fazendo-se uma análise comparativa entre o hexano e o heptano que possuem valores de log P semelhantes, foi possível verificar que o hexano proporcionou maior estabilidade dos valores de atividade relativa²⁵ da enzima frente ao heptano, apesar de, em princípio, a atividade enzimática com o heptano ter sido maior. Inicialmente a atividade enzimática do heptano foi de 98,4% e do hexano foi de 91%. Esses resultados corroboram o trabalho de Essamri, Deyris e Comeau (1998), que também observaram o mesmo fenômeno. Por outro lado, outros trabalhos indicam que o heptano muitas vezes promove ativação da enzima. Tal afirmação pode ser ilustrada no trabalho de Baron (2008). Nesse caso, o heptano ativou a enzima de *Bacillus megaterium*, proporcionando uma atividade relativa de 121% da enzima quando comparado ao tampão fosfato pH 8,0, que foi utilizado como referência nesse trabalho. O trabalho de Lima et al. (2004) ilustra um estudo de estabilidade da lipase contida em caldo bruto de *Penicillium aurantiogriseum* em diferentes solventes. Os solventes hidrofóbicos, especialmente o heptano, foram capazes de ativar a enzima deixando-a com uma atividade relativa de 113,6%. Segundo Zaks e Klibanov (1985), solventes hidrofóbicos não prejudicam a atividade e podem até promover ativação enzimática, pois os mesmos não removem moléculas de água da superfície da enzima e podem interagir com a enzima mantendo a *lid* (tampa hidrofóbica) aberta. Por outro lado, esse argumento não pode ser utilizado em todos os casos, pois, segundo Verger (1997), em algumas enzimas a *lid* não está necessariamente relacionada com a ativação interfacial.

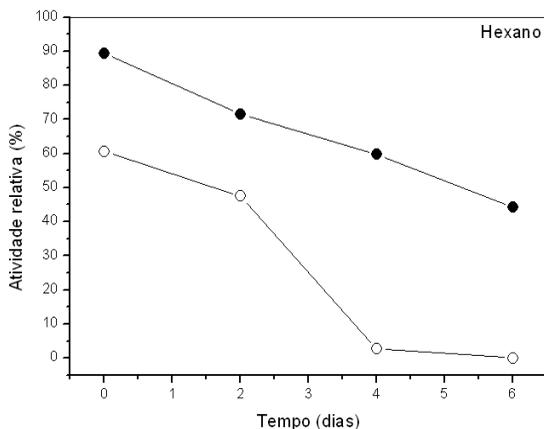
O fato do hexano proporcionar maior estabilidade da enzima em

25 Neste caso, a atividade relativa tratou-se do valor obtido para a razão entre a atividade enzimática final (analisada após 2, 4 e 6 dias incubação em diferentes solventes) e atividade enzimática inicial (atividade enzimática analisada imediatamente após a adição dos solventes).

relação ao heptano é um comportamento curioso. Segundo Illanes (2008), além do fato da *lid* não estar presente em diversos tipos de lipases, é preciso verificar a quantidade de água na reação. Assim, é válido comentar que, nesta tese, a atividade enzimática foi avaliada com base em uma reação de hidrólise e, conseqüentemente, um possível deslocamento do equilíbrio da reação, no sentido da esterificação pode ter sido favorecido com o uso do hexano 50% (v/v). O equilíbrio da reação é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. Com base no fato de que a pressão de vapor do hexano é 3,6 vezes maior que a do heptano, é possível dizer que os maiores valores de atividades enzimáticas foram obtidos para o hexano devido ao deslocamento do equilíbrio da reação. Outro fato é que os resultados poderiam ser muito diferentes caso a atividade sintética tivesse sido adotada para essa caracterização, ao invés da atividade de hidrólise.



(A)



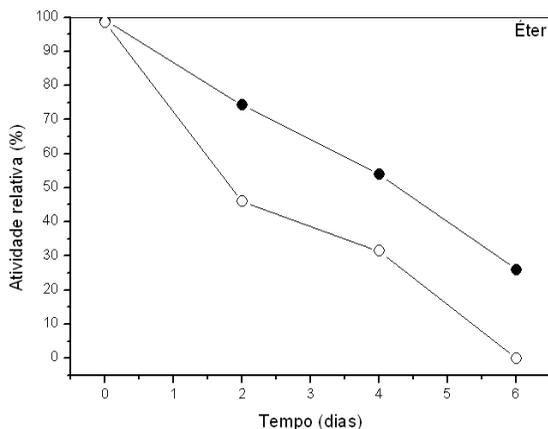
(B)

Figura III.14 - Efeito de hexano (A) e heptano (B) em relação à atividade enzimática relativa da enzima livre (símbolo aberto) e a enzima imobilizada (símbolo fechado) a 25 °C.

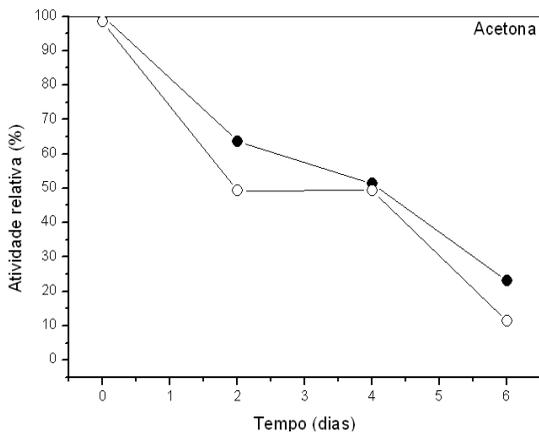
Ao analisar os dados referentes às atividades enzimáticas residuais após incubação com metanol, etanol, clorofórmio, éter e acetona (Figuras III.15, III.16 e III.17), foi possível verificar que o etanol foi o solvente que manteve a atividade enzimática pelo maior período de tempo, seguido pelo metanol. Foi possível fazer essa observação porque no sexto dia após incubação com etanol e metanol a enzima imobilizada detinha atividade residual de 54,2 e 49,9%. Tais constatações corroboram o trabalho de Castro-Ochoa et al. (2005), que caracterizou a lipase de *Bacillus thermoleovorans*. Os autores verificaram que a mesma apresentou uma elevada estabilidade em solventes polares, pois após 2 horas de incubação com 70% (v/v) de etanol e metanol a atividade residual foi de 71,8 e 65,7%, respectivamente. Segundo os mesmos autores, é possível que uma fina camada de moléculas de água permaneça fortemente ligada à enzima atuando como uma capa protetora ao longo de superfície hidrofílica da enzima e permitindo a retenção da conformação nativa. Por outro lado, no trabalho de Lock (2007), a lipase de *Debaryomyces melissophilus* foi muito sensível na presença de etanol e metanol. Apresentou baixa atividade com apenas 5% para metanol e atividade nula para 5% de

etanol.

O fato da enzima, nesta tese, possuir razoável estabilidade frente aos solventes polares pode estar associado ao processo de imobilização. Esse processo protege a enzima, tornando-a mais tolerante à polaridade e impedindo que os solventes polares retirem a água essencial em torno da molécula (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).



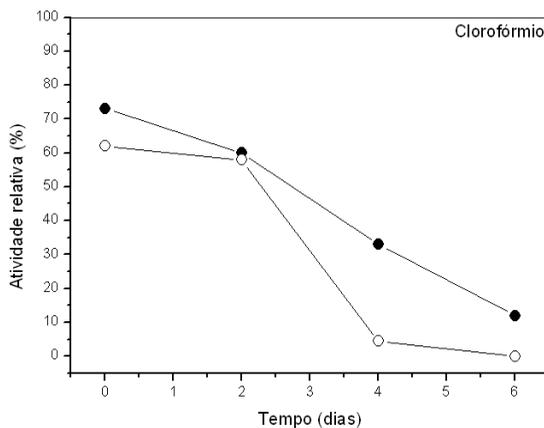
(A)



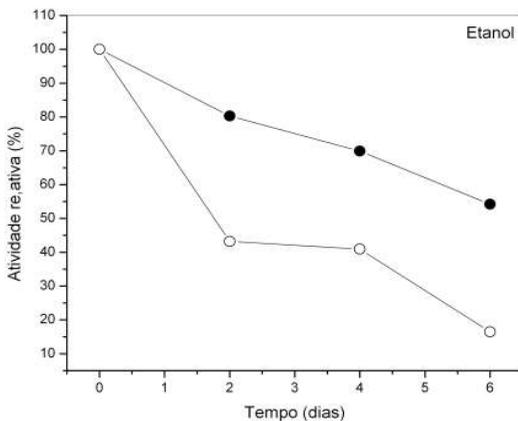
(B)

Figura III.15 - Efeito de Éter (A) e Acetona (B) em relação à atividade

enzimática relativa da enzima livre (símbolo aberto) e da enzima imobilizada (símbolo fechado) a 25 °C.



(A)

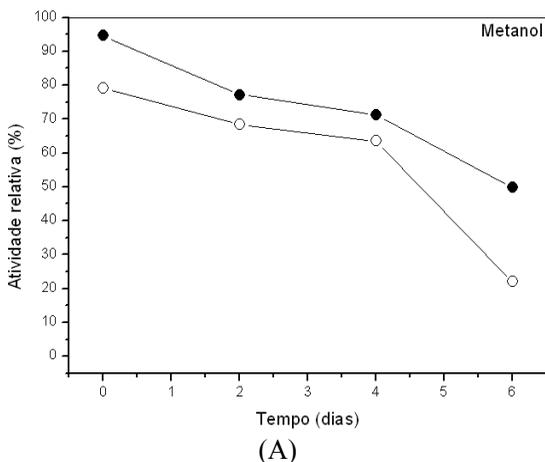


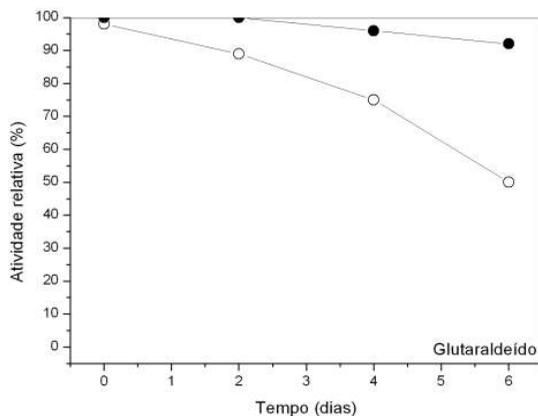
(B)

Figura III.16 - Efeito de Clorofórmio (A) e Etanol (B) em relação à atividade enzimática relativa da enzima livre (símbolo aberto) e a enzima imobilizada (símbolo fechado) a 25 °C.

Também foi possível observar que a enzima na forma imobilizada

teve seu tempo de vida aumentado frente ao glutaraldeído. Com base na Figura III.17B, é possível verificar que foram obtidos valores de até 79% de retenção de atividade enzimática após seis dias de incubação com a enzima na forma imobilizada. É válido comentar que o glutaraldeído (um dialdeído) é utilizado em processos de imobilização de proteínas e também como agente reticulante. A reticulação ocorre quando cadeias poliméricas são interligadas através de ligações covalentes produzindo polímeros tridimensionais com elevados valores de massa molar (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999). Além disso, solução alcalina de glutaraldeído é extensivamente utilizada em processos de desinfecção e esterilização em hospitais e ambulatórios. Os mecanismos que tornam o glutaraldeído um importante agente desinfetante estão relacionados a reações de alquilação de grupos sulfidrilas, hidroxilas, carbonilas e amino de moléculas de DNA, RNA e proteínas dos micro-organismos. Outro tipo de reação ocorrida, especialmente no pH alcalino, é a formação de bases de Schiff através do ataque no nitrogênio nucleofílico no grupo amino ($-NH_2$) que reage com o carbono do aldeído, formando uma ligação $C=N$. Em pHs ácidos a nucleofilicidade do nitrogênio do grupo amino é reduzida significativamente (COSTA JUNIOR; MANSUR, 2008). Apesar de todas as reações citadas promovidas pela ação do glutaraldeído, foi possível verificar que a enzima na forma imobilizada manteve seus grupos e sua estrutura protegida.





(B)

Figura III.17 - Efeito de Metanol (A) e Glutaraldeído (B) em relação à atividade enzimática relativa da enzima livre (símbolo aberto) e a enzima imobilizada (símbolo fechado) a 25 °C.

III.5.3.4 Efeito de diferentes íons sobre a atividade enzimática

Para dar continuidade aos experimentos de caracterização da enzima obtida, a mesma foi incubada com diferentes íons metálicos e com EDTA. Segundo Yu et al. (2005), os sais causam muitos efeitos sobre as propriedades das proteínas, incluindo atividade, estabilidade conformacional e solubilidade. Tais efeitos possivelmente surgem devido à ligação de íons a sítios específicos da proteína, mudando seu grau de hidratação. Ainda no trabalho de Yu et al. (2005), é apresentado um estudo de atividade, estabilidade e alteração de enantioseletividade da lipase de *Candida rugosa* frente a Li^+ , Na^+ e K^+ . Os resultados obtidos por esses autores mostraram que a incorporação dos sais auxiliaram na manutenção da atividade, impedindo alterações bruscas de pH e melhorando a termoestabilidade enzimática. Tais informações ressaltam os efeitos que diferentes tipos de íons possuem sobre as enzimas. Isso torna-se um dado importante, especialmente no que tange à proposta de aplicabilidade para as mesmas.

Os resultados obtidos para o efeito de diferentes íons sobre a estabilidade da enzima obtida neste trabalho encontram-se ilustrados na Figura III.18.

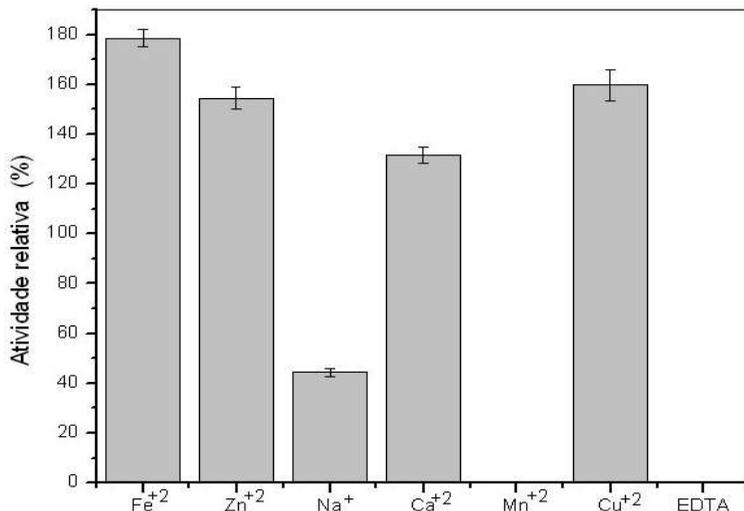


Figura III.18 - Efeitos de diferentes íons metálicos e EDTA sobre a atividade relativa da lipase imobilizada em esferas de quitosana/argila a 30 °C. As barras representam o desvio padrão de três repetições.

Os resultados obtidos confirmam, em parte, as observações de Demir e Tukul (2010), que caracterizaram a lipase de *Spirulina platensis* em relação a diferentes substâncias. Esses autores observaram aumento de atividade residual frente aos íons Mg⁺², Ca⁺² e Zn⁺² e diminuição de atividade residual frente aos íons Li⁺, Fe⁺², Fe⁺³, Cu⁺² e Mn⁺². O trabalho citado também visualizou uma perda de atividade residual em relação ao EDTA. Segundo Sugihara et al. (1992), a maioria das lipases são inibidas por íons metálicos. Esses mesmos autores analisaram a atividade enzimática da lipase de *Pseudomonas cepacia* após 1 hora de incubação, a 30 °C e pH 5,6 com soluções 1 mM dos íons Hg⁺², Cu⁺², Ca⁺², Ni⁺², Co⁺², Sr⁺² e EDTA. Os resultados obtidos revelaram que a enzima sofreu forte inibição pelos íons Hg⁺² e Cu⁺² e ativação quando exposta aos íons Ca⁺², Ni⁺², Co⁺², Sr⁺². O EDTA não provocou nenhuma

alteração na atividade enzimática. Segundos os autores, esse resultado comprova que esta lipase não é uma metaloenzima e, conseqüentemente, não necessita de íons para a sua atividade enzimática. No trabalho de Supakdamrongkul, Bhumiratana e Wiwat (2010), que caracterizaram a lipase de *Nomuraea rileyi*, foi possível verificar que a mesma sofreu forte inibição pelos íons Co^{2+} , Cu^{2+} e Mn^{+2} e sofreu estímulo pelos íons Na^+ , NH_4^+ e NaN_3 . Segundo os autores, é possível descrever dois mecanismos de ação dos íons sobre as enzimas. O primeiro deles é a ação direta dos íons sobre o sítio catalítico e o segundo é a formação de um complexo entre os íons metálicos e ácidos graxos ionizados, que, por sua vez, teriam sua solubilidade modificada na interface hidrofílica/hidrofóbica.

Nesta tese, foi possível verificar um efeito de ativação da enzima quando a mesma foi exposta ao Fe^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} e Cu^{+2} . O efeito estimulante do Ca^{+2} vem sendo ilustrado em várias publicações e alguns autores atribuem esse comportamento a mudanças estruturais da enzima. No presente trabalho, o EDTA mostrou um comportamento de inibição da enzima indicando a importância da presença de alguns desses íons. Tais resultados corroboram o trabalho de Dandavate et al. (2009), que caracterizaram a lipase de *Burkholderia multivorans* e também observaram o efeito inibidor do EDTA.

O íon Na^+ mostrou ter o efeito de inibir a lipase, nesta tese. Esse resultado não corrobora aos dados de Yu et al. (2005), que ilustrou um estudo do efeito de diferentes sais sobre a atividade enzimática da lipase de *Candida rugosa*. No referido trabalho, os autores verificaram que a adição de sais contribuiu para o aumento da atividade enzimática. O argumento utilizado pelos autores é de que os sais favorecem a dispersão das moléculas de enzima, facilitando dessa forma a transferência de massa durante o processo. No entanto, os autores também observaram que, com o aumento da quantidade de sal, a atividade enzimática decresceu devido ao fato dos sais recobrirem a superfície da enzima e dificultarem o contato do substrato com a mesma. Possivelmente, nesse caso, o Na^+ é mais quimicamente ativo, dificultando o contato entre o substrato e a enzima.

III.5.3.5 Estabilidade frente à estocagem

Pelo fato das enzimas serem suscetíveis à desnaturação em

temperaturas mais elevadas, de um modo geral, torna-se necessário estocá-las em temperaturas mais baixas. A imobilização da enzima pode amenizar essa característica e o material pode até ser, em alguns casos, estocado à temperatura ambiente sem perda significativa de atividade enzimática. Esse fator é importante para o planejamento da aplicação das enzimas em escala comercial (DESAI; DAVE; DEVI, 2006). Dessa forma, a enzima livre e imobilizada foi submetida a um teste de estabilidade durante um período de estocagem de 10 dias em diferentes meios e temperaturas. Através dos resultados obtidos e ilustrados na Tabela III.4, foi possível observar que a enzima imobilizada seca foi a que reteve maior atividade enzimática relativa²⁶, se comparada à mesma enzima livre estocada a 12 °C.

Tabela III.4: Efeito da condição de estocagem sobre a atividade enzimática residual da lipase na forma livre e imobilizada.

Condição analisada	Atividade enzimática relativa (%)
Enzima livre a 12 °C	77,42
Enzima imobilizada estocada em água destilada a 12 °C	95,83
Enzima imobilizada seca 12 °C	123,45

Os resultados obtidos corroboram os dados publicados por Desai, Dave e Devi (2006), que apresentam o estudo de estabilidade frente à estocagem de lipase pancreática livre e imobilizada em esferas de quitosana. Nesse caso, a atividade enzimática da solução de lipase livre sofreu perda completa de atividade a 35 °C após 2 dias de estocagem. Por outro lado, quando a mesma lipase foi imobilizada em esferas de quitosana e estocada na mesma temperatura, a perda completa de atividade só ocorreu após 4 dias e, quando as esferas foram armazenadas sem água, a perda ocorreu após 8 dias de armazenagem. Esses dados demonstraram que a enzima imobilizada armazenada sem qualquer líquido foi mais estável que a enzima imobilizada e armazenada em

²⁶ A atividade relativa tratou-se do valor obtido para a razão entre a atividade enzimática final (analisada após 10 dias de incubação a 12 °C) e atividade enzimática inicial (atividade enzimática analisada a partir do momento em que a temperatura atingiu 12 °C).

água, o que indica que, em meio aquoso, a enzima vai sofrendo liberação do suporte e, após a liberação, sofre desnaturação.

Demir e Tukul (2010) também estudaram a estabilidade de estocagem da lipase livre de *Spirulina platensis*. Os autores observaram que após trinta dias, a enzima armazenada à temperatura de 30 °C possuiu uma atividade enzimática relativa de 51%, enquanto que, a mesma enzima estocada a temperatura de 5 °C possuiu 38% de atividade enzimática relativa. Esses resultados são muito curiosos e contrariam a maioria dos estudos, pois ilustram que, quando estocada na geladeira, a perda de atividade enzimática foi maior.

III.5.3.6 Atividade de esterificação

De acordo com Wang; Xu e Shan (2008), em boa parte dos trabalhos de caracterização das lipases são utilizados métodos que se baseiam na atividade hidrolítica. Entretanto, segundo os mesmos autores, também é interessante averiguar a atividade sintética ou de esterificação da enzima, uma vez que parte das aplicações das lipases ocorrem justamente com suas aplicações em reações de esterificação. Dentre as diversas aplicações, é possível citar a produção de biodiesel. Dessa forma, a atividade de esterificação da lipase foi analisada com base no consumo de ácido láurico e glicerol para formação de monolaurina.

O valor médio obtido para a atividade de esterificação da lipase do extrato bruto frente ao ácido láurico e glicerol foi de $44,87 \pm 6,0$ $\mu\text{mol}/\text{min}$. Quando esse mesmo ensaio foi realizado para a enzima imobilizada nas esferas de quitosana/argila, o valor obtido foi de $39,98 \pm 4,7$ $\mu\text{mol}/\text{min}$. Submetendo os valores obtidos ao teste de Tukey com nível de significância de 0,05 foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os mesmos. Esse fato demonstra que o processo de imobilização da lipase do extrato bruto não promoveu modificações significantes na estrutura da enzima de modo a alterar seu perfil de atividade.

III.5.3.7 Atividade de esterificação frente a diferentes substratos

O argumento utilizado para justificar a realização deste experimento está relacionado à própria definição das lipases. A definição

atual cita as lipases como enzimas que hidrolisam preferencialmente substratos com cadeias acila com mais de dez átomos de carbono. Por isso, a determinação do comportamento hidrolítico de uma enzima é importante para classificar a mesma dentro de uma classe adequada. Assim, a caracterização da enzima contida no extrato bruto do isolado fúngico se fez necessária para determinar se as mesmas eram de fato lipases (BARON, 2008). Para isso foi realizada a determinação da atividade hidrolítica da referida lipase frente aos seguintes substratos: óleo de girassol, soja, oliva, mamona e óleo de vísceras. Através dos dados obtidos e representados na Figura III.19, foi possível verificar que a maior atividade enzimática foi obtida utilizando o óleo de soja como substrato.

Para compreender melhor o comportamento observado foi construída a Tabela III.5 que apresenta os ácidos graxos constituintes dos óleos utilizados como substratos. O óleo de soja é constituído principalmente por ácido linoléico e ácido oléico.

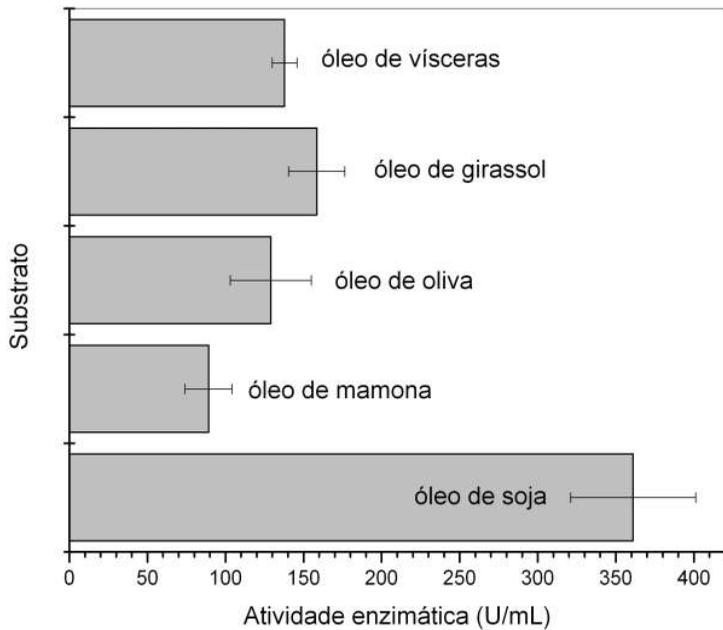


Figura III.19 - Efeito de diferentes substratos sobre a atividade enzimática de esterificação da lipase do extrato bruto do fungo isolado do efluente de abatedouro de frangos. As barras representam o desvio padrão de cinco repetições.

Tabela III.5 - Porcentagem de ácidos graxos constituintes do óleo de soja, oliva, mamona, girassol e óleo de vísceras.

Ácido graxo			Óleo				
Nome comum	Notação	Estrutura	Soja	Oliva	Mamona	Girassol	Vísceras
Palmitico	16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	11,23	16,8	1,22	5,88	25,12
Palmitoléico	16:1 Δ^9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	0	0	0	0	5,5
Esteárico	18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	3,01	2,93	0,71	5,27	5,26
Oleico	18:1 Δ^9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	21,84	63,09	2,95	24,56	45,65
Linoléico	18:2 $\Delta^{9,12}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	56,04	16,03	3,93	63,47	18,47
Linolênico	18:3 $\Delta^{9,12,15}$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	7,67	0,79	0	0	0
Ricinoléico	C18:1 Δ^1 ₀	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CHOHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	0	0	90,8	0	0

Araquidônico	C20:4 Δ^5 ,8,11,14	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH	0	0	0	0,23	0
Docosanóico	22:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	0,21	0,36	0,39	0,59	0

O comportamento observado por ser explicado pelo fato da cadeia de ácido linoléico ser mais adequada ao tamanho e à forma do sítio ativo da enzima em questão. Segundo Faber (1997), os diferentes substratos ligam-se ao sítio ativo da enzima, liberando diferentes quantidades de energia. Essa energia é necessária para promover as mudanças necessárias no sítio e conseqüentemente tornar o catalisador mais eficiente. Normalmente, moléculas de substratos com cadeias carbônicas menores possuem habilidade de liberar pouca quantidade de energia para modificar a conformação da lipase e tornar a mesma ativa biocataliticamente. Porém, cadeias maiores de substratos liberam maiores quantidades de energia e promovem modificações conformacionais mais desejáveis para a reação. No trabalho de Baron (2008), foi demonstrado que a lipase de *Bacillus megaterium* apresentou aumento de atividade de acordo com o aumento da cadeia acila. Segundo esse autor, a atividade do butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NNB) (4:0) em relação ao palmitato de *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NNP)(16:0) foi de 2,5 vezes menor. Kumar et al. (2005), também obtiveram resultados muito semelhantes para a lipase de *Bacillus coagulans*. Por outro lado, nem sempre a preferência da enzima por determinados tipos de compostos é tão evidente, como mostra o trabalho de Demir e Tükel (2010), no qual a lipase de *Spirulina platensis* foi ativa em uma ampla gama de óleos, tais como óleo de palma, girassol, oliva, soja, canola, amendoim e mamona. Segundo os autores, não foi possível verificar a especificidade de lipase, pois a mesma hidrolisou eficientemente todos os triacilgliceróis dos referidos óleos.

Diferentemente dos resultados apresentados nesta tese, os dados apresentados por Lock (2007), mostraram que a lipase de *Debaryomyces melissophilus* tem uma atividade lipolítica superior frente ao óleo de mamona.

Os resultados apresentados na Figura III.19 também ilustram que a atividade diminuiu significativamente quando a lipase do extrato bruto reagiu com os demais óleos. O fato é que o óleo de vísceras e o óleo de oliva possuem uma concentração adicional de ácido palmítico, frente ao óleo de soja. Segundo Faber (1997), ácidos com cadeias alquílicas menores tendem a inibir a atividade catalítica das lipases, através da reação com o resíduo da serina no sítio ativo, formando

produtos em menores concentrações. Além disso, tais ácidos podem interagir com a micro-camada aquosa das lipases causando perda de atividade. Por outro lado, o fato do óleo de mamona ter promovido a menor atividade enzimática pode estar relacionado à concentração que o mesmo possui de ácido ricinoléico. Por esse motivo, é preciso levar em consideração possíveis efeitos estéreos causados pela modificação da cadeia alquílica, dificultando a formação do complexo acil-enzima, que é a primeira etapa do mecanismo proposto para as reações catalisadas por lipases (SEBRÃO et al. 2007).

III.5.3.8 Efeito do uso repetido sobre a atividade residual da enzima imobilizada

Para que o processo de imobilização seja efetivo, o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período de tempo e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas significativas na atividade enzimática. Para Zanin e Moraes (2004), os processos com enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que os processos com a enzima livre se for possível que a enzima imobilizada seja capaz de reter considerável atividade enzimática após vários ciclos de uso. Dessa forma, haveria uma redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima, além da compensação das despesas adicionais com os processos de imobilização. Com base nessa importante característica que viabiliza o uso dos biocatalisadores em processos industriais, a possibilidade de reuso da enzima foi avaliada. Essa avaliação foi realizada através do uso consecutivo da enzima imobilizada para hidrolisar o p-nitrofenilpalmitato.

Através dos resultados obtidos e ilustrados na Figura III.20, observou-se que a atividade enzimática relativa²⁷ da enzima imobilizada sofreu decaimento ao longo do seu uso. Esse comportamento foi mais expressivo após o quarta ciclo de uso frente ao p-nitrofenilpalmitato. Após cinco ciclos de uso, a atividade enzimática relativa foi de 55%. Tais resultados indicam que o processo de imobilização acarretou pouca estabilidade operacional à enzima em questão.

27 A atividade enzimática relativa foi determinada através da razão entre a atividade enzimática inicial (atividade enzimática analisada no primeiro ciclo de uso) e atividade enzimática final (atividade enzimática analisada no quinto ciclo de uso).

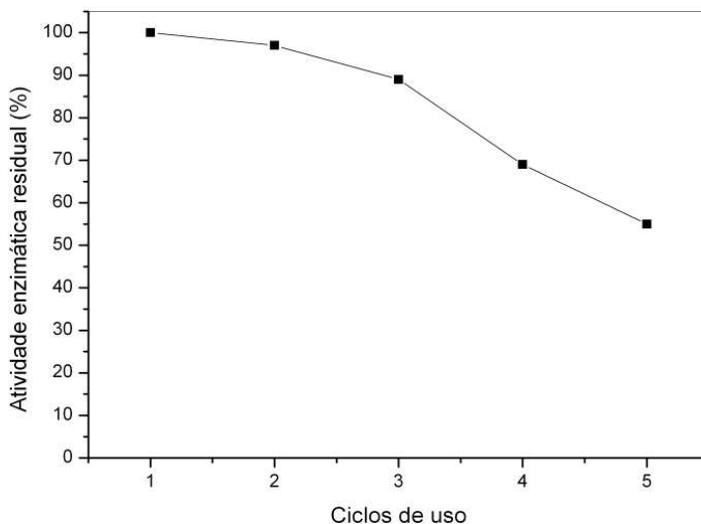


Figura III.20 - Estabilidade operacional da lipase imobilizada em esferas de quitosana/argila a 25 °C frente a reação de hidrólise usando *p*-NNP como substrato.

Os resultados observados corroboram os dados apresentados por Desai, Dave e Devi (2006), que mostraram que a lipase pancreática (Sigma) imobilizada em esferas de quitosana ativadas com solução 0,02% de glutaraldeído, foi utilizada cinco vezes com óleo de oliva como substrato. Os autores observaram que a enzima imobilizada nas esferas de quitosana sofreu queda gradual da atividade enzimática com o aumento do número de ciclos de uso. Após cinco ciclos de uso, as esferas apresentaram 50% de atividade enzimática relativa. Maior estabilidade operacional foi ilustrada no trabalho de Palla, Pacheco e Carrín (2011), que imobilizaram a lipase de *Rhizomucor miehei* em esferas de quitosana e testaram sua estabilidade operacional através da reação de alcoólise frente ao óleo de girassol e uma mistura de ácidos graxos. Nesse estudo, os autores realizaram a reação citada 10 vezes e observaram que a enzima, após 7 ciclos de uso, não foi inativada pela reação de acidólise ou sofreu desorção. Além disso, após 10 ciclos de uso, as esferas apresentavam mais de 70% de atividade enzimática relativa.

Amorim et al. (2003) também obtiveram resultados semelhantes aos apresentados nesta tese. Os autores imobilizaram lipase de *Syncephalastrum racemosum* em filme de quitosana ativado com solução 5% de glutaraldeído e verificaram a estabilidade operacional após 4 ciclos de uso. Os resultados revelaram que a atividade enzimática caiu para 45% da atividade inicial já no segundo ciclo de uso. No trabalho de Cetinus e Öztop (2000) também foi possível observar resultados semelhantes. Esses autores verificaram a estabilidade operacional de catalase imobilizada em filme de quitosana ativado com glutaraldeído e observaram que, após 4 ciclos oxidativos, a atividade enzimática foi reduzida a 50%. De acordo com esses autores, esse comportamento pode ser atribuído a uma possível liberação das moléculas de enzima, que eventualmente se ligaram ao suporte fisicamente.

No trabalho de Tang, Qing e Shi (2007), são ilustrados resultados mais interessantes de estabilidade operacional de uma lipase comercial neutra em nano-esferas de quitosana. Os autores avaliaram a estabilidade operacional da lipase imobilizada frente à reação de hidrólise com ácido oléico e verificaram que, após 10 ciclos de uso, a atividade enzimática relativa foi de 60%. Pereira, Zanin e Castro (2003), imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em quitosana na forma de flocos e em pó. A estabilidade operacional foi avaliada em meio aquoso (hidrólise do óleo de oliva) e em meio orgânico (esterificação de ácido butírico com butanol). Nesse caso, os autores verificaram que em meio aquoso, após 7 ciclos de uso, a atividade relativa foi de aproximadamente 10%. Já em meio orgânico a atividade relativa foi de 20%, após o sétimo ciclo de uso. Segundo os autores, o comportamento contrastante para as atividades hidrolíticas e de esterificação sugere que ocorre a desorção da enzima em relação ao suporte com maior intensidade em meio aquoso. Em meio orgânico, a queda de atividade pode estar relacionada ao fato do produto da reação associar-se ao suporte sólido, resultando na queda da atividade de esterificação para os ciclos seguintes. Para evitar esse fenômeno, existem técnicas que permitem a remoção desses potenciais inibidores da enzima imobilizada em suporte sólido e conseqüentemente melhoram a estabilidade operacional. Dentre as técnicas citadas é possível destacar a lavagem com solventes polares (por exemplo, acetona) para remoção de tais inibidores.

É possível perceber que não há um comportamento regular para a

estabilidade operacional das enzimas imobilizadas, pois os trabalhos publicados apresentam dados que variam muito. Segundo Zanin e Moraes (2004), a estabilidade operacional da enzima imobilizada está diretamente relacionada ao suporte e o método de imobilização utilizado. Autores como Durán et al. (2002) e Chibata (1972) comentam que as enzimas imobilizadas em suportes inorgânicos por meio de ligações covalentes são mais estáveis do que as imobilizadas em suporte orgânico. Para exemplificar essa afirmação é possível citar o trabalho de Kharrat et al. (2011), que apresenta o estudo de imobilização de lipase de *Rhizopus oryzae* em aerogel de sílica. Os autores verificaram o uso consecutivo da enzima frente a reação de esterificação da mesma com ácido oléico e butanol. Verificou-se que, após 11 ciclos de uso a enzima manteve sua atividade enzimática com valores de conversões em torno de 80%. Entretanto, a partir do décimo segundo ciclo de uso as taxas de conversão começaram a sofrer queda. No trabalho de Miranda et al. (2011), é ilustrado um estudo de imobilização de lipase de *Candida rugosa* em óxido de nióbio para síntese de biodiesel. Os autores citados ilustraram um estudo de estabilidade operacional da lipase imobilizada frente a reação de esterificação de ácido butírico e butanol. Neste caso, foi observado que, após 10 ciclos de uso, a atividade enzimática sofreu queda de apenas 25%.

No trabalho de Braga, Bruno e Castro (2005), é ilustrado um estudo de imobilização de lipase de *Candida rugosa* pelas técnicas de adsorção física e ligação covalente em matriz híbrida de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA). Os autores realizaram um estudo de estabilidade operacional utilizando como substrato o *p*-nitrofenilpalmitato (hidrólise) e ácido butírico e butanol (esterificação). Os resultados obtidos mostraram que os valores mais expressivos de atividade enzimática foram obtidos com as reações de esterificação. Além disso, a lipase fixada ao suporte através de ligações covalentes sofreu menor perda de atividade enzimática após seis ciclos consecutivos, se comparada à lipase fixada fisicamente ao suporte. A atividade enzimática relativa após o sexto ciclo para a lipase covalentemente ligada foi de aproximadamente 20%, enquanto que para a lipase fixada fisicamente foi de 0%. Segundo Durán et al. (2002), ambos métodos físicos e químicos possuem suas vantagens e desvantagens que dependem de vários fatores. Em geral, os métodos de imobilização química tendem a reduzir a atividade da enzima, onde as ligações covalentes podem perturbar a estrutura tridimensional da

enzima nativa. No entanto, essas ligações covalentes promovem uma forte e estável ligação entre a enzima e o suporte, e, em alguns casos, pode alterar a especificidade da enzima. Os métodos de imobilização física perturbam a enzima menos e conseqüentemente causam menor alteração das propriedades da mesma.

Além do suporte e do tipo de imobilização influenciarem na estabilidade operacional da enzima, outros fatores podem ser levados em consideração, tais como: (a) o desprendimento da enzima do suporte; (b) a obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; (c) a perda do suporte por atrito ou dissolução e (d) crescimento de micro-organismos (ZANIN; MORAES, 2004).

III.5.3.9 Caracterização do óleo de vísceras

Para a utilização do óleo de vísceras como material de partida para a produção de biodiesel tornou-se necessário realizar a determinação de parâmetros que influenciam diretamente o rendimento das reações de transesterificação. Tais parâmetros encontram-se intimamente relacionados com a natureza e a qualidade do material, expressando as propriedades físicas ou químicas dos mesmos.

Segundo Moretto e Fett (1989), o índice de acidez (IA) e o índice de peróxido (IP) revelam o estado de conservação do óleo, cuja decomposição de triacilgliceróis é acelerada pelo aquecimento e pela presença de luz. Outro parâmetro analisado foi a densidade (ρ), que segundo Lôbo e Ferreira (2009) está diretamente relacionada à estrutura molecular dos constituintes do óleo. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica dos ácidos graxos livres e dos ácidos graxos formadores dos triacilgliceróis, maior será a densidade. Entretanto, este valor deverá decrescer com o aumento do número de insaturações presentes na molécula. A presença de impurezas também pode alterar este parâmetro. Quanto ao índice de saponificação (IS) pode-se dizer que o mesmo varia com a natureza dos ácidos graxos constituintes do óleo. Quanto menor for a massa molar do ácido graxo, maior será o IS. Os resultados obtidos para as análises físico-químicas, IA, IS e D encontram-se listadas na Tabela III.6.

Tabela III.6 - Características físico-químicas do óleo de vísceras.

Parâmetro analisado	Óleo de vísceras
IA (%) (ácido oléico)	2,344±0,021
IS (mg KOH/g)	126,423±0,099
ρ (g/mL)	0,913±0,011



Os resultados variaram significativamente em relação aos dados obtidos pela literatura. Para exemplificar esta afirmação é possível citar o trabalho de Gomes (2005), que realizou testes de determinação de IA com um material semelhante ao utilizado neste trabalho, obtendo o valor de 1,22% (ácido oléico) para o óleo de vísceras. O trabalho realizado por Racanicci et al. (2004) ilustra um estudo de caracterização do óleo de vísceras fresco e do óleo de vísceras oxidado após o aquecimento do mesmo em banho-maria com temperatura de 80 e 90 °C. Os resultados obtidos revelaram que os valores de IA para o óleo oxidado foram de 2,25%, valor próximo ao apresentado nesta tese. O fato das propriedades do óleo de vísceras, objeto de estudo deste trabalho, se aproximarem aos valores obtidos para óleos da mesma natureza e residuais de outros trabalho, pode ser explicado pelo fato de que os óleos e gorduras, após sofrerem aquecimento, começam a sofrer degradação por reações hidrolíticas e oxidativas. Nesse caso, a oxidação é acelerada pela temperatura elevada e torna-se a principal responsável pela modificação das características do óleo (COSTA NETO et al., 2000; GOMES, 2005).

O índice de saponificação para o óleo de vísceras foi de 126,42 mg KOH/g. Óleos residuais geralmente possuem maior concentração de ácidos graxos livres de massa molecular menor. Conforme

comentado na revisão bibliográfica deste trabalho, os óleos utilizados são comumente obtidos com o auxílio de centrifugas. O óleo de vísceras utilizado aqui é obtido normalmente através do cozimento de vísceras. Esse fato pode estar vinculado ao aumento do IA deste tipo de óleo, já que a elevada temperatura propicia a liberação de ácidos graxos livres dos triacilgliceróis. O valor de densidade obtido para o óleo corrobora o trabalho apresentado por Gomes (2005).

Com o intuito de verificar as bandas relacionadas aos grupamentos orgânicos característicos do óleo, foi realizada a análise de infravermelho (IV) do mesmo, conforme ilustrado na Figura 21 .

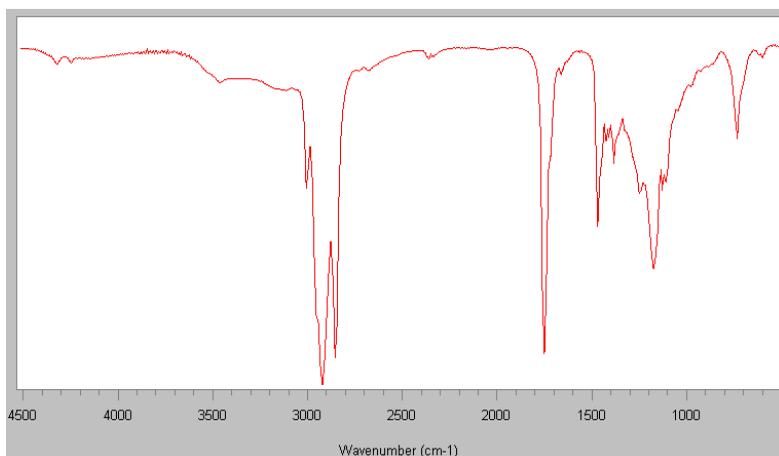


Figura III.21 - Espectro IV do óleo de vísceras.

Através dos resultados obtidos foi possível observar bandas características dos ácidos carboxílicos na forma de triacilgliceróis, sendo bandas de estiramento C=O com intervalo de frequência de 1735 - 1760 cm^{-1} de intensidade forte. Em torno de 3000 cm^{-1} foi possível observar bandas correspondentes a estiramentos C-H de grupos CH_3 - e CH_2 - com intensidade moderada para o óleo de vísceras (SILVERSTEIN, 1991) .

A composição de ácidos graxos do óleo de vísceras foi analisada com base no cromatograma ilustrado na Figura III.22. Através do referido cromatograma foi possível verificar que o óleo possui uma composição média centrada em quatro ácidos graxos principais: ácido palmitoléico (C16:1), ácido palmítico (C16:0), ácido linoléico (C18:2),

ácido oléico (C18:1) (Tabela III.7).

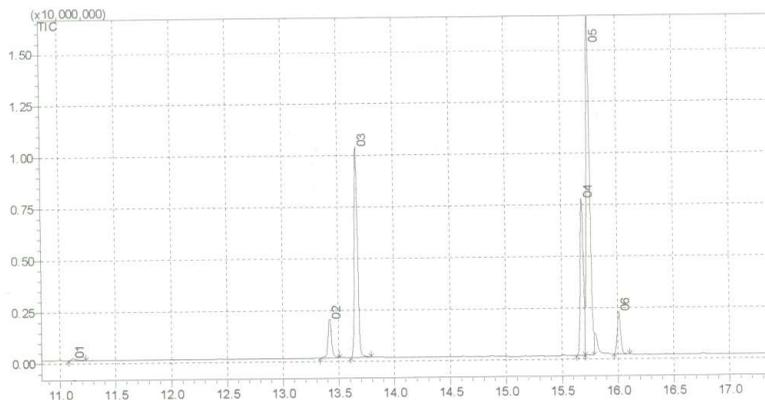


Figura III.22 - Cromatograma da amostra de óleo de vísceras. Os picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 referem-se aos ácidos mirístico, palmitoléico, palmítico, linoléico, oléico e esteárico, respectivamente.

Tabela III.7 - Composição de ácido graxos do óleo de vísceras.

Número de carbonos	Concentração (%)	Ácido graxo
14	0,39	Ácido mirístico
16	5,11	Ácido palmitoléico
16	25,12	Ácido palmítico
18	18,47	Ácido linoléico
18	45,65	Ácido oléico
18	5,26	Ácido esteárico

De acordo com Costa Neto et al. (2000), existem diversas dificuldades em se processar alimentos em óleos e gorduras aquecidas. Já é sabido que o aquecimento de gorduras pode acarretar na formação de compostos com propriedades anti-nutricionais, tais como produtos de

oxidação de lipídeos, irritantes gastrointestinais, inibidores enzimáticos, destruidores de vitaminas e agentes mutagênicos e carcinogênicos. Por essa razão, óleos aquecidos ou usados na maioria das vezes tornam-se resíduos indesejados. O reuso destes materiais como material de partida para a produção de biodiesel retira do meio ambiente um poluente e também permite a geração de uma fonte alternativa de energia.

III.5.3.10 Uso da lipase obtida para produção de biodiesel

Este experimento foi realizado para verificar o potencial de aplicação da lipase produzida pelo isolado fúngico na produção de ésteres etílicos em condição específica. Para a realização de um comparativo com um biocatalisador, frequentemente utilizado em diversos trabalhos publicados, também foi utilizada a Novozym 435²⁸ (MITTELBACH, 1990; KAIEDA et al., 1999; RODRIGUES, 2009; MACEIRAS et al., 2009; ROSA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010).

O substrato utilizado neste experimento foi o óleo de vísceras filtrado. Para a realização de um estudo comparativo com um material de partida amplamente utilizado também fez-se o uso do óleo de soja. O solvente utilizado neste experimento foi o álcool etílico. Embora diversos trabalhos ilustrem a importância do uso de um co-solvente para a produção de biodiesel ²⁹ (OLIVEIRA et al., 2004; FACCIO, 2004; ROSA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010), o grupo de Biocatálise Aplicada à Produção de Biocombustíveis tem obtido bons resultados de porcentagem de conversão em ésteres com experimentos realizados com o uso de óleos vegetais e óleo de frituras, sem a adição de co-solventes (CRUZ et al., 2005; CRUZ, 2007; DORS, 2011).

As condições experimentais para a produção de biodiesel levou

28 A Novozym® 435 trata-se de uma formulação comercial à base do extrato bruto de *Candida antarctica* B. O extrato é preparado por meio do cultivo submerso de uma cepa de *Aspergillus* geneticamente modificada e que por sua vez é utilizada para expressar a lipase. Na sequência, o extrato é imobilizado em resina aniônica macroporosa por um processo de adsorção. A resina utilizada possui uma área superficial (BET) de 130 m²/g, diâmetro médio do poro de 150 Å e volume do poro de 0,5 cm³/g (ROSA, 2009).

29 Antczak et al. (2009), em seu artigo de revisão, comenta que os alcoóis mais usados na produção do biodiesel são o etanol e o metanol, que, por sua vez, são os mais produzidos. Entretanto, estes alcoóis são agentes desnaturantes mais fortes que os alcoóis contendo cadeias carbônicas maiores. O rendimento das reações de transesterificação catalisadas enzimaticamente aumenta de acordo com o comprimento das cadeias carbônicas dos alcoóis e são dependentes de um equilíbrio entre a velocidade da reação e a taxa de desnaturação da enzima.

em conta a temperatura de 30 °C e tempo de 24 horas. A referida temperatura foi escolhida devido à caracterização da enzima imobilizada do extrato bruto ter revelado que a mesma possui maior atividade a 30 °C. Quanto ao valor escolhido para o tempo de reação, embora muitos trabalhos utilizem condições experimentais diferentes para a reação de transesterificação enzimática, de modo geral, os tempos adotados não ultrapassam 24 horas, conforme ilustrado na Tabela III.8. Também é válido comentar que um dos aspectos negativos do uso da catálise enzimática, se comparada à catálise utilizando reagentes químicos, está relacionada ao tempo de reação. Para catálise alcalina utilizando hidróxido de sódio, Ferrari, Oliveira e Scabio (2005) adotam um tempo de reação para transesterificação de óleo de soja de 5 minutos. No caso da transesterificação enzimática, quanto maior o tempo de reação, maiores as porcentagens de conversão. Por outro lado, maiores tempos de reação acarretam na menor viabilidade de aplicação em maiores escalas. Desse modo, apesar de existirem trabalhos que utilizam períodos de tempo maiores para a transesterificação enzimática, optou-se por utilizar neste estudo o período de tempo de 24 horas.

Tabela III.8 - Valores de temperatura e tempo para reações de esterificação enzimática escolhidos por outros autores.

Tipo ou origem da lipase utilizada	Temperatura (°C)	Tempo de reação (h)	Referência
<i>Penicillium expansum</i>	35	24	Li; Zong; Wu, 2009)
Lipozyme® de <i>Rhizomucor miehei</i>	37	24	De Paola et al. (2009)
Novozym 435	50	8	(Maceiras et al. (2009)
Lipozyme® IM de <i>Mucor miehei</i>	35 - 65	8	Oliveira et al. (2004)
Novozym 435	65	6	Rosa; Oliveira; Oliveira (2010).
Novozym 435, Lipozyme® de <i>Rhizomucor miehei</i> e <i>Mucor miehei</i>	30	6	Rodrigues et al. (2008)
<i>Lipase livre de Pseudomonas fluorescens</i> <i>lipase de Mucor miehei</i> imobilizada em resina de troca iônica <i>lipase de Candida sp</i> imobilizada em esferas de resina acrílica	45	5	Mittelbach (1990).
Novozym 435	40	0,5	Talukder et al. (2009)

Novozym 435	32	24	Rosset et al. (2011)
Lipase AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ,	45	12	Tongboriboon; Cheirsilp; H-
Lipase PS de <i>Pseudomonas cepacia</i> ,			Kittikun (2010)
Lipase de <i>Candida rugosa</i> , Lipozyme			
TL IM de <i>Thermomyces lanuginosa</i> e			
Novozym 435			

Os resultados obtidos dos sistemas utilizados para os ensaios de produção de biodiesel encontram-se ilustrados na Tabela III.9.

Tabela III.9 - Resultados dos ensaios de obtenção de ésteres etílicos de óleo de soja e óleo de vísceras utilizando lipase do extrato bruto e Novozym 435.

	Ensaio experimental	Conversão de ésteres (%)
1)	óleo de soja + etanol + Novozym 435	90,32
2)	óleo de soja + etanol + extrato bruto ³⁰	54,58
3)	óleo de vísceras + etanol + Novozym 435	35,17
4)	óleo de vísceras + etanol + extrato bruto	28,11

Um cromatograma típico obtido da injeção das amostras de ésteres etílicos pode ser visualizado na Figura III.23.

30 Neste caso, a enzima foi utilizada na forma livre.



Figura III.23 - Os picos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem ao palmitoleato de etila, palmitato de etila, linoleato de etila, oleato de etila, estearato de etila, respectivamente.

Foi possível observar que o óleo de soja foi eficientemente esterificado pela Novozym 435 sem a adição de um co-solvente. Esse resultado corrobora o trabalho de Cruz et al. (2005) que por sua vez, investigou a transesterificação de óleo de soja usado em frituras usando metanol e etanol. A Novozym 435 foi utilizada neste caso em sistema livre de solventes orgânicos. As porcentagens de conversão de ésteres foram analisadas através de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e os resultados obtidos revelaram que os triacilgliceróis foram completamente convertidos em ésteres após 96 horas de reação à temperatura de 37 °C.

Mittelbach et al. (1990) investigaram a transesterificação de óleo de girassol com lipase livre de *Pseudomonas fluorescens*, lipase imobilizada de *Mucor miehei* e lipase imobilizada de *Candida* sp. Os autores investigaram ainda a eficiência da alcoólise com metanol, etanol, *n*-propanol, *n*-butanol e *n*-pentanol. Também foram investigadas a importância da presença do solvente e da adição de água na reação. O melhor resultado em conversão de ésteres (99%) foi obtido para a lipase de *Pseudomonas fluorescens*, sem adição de água e com uso de etanol

absoluto. O trabalho de Linko et al. (1998) ilustra uma pesquisa sobre a alcoólise de óleo de colza em reatores de leito agitado sem solventes orgânicos e com vários tipos de lipases diferentes. Os resultados obtidos revelaram que foram obtidas porcentagens de conversão de até 95% utilizando temperatura de 47 °C após 24 horas de reação com lipase imobilizada em Duolite ES-561.

O trabalho de Ognjanovic et al. (2009) apresenta um estudo de produção de biodiesel utilizando óleo de girassol em sistema livre de solvente com Novozym 435. Os autores comentam que a produção de biodiesel em sistemas livres de solventes, de modo geral, possuem algumas vantagens se comparada às reações obtidas em sistemas com co-solventes, tais como redução de custos e aumento de controle do processo. Embora seja possível atingir altos rendimentos de produção de ésteres em sistemas livres de solventes, é importante lembrar que a eficiência da reação com lipases de elevada atividade enzimática e a melhoria da estabilidade para a síntese de biodiesel ainda necessita de muitas melhorias. O maior problema na implementação das enzimas para a síntese de biodiesel em sistemas livres de solventes é a baixa estabilidade na presença de um excesso de solvente, especialmente de caráter polar. Para minimizar a inativação da enzima tem sido proposto, além da imobilização da mesma, operar com etapas de adição de solventes.

Outro aspecto a ser destacado no experimento realizado é a adição de água, que, por sua vez, foi de 3,3% (m/m) e se fez necessária para realizar a adição da solução de Novozym 435 com atividade enzimática semelhante à solução adicionada de extrato bruto. O efeito da água sobre a reação de transesterificação enzimática é um dos fatores que vêm sendo estudados por influenciar significativamente nos rendimentos de ésteres obtidos (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). Salis et al. (2005) realizaram um estudo de produção de ésteres oriundos do óleo de oliva utilizando as lipases de *Candida antarctica B*, *Rizhomucor miehei*, e *Pseudomonas cepacia*, sem a adição de solventes orgânicos. Os autores otimizaram diferentes condições da reação, dentre elas o teor de água utilizado, e verificaram que é necessário adicionar aproximadamente 0,5% em massa para promover a ativação das enzimas em função da formação de gotas de água/óleo que aumentam a área interfacial disponível. Por essa razão, alguns autores sugerem a adição de água para ativar a enzima. Segundo Illanes (2008), é importante que as enzimas possuam uma pequena quantidade de água para reter a sua

conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte. A água contribui ainda para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína e pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima.

No trabalho de Faccio (2004), foi realizado um estudo comparativo entre transesterificação básica e enzimática utilizando óleo de soja e mamona. O autor realizou um planejamento fatorial visando otimizar a produção de biodiesel através da análise dos seguintes fatores: temperatura, concentração de enzima, razão molar óleo-etanol e concentração de água para o caso na reação envolvendo lipases Lipozyme IM e Novozym 435. Nesse caso, foi observado que os melhores resultados de conversão de éster para o sistema Novozym 435 e óleo de soja foram obtidos utilizando as seguintes condições: temperatura de 65 °C, razão óleo-etanol de 1:10, concentração de enzima de 5% (p/p) e concentração de água de 0% (p/p). Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi (2004), afirmam que muitos biocatalisadores imobilizados já possuem uma quantidade de água significativa em seu suporte, o que possivelmente explica porque Faccio (2004) obteve resultados negativos para as porcentagens de conversão em ésteres quando adicionou água na reação.

Nesta tese, não foram realizados experimentos de otimização das melhores condições para a reação de transesterificação. No entanto, foi possível verificar que, para a porcentagem de água utilizado para o sistema 1³¹, foi possível obter bons rendimentos de conversão de ésteres. Conforme citado na revisão bibliográfica, as lipases em meio aquoso catalisam reações de hidrólise. Dessa forma, a adição de maiores quantidades de água desfavorecem a reação de transesterificação. Esse fato pode estar vinculado aos resultados obtidos para o sistema 3³², que acarretaram em uma porcentagem de conversão de ésteres aproximadamente 2,5 vezes menor, se comparado ao sistema 1. O óleo de vísceras poderia possuir uma determinada quantidade de água que porventura tenha atuado no deslocamento da reação para hidrólise do óleo.

Os resultados obtidos para a conversão em ésteres para o sistema 1 não condizem com os resultados apresentados no trabalho de RODRIGUES et al. (2008). Os autores obtiveram uma porcentagem de

31 Sistema 1: Reação envolvendo óleo de soja, etanol e Novozym 435.

32 Sistema 3: Reação envolvendo óleo de vísceras, etanol e Novozym 435.

conversão de ésteres de aproximadamente 35% utilizando a Novozym 435, para esterificar óleo de soja a 30 °C após 6 horas de reação, e utilizando uma razão molar de álcool para óleo de 3 para 1. Esses mesmos autores verificaram que, ao utilizar razões molares maiores que 5 para 1, as porcentagens de conversão de ésteres foram ainda menores, pois a reação de transesterificação passou a ser inibida devido à maior concentração de solvente. Dessa forma, com base nos diferentes trabalhos citados, é possível verificar que muitos resultados distintos são obtidos com o uso da Novozym 435 para catalisar a transesterificação de diferentes tipos de substratos. Apesar dos bons resultados obtidos para o sistema 1, o sistema 3 acarretou em um menor desempenho de conversão de ésteres. Em relação a isso, também é válido comentar que os dois óleos utilizados possuem características bastante distintas e que possivelmente tenham influenciado na forma de atuação da enzima. O óleo de soja utilizado passou por um processo de remoção de fosfolipídeos, branqueamento e desodorização. No caso do óleo de vísceras, como se trata de um resíduo, existem diversas substâncias adicionais que podem influenciar no rendimento final e que, por sua vez, estão associadas à sua natureza e ao processo de produção, tais como colesterol, íons metálicos, surfactantes e etc.

Os ensaios experimentais 2³³ e 4³⁴ ilustram o desempenho da lipase do extrato bruto para a conversão de ésteres etílicos. Os resultados revelaram que o sistema 2 acarretou em um percentual de conversão de ésteres etílicos de 54,58, enquanto, no sistema 4, foram obtidos valores de 28,11%. O fato do sistema 2 ter acarretado em um maior valor de conversão de ésteres possivelmente está vinculado às características da enzima contida no extrato bruto. Nos experimentos de caracterização da enzima do extrato bruto realizados neste trabalho foi possível observar que a enzima possuiu uma maior atividade quando foi utilizado como substrato o óleo de soja. Foi detectada uma diferença de aproximadamente 2,5 vezes nos valores de atividade enzimática. Mesmo os valores de atividade enzimática obtidos na caracterização da enzima estarem relacionados à reação de hidrólise, ainda sim é possível verificar a maior afinidade pelo uso do óleo de soja. Além disso, conforme citado anteriormente, as possíveis substâncias adicionadas contidas no óleo de vísceras podem ter desfavorecido a reação de transesterificação.

33 Sistema 2: Reação envolvendo óleo de soja, etanol e extrato bruto.

34 Sistema 4: Reação envolvendo óleo de vísceras, etanol e extrato bruto.

II.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização de produção e o estudo de algumas características das esferas de quitosana/argila foram realizados. Foi possível verificar que, dentre quatro soluções utilizadas, a solução contendo 1 g de quitosana e 1 g de argila esmectítica ativada foi a responsável por gerar esferas com resistência mecânica e porosidade mais adequadas para a imobilização da lipase contida no extrato bruto produzido pelo isolado fúngico do efluente bruto de abatedouro de frangos. A lipase do extrato bruto foi eficientemente imobilizada após 5 horas de contato com as esferas de quitosana/argila ativadas com solução de glutaraldeído 3% (v/v), quando foi obtido em média um rendimento de imobilização de 80%.

A lipase do extrato bruto e a mesma lipase imobilizada nas esferas de quitosana/argila foram submetidas a um processo de reconhecimento dos efeitos provocados por diferentes agentes físicos e químicos sobre a atividade enzimática. Os resultados revelaram que a enzima imobilizada apresentou o mesmo perfil de atividade *versus* diferentes pH(s) e temperaturas. Entretanto, após o processo de imobilização um aumento significativo da vida útil da enzima foi observado, pois na temperatura de 70 °C, a atividade relativa da enzima livre foi de 35%, enquanto a atividade relativa da enzima imobilizada foi de 50%. Um aumento de vida útil também foi observado quando a enzima foi incubada com soluções de diferentes pH(s), mesmo não sendo visualizada modificação do pH ótimo da enzima. Ambas formas enzimáticas apresentaram maiores valores de atividade enzimática relativa no pH 7,0. A análise do efeito de diferentes solventes sobre a atividade das formas enzimáticas também foi realizada. Foi possível verificar que, de um modo geral, o processo de imobilização também promoveu aumento de vida útil da enzima, especialmente frente ao hexano, etanol, metanol e glutaraldeído. O fato das enzimas terem adquirido maior estabilidade especialmente frente ao metanol e etanol associa-se ao processo de imobilização, que protege a enzima e a torna mais tolerante à polaridade, impedindo que os solventes polares retirem a água essencial em torno de sua molécula.

A análise do efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade de ambas formas enzimáticas foi realizada e foi motivada pelo fato de diversos artigos publicados relatarem o uso de diferentes íons para ativar

as lipases. Os resultados revelaram que a enzima sofreu ativação em relação à reação de hidrólise quando incubada com solução 1 mM dos íons Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} e Na^+ . Por outro lado, a mesma enzima sofreu inativação frente ao íon Mn^{+2} e solução de EDTA. O fato do EDTA inibir fortemente a enzima ilustra que a lipase em questão é uma metaloenzima e, conseqüentemente, necessita de íons metálicos para a sua atividade enzimática.

A estabilidade das formas enzimáticas foi monitorada durante um período de 10 dias. Assim foi possível verificar que a enzima imobilizada seca foi a que reteve maior atividade enzimática relativa, se comparada à mesma enzima imobilizada estocada em água destilada a 12 °C. Dessa forma, quando a enzima imobilizada foi armazenada sem qualquer líquido, a mesma tornou-se mais estável, o que indica que, em meio aquoso, a enzima possivelmente vai sofrendo liberação do suporte e, após a liberação, sofre desnaturação.

Levando-se em consideração que o trabalho objetivou ilustrar a aplicação da enzima obtida do isolado fúngico para a produção de biodiesel, a atividade de esterificação também foi analisada com base no consumo de ácido láurico e glicerol para formação de monolaurina. Os resultados revelaram que o valor médio obtido para a atividade de esterificação da lipase do extrato bruto frente ao ácido láurico e glicerol foi de 44,87 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Quando esse mesmo ensaio foi realizado para a enzima imobilizada nas esferas de quitosana/argila, o valor obtido foi de 39,98 $\mu\text{mol}/\text{min}$ demonstrando que o processo de imobilização da lipase do extrato bruto não promoveu modificações significativas na estrutura da enzima de modo a alterar seu perfil de atividade frente à reação de esterificação. A atividade de esterificação também foi analisada frente a diferentes substratos, por meio do qual foi possível verificar que o óleo de soja foi o material que promoveu maior atividade de esterificação da enzima. Outro importante parâmetro analisado, e que faz com que o processo de imobilização seja efetivo, foi a estabilidade operacional. Nesse caso, após cinco ciclos de uso, a atividade enzimática (de hidrólise) relativa foi de 55%. Tais resultados indicam que o processo de imobilização acarretou pouca estabilidade operacional à enzima em questão e ilustram um possível processo de liberação da enzima do suporte.

O óleo de vísceras, citado inicialmente por ser um possível material para ser utilizado na produção de biodiesel, foi caracterizado.

Os resultados revelaram que esse óleo possuiu os seguintes valores: índice de saponificação de 126,423 mg KOH/g, densidade de 0,913 g/mL e índice de acidez de 2,344%. Com base nos resultados apresentados na literatura foi possível observar que os valores dos parâmetros estudados do óleo se assemelham aos valores obtidos para óleos residuais, especialmente devido ao índice de acidez obtido.

Ensaio para obtenção de ésteres etílicos com óleo de vísceras e lipase contida no extrato bruto do isolado fúngico foram conduzidos. Para a realização de um comparativo, o mesmo tipo de ensaio foi realizado com um tipo de óleo e biocatalisador amplamente utilizados na literatura, o óleo de soja e a Novozym 435. Os resultados obtidos revelaram que os ensaios utilizando óleo de soja com a lipase comercial e com a lipase do extrato bruto acarretaram nos maiores valores de conversão em ésteres. Os menores valores foram obtidos com o óleo de vísceras. O comportamento observado pode estar relacionado ao fato deste óleo possuir características diferentes do óleo de soja, tais como presença de fosfolipídeos, sais, íons metálicos e outras substâncias que podem influenciar no rendimento final. Ainda assim, é importante ressaltar que a lipase contida no extrato bruto possui potencial de aplicação para a produção de ésteres etílicos. A otimização das variáveis que influenciam diretamente na reação de transesterificação, tais como teor de água, razão molar álcool-óleo, temperatura, concentração da enzima e adição ou não de co-solventes, deverão ser os futuros passos para a obtenção de melhores resultados para esses sistemas. Também é importante comentar que os dados obtidos para a conversão de ésteres utilizando o óleo de vísceras não são suficientes para descartar a possibilidade do uso deste óleo para a produção de biodiesel, uma vez que os mesmos ensaios de otimização citados anteriormente também são necessários para este caso. Além disso, torna-se importante caracterizar outros parâmetros do óleo de vísceras, pois os teores de cada uma das substâncias presentes na matéria-prima refletirão não somente nas propriedades físico-químicas do biodiesel, mas poderão afetar a queima no motor, estar vinculados à formação de depósitos no sistema de injeção e ainda ao tipo e à quantidade de gases poluentes emitidos.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

A partir do efluente bruto de abatedouro de frango foi possível isolar 19 cepas de fungos filamentosos, que, por sua vez, foram avaliadas em relação à sua atividade lipolítica. Para a realização deste experimento foi necessário testar diferentes métodos de detecção de micro-organismos lipolíticos em meios de cultivo sólidos contidos em placas de Petri. Os resultados obtidos revelaram que o meio mais adequado para a detecção de tais micro-organismos foi o meio que permitiu a visualização de precipitados de laurato de cálcio em tubos de ensaio com meio constituído por cloreto de cálcio e tween 80.

Os isolados fúngicos, denominados como 7 e 17, foram submetidos ao cultivo em meio submerso e sua capacidade de produzir lipase em 4 diferentes meios de cultivo foi analisada. Por produzir os maiores valores de atividade enzimática, atingindo valores de 20,71 U/mL, o isolado 17 foi escolhido para os demais experimentos, com vista à otimização da produção de lipase.

Através do uso do planejamento Plackett e Burman seguido por um planejamento composto central rotacional (CCD), foi possível rastrear os fatores que mais influenciaram na produção de lipase pelo isolado fúngico. Verificou-se que a maior atividade enzimática, de 43,51 U/mL, foi obtida utilizando 3,41% (m/v) de óleo de vísceras e 2,00% (m/v) de tween 80, acrescentados ao meio de cultivo basal.

A otimização da concentração do extrato bruto enzimático proporcionou os melhores valores para atividade enzimática, atividade específica e rendimento através do uso do agente precipitante sulfato de amônio a 40%.

A imobilização do extrato bruto concentrado do isolado fúngico foi efetuada em esferas de quitosana/argila, confeccionadas com solução contendo 1 g de quitosana e 1 g de argila esmectítica ativada. Após 5 horas de contato da solução enzimática com as esferas de quitosana/argila ativadas com solução de glutaraldeído 3% (v/v), verificou-se um rendimento médio de imobilização de 80%. A caracterização da enzima do extrato bruto foi realizada com a mesma na forma livre e imobilizada. Os resultados revelaram que a imobilização permitiu o aumento de vida útil das enzimas frente a diferentes temperaturas, pH(s), solventes, íons metálicos e estocagem. Contudo, não houve ganhos significativos para a estabilidade operacional.

O óleo de vísceras foi caracterizado apresentando índice de

saponificação de 126,423 mg KOH/g, densidade de 0,913 g/mL e índice de acidez de 2,344%. Os valores obtidos se assemelham aos valores obtidos por outros autores para óleos residuais, especialmente devido ao índice de acidez obtido.

Ensaio para obtenção de ésteres etílicos foram realizados com quatro sistemas diferentes: 1) Novozym 435 + óleo de soja + etanol; 2) Extrato bruto + óleo de soja + etanol; 3) Novozym 435 + óleo de vísceras + etanol e 4) Extrato bruto + óleo de vísceras + etanol). Os resultados revelaram que os ensaios utilizando óleo de soja com a lipase comercial e com a lipase do extrato bruto acarretaram nos maiores valores de conversão em ésteres. Dessa forma, a lipase contida no extrato bruto possui potencial de aplicação para a produção de ésteres etílicos e a reação de transesterificação relacionada merece ser melhor estudada especialmente no que tange às variáveis que sabidamente influenciam o processo.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a identificação do isolado fúngico 17, selecionado por sua atividade lipolítica;
- Purificar a lipase produzida pelo isolado fúngico 17 e realizar estudos de caracterização bioquímica e estrutural da enzima purificada;
- Promover a imobilização da lipase produzida em outros suportes para obtenção de maior estabilidade operacional;
- Realizar estudos de otimização para atingir melhores porcentagens de conversão de ésteres variando fatores que sabidamente influenciam no processo, como, por exemplo, teor de água, razão molar álcool-óleo, temperatura, concentração da enzima e adição ou não de co-solventes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4 ED. CHAMPAIGN, USA, A.O.C.S., 1995.

AMORIM, R. V. S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a Film Support for Lipase Immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, p.35-39, 2003.

ANDRETTA, V.; DAMSCHI JUNIOR, L. I.; ONOFRE, S. B.. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases de águas residuárias de laticínios. **Revista de Biologia e Saúde da Unisep**, v. 1, n. 1, p.77-85, 2007.

ANVISA (Ed.). **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. Acesso em: 06 set. 2011.

AQUINO, S. Caracterização da DQO Efluente de Sistemas de Tratamento Biológico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, São Paulo, v.8, p.135-144, 2003.

AVICULTURA INDUSTRIAL (Brasil). **EUA lideram produção de frango**. Disponível em: <http://aviculturabrasileira.org/PortalGessulli/WebSite/Noticias/eua-lideram-producao-de-frango,20110428095057_Y_581,20081118093812_F_643.aspx>. Acesso em: 04 out. 2011.

BARON, Alessandra Machado. **Preparação e Caracterização de Lipases Imobilizadas para Utilização em Biocatálise**. 2008. 154 f. Tese (Doutor) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BAYRAMOGLU, Gülai et al. Covalent immobilization of lipase onto

hydrophobic group incorporated poly (2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix. **Journal of Food Engineering**, v. 52, p.367-374, 2002.

BELFORT, Angela Fernanda. **Combustível verde**: promessa do biodiesel de mamona fracassa no País. Disponível em: <http://www.brasilwiki.com.br/noticia.php?id_noticia=7116>. Acesso em: 05 out. 2011.

BEPPU, Marisa M.; ARRUDA, Eduardo J.; SANTANA, Cesar C.. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros**, N, v. 9, n. 4, p.163-169, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14281999000400027>>. Acesso em: 05 dez. 2011.

BERNARDO, Cláudio (Ed.). Comissões discutem uso de óleo vegetal in natura como combustível. **Agência Senado**, Brasília, p. 1-1. 16 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.senado.gov.br/agencia/verNoticia.aspx?codNoticia=92228&codAplicativo=2>>. Acesso em: 21 jun. 2009.

BERTO, Philippe et al. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. **Fems Microbiology Letters**, v. 180, n. 2, p.183-189, 17 jan. 2006.

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.

BEZERRA, L. P. et al. Efluentes Agroindustriais em Mato Grosso do Sul - características. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS HÍDRICOS DO CENTRO OESTE, 2., 2002, Campo Grande. **Simpósios ABRH**. Campo Grande: Abrh, 2002. p. 1 - 15. Disponível em: <http://www.abrh.org.br/novo/ii_simp_rec_hidric_centro_oeste_campo_grande.php>. Acesso em: 04 set. 2011.

BORMANS, Paul. **Ceramics are more than clay alone**. United

Kingdon: Cambridge International Science Publishing, 2004. 104 p.

BRAGA, L. P.; BRUNO, L. M.; CASTRO, H. F.. Uso e Reutilização da Lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido obtido pela técnica Sol-gel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 2005, Campinas. **Anais VI COBEQ IC**. Campinas: Feq, 2005. p. 1 - 5. Disponível em: <www.feq.unicamp.br/~cobeqic/tBT36.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2011.

BURKERT, Janaina Fernandes de. **Otimização das condições de produção da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y552**. 2003. 187 f. Tese (Doutor) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp using factorial desing. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p.77-84, 2004.

CARVALHO, Patrícia de Oliveira et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, N, v. 26, n. 1, p.75-80, 2003.

CETINUS, S.A., ÖZTOP, H.N. Immobilization of catalase on chitosan film. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 26, p.497-501, 2000.

CHANG, Min-yun; JUANG, Ruey-shin. Stability and catalytic kinetics of acid phosphatase immobilized on composite beads of chitosan and activated clay. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 1, p.1087-1091, 2004.

CHATTERJEE, Sudipta; LEE, Min W.; WOO, Seung H.. Adsorption of congo red by chitosan hydrogel beads impregnated with carbon nanotubes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p.1800-1806, 2010.

CHIBATA, I. **Immobilized enzymes**. New York, Interscience Publishers, 1972.

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

COLEN, Gecenir. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. Disponível em: <www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/.../1/tese_g_colen.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2009.

COSTA JUNIOR, Ezequiel de Souza; MANSUR, Herman Sander. Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/Poli(álcool Vinílico) Reticuladas Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008.

COSTA, Marjorie Carelli. **Produção, Purificação e Caracterização e Lipase de *Aspergillus* sp.** 1996. 127 f. Tese (Doutor) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

COSTA NETO, Pedro R. et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 45, p.531-538, 2000.

CÔTÉ, Amélie; SHARECK, François. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Enzyme and Microbial Technology**, p. 381-388. 12 jan. 2008.

CRUZ, Juan C.; PFROMM, Peter H.; REZAC, Mary E.. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on fumed silica. **Process Biochemistry**, v. 44, p.62-69, 2009.

CRUZ Júnior, Américo. **Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Mamona**. 2007. 122 f. Dissertação

(Mestre) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CRUZ Júnior, Américo et al. Obtenção de ésteres etílicos por transesterificação enzimática em óleos de frituras com Lipase B de *Candida antarctica*. In: I Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2005, São Paulo. **Livro de Resumos**. São Paulo: USP, 2005. p. 23.

DABDOUB, Miguel J.; BRONZEL, João L.; RAMPIN, Márcia A.. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.776-792, 2009.

DANAVATE, Vrushi et al. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, p.3374-3381, 2009.

DE PAOLA, M. G. et al. Factor analysis of transesterification reaction of waste oil for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. , p.5126-5131, 2009.

DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630, 2004.

DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress In Polymer Science**, v. 36, p.981-1014, 2011.

DARTORA, D. F. et al. Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Lipases a partir do Soro de Queijo. In: SINAIFERM, 14., 2003, Florianópolis. **Anais Sinaiferm 2003**. Florianópolis: UFSC, 2003. p. 1 - 6. Disponível em: <www.enq.ufsc.br/eventos/sinaiferm/trabalhos_completos/t165.doc>. Acesso em: 09 set. 2011.

DAVE, Rachna; MADAMWAR, Datta. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA–alginate–boric acid.

Process Biochemistry, v. 41, p.951-955, 2006.

DEMIR, Burcu Saygideger; TUKEL, S. Seyhan. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p.123-128, 2010.

DESAI, P. D.; DAVE, A. M.; DEVI, Surekha. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p.193-199, 2006.

DIZGE, Nadir et al. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100, p.1983-1991, 2009.

DORS, Gisanara. **Etanolise enzimática do óleo de palma visando à produção de biodiesel em sistema contínuo**. 2011. 233 f. Tese (Doutor) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

DURÁN, N. et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p.907-931, 2002.

DURAND, A. et al. Solid state fermentation reactors: From lab scale to pilot plant. **Biotechnology Advances**, v. 11, n. 3, p.591-597, 1993.

EPAGRI - CEPA (Brasil). **Carne de frango - mercado internacional**. Disponível em: <cepa.epagri.sc.gov.br/.../Sintese_2011/Frango%20sintese%202011.pdf>. Acesso em: 04 out. 2011.

ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2004.

ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L.. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, n. 98, p.97-103, 1998.

FABER, Kurt. **Biotransformations in organic chemistry**. New York: Springer-verlag, 1997. 436 p.

FACCIO, Carina. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. 2004. 99 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões, Erechim, 2004.

FELTES, Maria Manuela Camino et al. Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils: Recent Trends, Challenges and Future Perspectives. In: MANZANERA, Maximino. **Alternative Fuel**. Rijeka: Intech Open Access Publisher, 2011. p. 21-46.

FERNANDES J., J.. **Gerenciamento de Efluentes de Abatedouros Avícolas - Estudo de Caso (Super Frango)**. 2006. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2006.

FERRARI, Roseli Aparecida; OLIVEIRA, Vanessa da Silva; SCABIO, Ardalla. Biodiesel de Soja - Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.19-23, 2005.

FERRAZ, Alexandre Machado. **Síntese via enzimática de ésteres com lipases imobilizadas em filmes de dextrana**. 2006. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L.. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. , p.769-777, 2007.

FREIRE, D. M. G. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermentor: effect of carbon and nitrogen, agitation and aeration. **Applied Bacteriology and Biotechnology**, v. 64, n. , p.409-421, 1997.

GHERBAWY, Youssuf; VOIGT, Kerstin (Ed.). **Molecular identification of fungi**. Berlin: Springer-verlag, 2010.

GOLDSTEIN, L., LEVIN, Y., KATCHALSKI, E. A water-insoluble polycationic derivate of Trypsin. II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behavior of the bound Trypsin. **Biochemistry**, v.3, p.1913-1919, 1964.

GOMES, Luis Fernando Souza et al. Biodiesel produzido com óleo de frango. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p.57-62, 2008.

GOMES, F. M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, N, v. 29, n. 4, p.710-718, 2006.

GOMES, Patrícia Menezes; FREIRE, Denise Maria Guimarães. **Processo de Produção de Lipase por *Penicillium restrictum***. Disponível em: <www.gctbio.com.br/documentos/artigos/processo-de-producao.pdf>. Acesso em: 07 out. 2011.

GONÇALVEZ, L.R.B. **Estudo do processo de produção de etanol a partir de amido liquefeito, usando enzima e microrganismo coimobilizados em gel de pectina**. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO. Produção de Esferas de Quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p.30-35, 2004.

GUO, L. D.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y.. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytologist**, n. 147, p.617-630, 2000.

HAMA, Shinji et al. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, N, v. 34,

n. 3, p.273-278, jun. 2007.

HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, S. L.. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, p.597-607, 1975.

HASRUL, M. N. A. S. et al. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Chitosan Beads for Transesterification Reaction. **Asian Network for Scientific Information**, v. 21, n. 10, p.2701-2704, 2010.

HUNG, T. et al. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.26, p.69-78, 2003.

IBGE (Brasil). **Pesquisas Trimestrais do Abate de Animais, do Leite, do Couro e da Produção de ovos de Galinha**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1986&id_pagina=1>. Acesso em: 04 out. 2011.

ILLANES, Andrés (Ed.). **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. Springer Science, 2008. 391 p. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/978-1-4020-8360-0#section=213599&page=8&locus=47>>. Acesso em: 07 mar. 2011.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, three-dimensional structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, Londres, p. 315-351. out. 1999.

JEGANNATHAN, Kenthorai Raman; CHAN, Eng-seng; RAVINDRA, Pogaku. Physical and stability characteristics of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated on k-carrageenan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, p.78-83, 2009.

JIANG, D. et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, New York, v. 25, p.15-23, 2005.

KAIEDA, M. et al. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p.627-631, 1999.

KAMINI, N. R. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry**, v. 36, p.317-324, 2000.

KARRA-CHÂABOUNI, Maha et al. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p.168-177, 2008.

KHARRAT, Nadia et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p.1083-1089, maio 2011.

KLIBANOV, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water ? **Trends in Biochemical Science**, v. 15, p.97-101, 1997.

LACAZ, Carlos da Silva; PORTO, Edward; MARTINS, José Eduardo Costa. **Micologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LEE, K T; A FOGLIA, T. Synthesis, purification e characterization of structured lipids produced from chicken fat. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 10, p.1027-1034, 2000.

LI, Ning; ZONG, Min-hua. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p.43-54, 2010.

LIMA, V. M. G. et al. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, p. 65-71, 2004.

LINKO, Yu-yen et al. Biodegradable products by lipase biocatalysis.

Journal of Biotechnology, v. 66, p.41-50, 1998.

LOCK, Luiza Lux. **Seleção de Leveduras Lipolíticas Isoladas de Bromélias e Produção e Caracterização de Lipase Bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81**. 2007. 125 f. Dissertação (Mestre) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

LOPES, Carolina R. et al. Síntese de novas amidas graxas a partir da aminólise de ésteres metílicos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p.1335-1341, 2010.

LOU, Wen-young; ZONG, Min-hua; DUAN, Zhang-qun. Efficient production of biodiesel from high free fatty acid-containing waste oils using various carbohydrate-derived solid acid catalysts. **Bioresource Technology**, v. 99, p.8752-8758, 2008.

LUNA, F. J.; SCHUCHARDT, U.. Argilas Pilarizadas - Uma introdução. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p.104-109, 1999.

MACEIRAS, R. et al. Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel. **Fuel**, v. 88, p.2130-2134, 2009.

MAGNAN, Rafael Bortoluzzi. **Análise da viabilidade técnica e financeira da substituição do coagulante cloreto férrico por policloreto de alumínio durante o processo físico-químico no tratamento de efluente de abatedouro avícola**. 2010. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2010. Disponível em: <usuarios.upf.br/~engeamb/TCCs/2010-2/RAFAEL%20MAGNAN.pdf>. Acesso em: 04 set. 2011.

MALDANER, Tania Luisa. **Levantamento das alternativas de minimização dos impactos gerados pelos efluentes de abatedouros e frigoríficos**. 2008. 69 f. Monografia (Especialização) - Curso de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Castelo Branco, Brasília, 2008.

MARINI, Analía et al. Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a

solid culture medium with aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 22, p.2135-2141, 15 jul. 2011.

MENDES, Adriano Aguiar et al. Application of lipases for wastewater treatment containing high levels of lipids. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p.296-305, abr. 2005.

MENONCIN, Silvana. **Concentração, Imobilização e Caracterização Parcial de Lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando Fermentação em Estado Sólido**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestre) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões, Erechim, 2007.

MESSIAS, Josana et al. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 45, p.426-431, 2009.

MINOVSKA, V. et al. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **Journal of The Serbian Chemical Society**, v. 70, n. 4, p.609-624, 2005.

MIRANDA, Michele et al. Assessment of the Morphological, Biochemical, and Kinetic Properties for *Candida rugosa* lipase immobilized on hydrous niobium oxide to be used in the Biodiesel synthesis. **Enzyme Research**, p.1-10, 2011.

MIRANDA, O. A. et al. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, v. 69, p.145-147, 1999.

MITTELBAACH, Martin. Lipase Catalysed Alcoholysis of Sunflower Oil. **JAACS**, v. 67, n. 3, p.168-170, 1990.

MORITZ, D. E.; PEREIRA, E. B.; NINOW, J. L.. Avaliação da Produção de Lipase e Pigmento *Monascus* por *Monascus ruber* CCT 3802 Variando a Fonte de Nitrogênio no Meio de Cultivo. In: SINAFERM, 14., 2003, Florianópolis. **Anais Sinaferm 2003**.

Florianópolis: UFSC, 2003. p. 1 - 6. Disponível em:
<www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t392.doc>.
Acesso em: 12 set. 2011.

MORGADO, A. F. **Caracterização e propriedades tecnológicas de uma argila esmectítica de Santa Catarina**. 1998. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da USP, São Paulo.

MORRISON, Robert; BOYD, Robert. **Química Orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

NC-IUBMB (Ed.). **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB): Enzyme Nomenclature. Recommendations**. Disponível em:
<<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html>>.
Acesso em: 09 mar. 2011.

NEWS, Industry. Vegetable oil as diesel fuel? **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Berlin, v. 57, n. 11, p.805-819, nov. 1980.
Disponível em:
<<http://www.springerlink.com/content/g1221531784t5290/>>. Acesso em: 21 jun. 2009.

NGAH, W. S. Wan; FATINATHAN, S. Pb(II) Biosorption using chitosan: Equilibrium, ion exchange and mechanism studies. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 3, p.338-346, 2010.

NOGUEIRA, Luiz A. H.. Does biodiesel make sense? **Energy**, v. 36, n. 6, p.3659-3666, 2011.

OGNJANOVIC, Nevena et al. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, p.5146-5154, 2009.

OLIVEIRA, Débora et al. 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.

OROZCO, S. B.; PEREIRA, D.; KILIKIAN, B. V.. Influência do pH na produção de pigmentos vermelhos e na micromorfologia de *Monascus purpureus* CCT 3802 em cultivo submerso. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 4., 2003,

OTERO et al. General characterization of noncommercial microbial lipases in hydrolytic and synthetic reactions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 120, n. 3, p.209-223, 2005.

OTTOSSON, Jenny. **Enthalpy and Entropy in Enzyme Catalysis - A Study of Lipase Enantioselectivity**. 2001. 59 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Department Of Biotechnology, Royal Institute Of Technology, Stockholm, 2001.

PACHECO, Sabrina Moro Villela; MORGADO, Ayres Ferreira; FURIGO JUNIOR, Agenor. Crescimento Radial de Três Isolados de *Pycnoporus sanguineus* em Resposta a Diferentes Concentrações de Ácido Vanílico e Vanilina. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., 2009, Natal. **CD ROM**. Natal: 2009. p. 1 - 6.

PALLA, Camila A.; PACHECO, Consuelo; CARRÍN, María E.. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, p.199-207, 2011.

PALOMO, José M. et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sephabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 20, n. 19, p.279-286, 2002.

PARENTE, Expedido José de Sá. **Biodiesel: Uma aventura**

tecnológica num país engraçado. Fortaleza: Unigráfica, 2003.

PASTORE, Glaucia M.; COSTA, Vinicius Dos Santos R. da; KOBLITZ, Maria Gabriela B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p.135-140, 2003.

PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F.. Immobilization and Catalytic properties of Lipase on Chitosan for Hydrolysis and Esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 4, p.343-355, 2003.

PINHEIRO, Thaís da Luz Fontoura. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo.** 2006. 120 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões, Erechim, 2006.

PRABHAKAR, A. et al. An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 2, p.10-16, 2005.

RAIMBAULT, M.. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **EJB Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p.1-15, 1998.

RAPP, P.; BACKHAUS, S.. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 11, p.938-943, 1992.

RIFAAT, Hala Mohamed et al. Production, Optimization and Partial Purification of Lipase from *Fusarium Oxysporum*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 5, n. 1, p.70-84, 2010.

Disponível em:

<www.trisanita.org/jases/asespaper2010/ases05v5n1y2010.pdf>. Acesso em: 27 set. 2011.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antonio Francisco.

Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

RODRIGUES, Rafael Costa. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual.** 2009. 183 f. Tese (Doutor) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RODRIGUES, Rafael Costa et al. Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 85, n. , p.925-930, 2008.

ROSA, Clarissa Dalla; OLIVEIRA, Débora de; OLIVEIRA, José Vladimir. The role of organic solvent amount in the lipase-catalyzed biodiesel production. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p.76-78, 2010.

ROSA, Clarissa Dalla. **Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado.** 2009. 136 f. Tese (Doutor) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ROSSET, Isac G. et al. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, p.136-142, 2011.

ROVEDA, Mirela. **Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa.** 2007. 86 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

RUCHI, Gaur; ANSHU, Gupta; KHARE, S. K.. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. **Bioresource Technology**, v. 99, p.4796-4802, 2008.

SAID, Suraid; PIETRO, Rosemeire C. L. R.. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Suma, 2004.

SALIS, Andrea et al. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 3, p.291-299, 2005.

SALOMÃO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F.. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, n. 28, p.116-121, 2008.

SAMAD, Mohd Yusof A. et al. A Plate Assay for Primary Screeninf of Lipase Activity. **Journal of Microbiolohods**, v. 9, p.51-56, 1989.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p.1-18, 2003

SCARASSATI, Deividy et al. Tratamento de Efluentes de Matadouros e Frigoríficos. In: FÓRUM DE CIÊNCIAS CONTÁBEIS, 3., 2003, Rio Claro. **Anais Fórum de Ciências Contábeis**. Rio Claro: Faculdade de Ciências Integradas, 2003. p. 1 - 9. Disponível em:

<http://www.universoambiental.com.br/novo/artigos_ler.php?canal=1&canallocal=1&canalsub2=1&id=3>. Acesso em: 01 abr. 2012.

SCHMIDELL, Willibaldo et al. (Ed.). **Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Florianópolis: Tribo da Ilha, 2007.

SCHOENHALS, M.; SENA, R. F.; JOSÉ, H. J.. Avaliação da eficiência do processo de coagulação / flotação aplicado como tratamento primário de efluentes de abatedouro de frangos. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 3, n. , p.5-24, 2006.

SEBRÃO, D. et al. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres , **Química Nova**, v. 30, n. 5, p.1182-1187, 2007.

SECUNDO, Francesco et al. The lid is a structural and functional

determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 39, p.166-170, 2006.

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

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K.. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. **Biotechnology**, v. 10, n. , p.23-40, 2011.

SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C.; MACRAE, I. C.. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy. **Journal of Microbiology Methods**, v. 6, p.127-137, 1987.

SILVEIRA, Verlande Duarte. **Micologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Ambito Cultural, 1996. 332 p.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação espectrometria de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1994.

SIMÕES, Aline S. et al. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p.33-38, 2011.

SINHA, V. R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p.1-33, 2004.

SILVA, Iara Elisa Cardoso da et al. Fungos Filamentosos Degradadores de Compostos Fenólicos de Águas Residuárias de Postos de Combustíveis. **Revista de Biologia e Saúde da Unisep**, v. 1, n. 1, p.1-8, 2007.

SILVA FILHO, Germano Nunes; OLIVEIRA, Vetúria Lopes de. **Microbiologia Manual de Aulas Práticas**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SISO, M.I.G. et al. Enzyme encapsulation on chitosan microbeads. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 211-216, 1997.

SPILLER, Valéria Reginatto. **Tratamento de esgoto doméstico em lagoas de estabilização com suportes para o desenvolvimento de Perifiton - Biofilme**. 2005. 105 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis, 2005.

SUGIHARA, Akio et al. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Biochemical**, v. 112, p.598-603, 1992.

SUPAKDAMRONGKUL, P.; BHUMIRATANA, A.; WIWAT, C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p.228-235, 2010.

TALUKDER, Md. Mahabubur Rahman et al. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p.106-112, 2009.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p.628-634, 2010.

TANG, Zhen-xing; QING, Jun-qing; SHI, Lu-e. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. **Materials Letters**, v. 61, p.37-40, 2007.

THARANATHAN, R.N; KITTUR, F.S. Chitin-The undisputed biomolecule of Great potential, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.1, p.61-87, 2003.

TASHTOUSH, Ghassan M.; AL-WIDYAN, Mohamed I.; AL-JARRAH, Mohamed M.. Experimental study on evaluation and optimization of conversion of waste animal fat into biodiesel. **Energy Conversion And Management**, v. 45, p.2697-2711, 2004.

TING, W. J. et al. Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p.32-38, 2006.

TONGBORIBOON, Ketsara; CHEIRSILP, Benjamas; H-KITTIKUN, Aran. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p.52-59, 2010.

TZIALLA, A. A. et al. Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of alfa-pinene. **Bioresource Technology**, n. 101, p.1587-1594, 2010.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (Ed.). **RELATÓRIO ANUAL 2010/2011**. São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/frango_maioresprodutores.php>. Acesso em: 03 abr. 2012.

VENDRUSCOLO, Franciolo. **Produção de pigmento vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber* CCT 3802**. 2009. 245 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

VERGER, Robert. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p.32-38, 1997.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p.113-148, 2000.

VILLELA, Sabrina Moro. **Imobilização de Lacase e seu uso na Biotransformação de Efluentes de Indústrias de Papel e Celulose**. 2006. 131 f. Dissertação (Mestre) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

VON SPERLING, Marcos. **Lagoas de estabilização: princípios de tratamento biológico de águas residuárias**. 2. ed. Belo Horizonte: Desa, 2000. 140 p.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T.. Effects of oils-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. , p.30-37, 2008.

WOLSKI, Elisangela et al. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 42, p.1557-1560, 2009.

YONG, Yang et al. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. **Process Biochemistry**, v. 43, p.1179-1185, 2008.

YU, H. W. et al. Effect of salts on activity, stability and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in iso-octane . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 35, p.28-32, 2005.

YU, Mingrui; QIN, Shaowei; TAN, Tianwei. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 42, p.384-391, 2007.

ZERAIK, Ana Elisa et al. Desenvolvimento de um Spot Test para Monitoramento da Atividade da Peroxidase em um Procedimento de Purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p.731-734, 2008.