



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E  
BIOPROCESSOS  
CURSO ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

**ANDERSON STEYNER ROZENDO**

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR FUNGO *ASPERGILLUS sp.* EM FERMENTAÇÃO  
NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO FARELO DE CASCA DE BANANA**

**SUMÉ-PB**

**2016**

**ANDERSON STEYNER ROZENDO**

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR FUNGO *ASPERGILLUS sp.* EM FERMENTAÇÃO  
NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO FARELO DE CASCA DE BANANA**

Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Glauciane Danusa Coelho**

**SUMÉ-PB**

**2016**

R893p Rozendo, Anderson Steyner.

Produção de lipase por fungos *Aspergillus* sp. em fermentação no estado sólido utilizando farelo de casca de banana. / Anderson Steyner Rozendo. - Sumé - PB: [s.n], 2016.

54 f.

Orientador<sup>a</sup>: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glauciane Danusa Coelho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Processamento biotecnológico. 2. Fungos. 3. Casca de bananas. I. Título.

CDU: 602.4 (043.3)

ANDERSON STEYNER ROZENDO

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR FUNGO *ASPERGILLUS sp.* EM FERMENTAÇÃO  
NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO FARELO DE CASCA DE BANANA**

Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

**BANCA EXAMINADORA**



Professora Dr<sup>a</sup>. Glauciane Danusa Coelho  
Orientadora - UAEB/CDSA/UFCG



Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz  
Examinador I - UAEB/CDSA/UFCG



Professora Dr<sup>a</sup>. Lenilde Mérgia Ribeiro Lima  
Examinador II - UAEB/CDSA/UFCG

Aprovado em: 01 de Junho de 2016.

*Não é preciso que a gênese de minha vida tenha sido em teu ventre para que de mim recebas o título de mãe, pois são inúmeras as dádivas que recebi durante minha criação e educação, coisas assim apenas alguém com muito amor no peito poderia oferecer. Tudo isto é mais que suficiente para minha eterna gratidão. Obrigado minha **mãe** (Zezita - in memoriam) pelo amor de filho que sempre recebi de ti.*

**A ti, dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, pelas bênçãos a mim concedidas durante minha jornada de vida.

Aos meus avós Maria José (Zezita) e Antônio Rosendo (Toinho), por terem me criado como um verdadeiro filho, sempre distribuindo carinho, amor, atenção e conselhos quando necessário. Mostraram-me que a vida não é fácil, mas é preciso ter fé e coragem para seguir em frente, buscando acima de tudo a felicidade.

À minha mãe Maria do Socorro, por todo carinho, amor e compreensão em mim depositados e, pelos inúmeros conselhos oferecidos, os quais sempre trago em minha mente.

Às minhas tias Clarice e Sandra, por sempre estarem presentes nos momentos bons e também naqueles que a vida nos oferece para testarmos nossas melhores virtudes. Além de acreditarem imensamente em minhas realizações.

Aos meus primos Júnior e José Luiz, pelas brincadeiras e risadas, mesmo quando eu não estava interessado. E a minha priminha Clara Vitória, pelos momentos de alegria.

Aos meus irmãos Andreza, André e Júnior, pelas boas conversas nos poucos momentos que dispomos, mas que sempre aproveitamos.

À Débora Tavares, por ter me mostrado nos últimos anos o verdadeiro significado de compreensão, amizade, paciência e companheirismo.

Aos meus amigos (irmãos) Arthur, Bartira, Natália e Ozires, que sempre estão mais que presentes em qualquer momento de minha vida, pela imensa paciência que só vocês têm para ouvir meus “intermináveis dramas”.

À “turminha da ruindade” Débora, Fagner, Luana, Ozires, Renato e Thalita, pela amizade e companheirismo que sempre houve entre nós. Nunca esquecerei nossas jornadas intermináveis de estudos e reflexões sobre os dilemas da vida, porque estudar não é tarefa fácil, mas todo o sacrifício é amenizado quando temos amigos ao nosso lado.

Aos meus inestimáveis amigos Jéssika (prima), Rosilândia e Izabela, pelas boas conversas e os muitos cafés e cuscuz.

Ao “quarteto” Alice, Dayse, Danielle e Jayane, pelas ótimas conversas e pelo apoio em minhas causas.

À minha “família Biotec” Bartira, Carla, Daniel, Débora, Edgleiga, Éryka, Fagner, Izabela, Jéssica Fernandes, João Socorro, Lorrany, Luana, Magali, Jéssika, Ozires, Renato, Joanny, Rosilândia, Sendy, Thalita, Vanessa Farias, Vanessa Oliveira, Willian.

Aos meus amigos de muitas jornadas Breno, Edson, Glauco, Hyonara, Jefferson, Messias, Otoniel, Rafaela, Shirley.

Ao Sr. Antônio e meu tio José Maria (Zé), pela acolhida durante meu estágio em João Pessoa. Ainda lembro o sabor das ótimas refeições preparadas por vocês.

Aos meus padrinhos Inácia Dário (Naná) e Jurandy Ferreira (Danda), pelo carinho de filho que sempre recebi.

À Nilma e a Dona Bernadete (*in memoriam*), pela hospitalidade que sempre tive em suas casas.

À Célia Gonçalves e João Marcos, pela amizade e ajuda em alguns momentos do curso.

Aos professores Cecir, Paulo, Humberto, Thais, Jean e Michelle, pelas orientações nos projetos de monitoria e pesquisa que participei.

Aos técnicos Adriano, Paloma, Norma, Osvaldo e Francisco e ao porteiro do laboratório Cristiano.

Aos professores Adriano, Fabiana e Jean, pelas conversas e vários conselhos. Certamente vocês fizeram o papel de amigos, além de professores.

À minha orientadora de TCC Glauciane Danusa Coelho, pela oportunidade a mim concedida de integralizar parte importante de minha vida acadêmica. Guardarei todos os conselhos e ensinamentos que a senhora transmitiu, além do carisma e motivação nos momentos difíceis.

Ao pessoal da biblioteca, que tantas e tantas vezes tiveram paciência com minhas infinitas buscas de livros.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia, pelo apoio nas atividades de pesquisa.

Ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido - Universidade Federal de Campina Grande.

*A todos, deixo os meus mais sinceros agradecimentos, sempre estarão em meu coração, pois “amigo é coisa pra ser guardada do lado esquerdo do peito”.*

*Ninguém nunca vai bater tão forte como a vida. Mas a vida não é sobre quão forte você bate, mas sobre quanta pancada você consegue aquecer e seguir em frente.*

**Sylvester Stallone**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi utilizar o farelo de casca de banana como substrato, para produção de lipase em fermentação no estado sólido (FES) com *Aspergillus sp.*. Para tanto, os experimentos foram conduzidos de acordo com planejamento fatorial  $2^2$ , sendo analisadas as condições iniciais de umidade (40%, 50% e 60%) e temperatura (28°C, 35°C e 42°C). O fungo utilizado foi isolado previamente a partir de efluente da Indústria Laticínio Monteiro, localizada na cidade de Monteiro-PB, tendo sido selecionado para o cultivo por apresentar um Índice Enzimático (IE) de 10,75, caracterizando-o como um bom produtor de lipase. A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de  $10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>. As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 150 mL contendo 10 g de farelo de casca de banana umedecidos com água destilada, adicionando-se óleo de fritura residual em concentração de 1% (m/m) como indutor. Os frascos foram incubados em estufa. O cultivo foi interrompido a cada 24 horas para obtenção do extrato enzimático, que foi realizada com solução tampão fosfato de sódio (50 mM, pH = 7,0), incubação em agitador orbital durante 20 min a 150 rpm e 35 °C. O crescimento micelial do *Aspergillus sp* foi avaliado por observação visual de acordo com o padrão da ASTM (American Society for Testing Materials), Standard Methods G21-90. No processo fermentativo, o Ensaio 01 (umidade 40% e 28°C) apresentou a maior atividade enzimática (666,250 U.mL<sup>-1</sup>) com 96 h de cultivo. O Ensaio 03 (40% de umidade e 42°C) apresentou a segunda maior atividade enzimática (437,250 U.mL<sup>-1</sup>) com 120 h de cultivo. Nos Ensaios 02 (umidade de 60% e 28°C) e 04 (umidade de 60% e 42°C) foram detectadas as atividades mais baixas. As análises estatísticas do planejamento realizado evidenciaram que entre os fatores estudados, a umidade é o fator mais relevante no processo de fermentação semissólida em casca de banana para produção de lipase utilizando o fungo *Aspergillus sp.*

**PALAVRAS-CHAVE:** Atividade Enzimática. Enzimas. Planejamento Experimental. Resíduos Agroindustriais.

## ABSTRACT

The objective of this study was to use the banana peel bran as a substrate for the production of lipase in the solid state fermentation (SSF) with *Aspergillus sp.*. Thus, the experiments were conducted in accordance with factorial design 2<sup>2</sup>, and analyzed the conditions initial moisture (40%, 50% and 60%) and temperature (28°C, 35°C and 42°C). The fungus used was previously isolated from effluent Monteiro Dairy Industry, located in Monteiro-PB, having been selected by presenting a crop enzymatic index (EI) of 10.75, featuring lipase as a good producer. The concentration of spores were used as inoculum for 10<sup>8</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>. Fermentations were conducted in Erlenmeyer flasks of 150 mL containing 10 g of wet banana peel bran with distilled water by adding the residual frying oil at a concentration of 1% (m/m) as an inducer. The bottles were incubated in the greenhouse. Cultivation was interrupted every 24 hours to obtain the enzyme extract, which was done with sodium phosphate buffer (50 mM, pH = 7.0) incubation in an orbital shaker for 20 min at 150 rpm and 35°C. The mycelial growth of *Aspergillus* was evaluated by visual observation according to the standard of ASTM (American Society for Testing Materials) Standard Methods G21-90. In the fermentation process, the test 01 (40% humidity and 28°C) showed the highest enzyme activity (666.250 U.mL<sup>-1</sup>) with 96 h of cultivation. The test 03 (40% humidity and 42°C) had the second highest enzyme activity (437.250 U.mL<sup>-1</sup>) with 120 h of cultivation. In 02 tests (60% humidity and 28°C) and 04 (60% humidity and 42°C) lower activities were detected. Analyses conducted planning statistics revealed that between the factors studied, moisture is the most important factor in semisolid fermentation process in banana peel for lipase production using the fungus *Aspergillus sp.*

**KEYWORDS:** Enzymatic Activity. Enzymes. Experimental Planning. Agroindustrial Waste.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação sequencial da atuação de lipase sobre triacilglicerol. ....	16
Figura 2 - Reações catalisadas por lipase. ....	17
Figura 3 - Estrutura tridimensional da lipase de <i>Mucor miehei</i> .....	18
Figura 4 - Mecanismo catalítico da lipase .....	19
Figura 5 - Placa de Petri com o microrganismo <i>Aspergillus sp.</i> , após 120 horas em BOD a 30°C .....	28
Figura 6 - Cascas de banana seca (a) e trituradas para uso como substrato na FES (b). ....	29
Figura 7 - Fermentação semissólida do farelo da casca de banana em frascos de Erlenmeyer	29
Figura 8 - Etapas do processo de extração das enzimas lipases .....	30
Figura 9 - Etapas do processo de determinação da atividade enzimática.....	32
Figura 10 - Perfil cinético do processo fermentativo do Ensaio 01 para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 40% e temperatura 28 °C.....	35
Figura 11 - Perfil cinético do processo fermentativo do Ensaio 02 para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 60% e temperatura 28 °C.....	36
Figura 12 - Perfil cinético do processo fermentativo do Ensaio 03 para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 40% e temperatura 42 °C.....	37
Figura 13 - Perfil cinético do processo fermentativo do Ensaio 04 para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 60% e temperatura 42 °C.....	38
Figura 14 - Perfil cinético do processo fermentativo da triplicata no ponto central para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 50% e temperatura 35 °C. ....	39
Figura 15 - Perfil de atividade enzimática de todos os ensaios do planejamento fatorial.....	40
Figura 16 - Diagrama de Pareto para as variáveis independentes umidade e temperatura na resposta atividade enzimática. ....	43
Figura 17 - Superfície de resposta (a) e curvas de nível (b) da variável dependente atividade enzimática em função das variáveis umidade e temperatura.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de nutrientes da casca de banana <i>in natura</i> .....	26
Tabela 2 - Composição do meio de cultura de aveia.....	27
Tabela 3 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial.....	33
Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com três repetições no ponto central .....	33
Tabela 5 - Análise qualitativa do crescimento microbiano de <i>Aspergillus sp.</i> , em cultivo de 120 h para produção de lipase. ....	34
Tabela 6 - Atividade enzimática máxima em cada um dos ensaios do planejamento fatorial. ....	41
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para atividade enzimática. ....	42

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

atm	Atmosfera
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
EC	<i>Enzyme Commission Numbers</i>
FES	Fermentação em Estado Sólido
FMS	Fermentação em Meio Sólido
FSS	Fermentação Semissólida
g	Grama
h	Hora
IE	Índice Enzimático
Kcal	Quilocaloria
kDa	Quilo Daltons
LAT	Laticínio
m	Massa
M	Mol
mg	Miligrama
mi	Massa inicial
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
NaOH	Hidróxido de sódio
PB	Paraíba
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação Por Minuto
sp	Espécie Indeterminada
T	Temperatura
t	Tempo
U <sub>B.U.</sub>	Umidade em Base Úmida
U	Unidade de Atividade Enzimática
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>16</b>
3.1 LIPASES .....	16
<b>3.1.1 Estrutura e mecanismo de ação.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2 Microrganismos produtores de lipase .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3 Aplicações das lipases.....</b>	<b>21</b>
3.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) .....	23
<b>3.2.1 Conceito .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2 Características da FES.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.3 Substrato (suporte).....</b>	<b>25</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES.....	27
4.2 MICRORGANISMO.....	27
<b>4.2.1 Reativação do microrganismo .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.2 Preparo do inóculo .....</b>	<b>28</b>
4.3 PRODUÇÃO DE LIPASES .....	28
<b>4.3.1 Preparo do substrato .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.2 Fermentação.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3.3 Avaliação qualitativa do crescimento microbiano.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.4 Extração das enzimas .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.5 Determinação do teor de umidade .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3.6 Determinação do pH.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3.7 Determinação da atividade enzimática.....</b>	<b>31</b>
4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são moléculas orgânicas produzidas por sistemas vivos com a função específica de catalisar reações químicas, ou seja, aumentam a velocidade com a qual a reação atinja o equilíbrio. As lipases são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos, gerando glicerol e ácidos graxos e, em baixas concentrações de água podem catalisar a reação reversa de síntese de ésteres por esterificação e transesterificação. De modo geral, as lipases não necessitam de cofatores, atuam em ampla faixa de pH, possuem estabilidade a altas temperaturas e alta especificidade (MACEDO *et al.*, 2009; MESSIAS *et al.*, 2011; VARGAS, 2004).

A utilização desta enzima é verificada na indústria de detergentes, na indústria de celulose e papel, nos processos de tratamento de resíduos com a remoção de lipídios de efluentes, na produção de biodiesel, na indústria de fármacos e química fina, além do uso na manufatura de alimentos, dentre outras aplicações (KOBLOITZ, 2003; PASTORE; COSTA; VARGAS, 2004; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

O interesse na produção comercial de lipases está relacionado ao potencial biotecnológico desta enzima, atrelada à tecnologia enzimática que é uma ferramenta promissora para a síntese de compostos de alto valor agregado, entretanto, em muitos casos os altos custos de produção são o fator limitante ao uso de enzimas (FERNANDES, 2007). Neste sentido, a fermentação em estado sólido (FES) pode ser apontada como alternativa a tal problema, em virtude do uso de substratos, muitas vezes de baixo custo, como os resíduos agroindustriais.

Portanto, a proposta deste trabalho é a produção de lipase em fermentação semissólida a partir de farelo de casca de banana utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus sp.*, que em trabalho realizado anteriormente no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, apresentou-se como bom produtor de lipase, com índice enzimático de 10,75 e está armazenado na Coleção de Fungos do CDSA/UFCG.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral realizar a produção de lipase pelo fungo *Aspergillus sp.* por fermentação em estado sólido (FES), tendo como substrato o farelo da casca de banana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar o potencial do uso da casca de banana (*Musa sp*) em fermentação semissólida na produção de lipase;
2. Verificar qualitativamente o crescimento microbiano;
3. Avaliar, utilizando a metodologia de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta, o efeito da umidade e da temperatura de cultivo, bem como da interação entre estes fatores na produção de lipase.

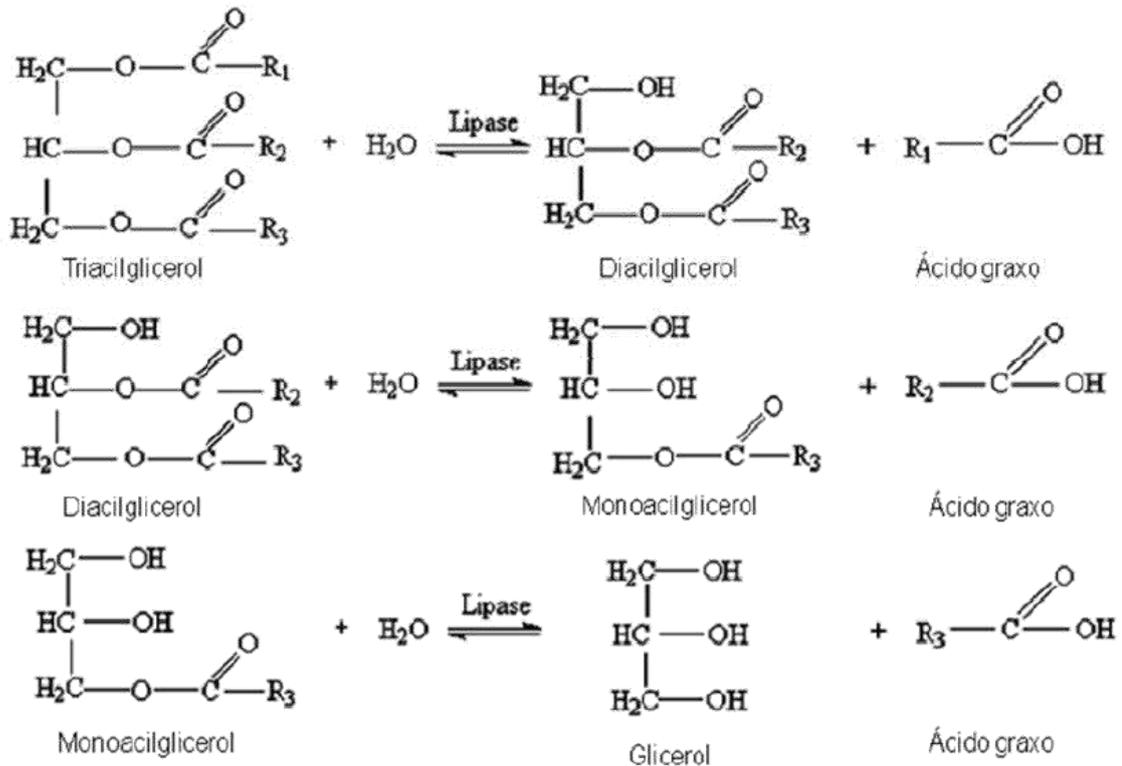
### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 LIPASES

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas presentes em acilgliceróis para liberar ácidos graxos e glicerol (GHORI; IQBAL; HAMEED, 2011). Em ambientes com restrição de água, as lipases também são capazes de catalisar a reação reversa, como a formação de ligações éster, a partir de álcool e um ácido carboxílico (MENDES, 2009).

Os substratos mais comuns das lipases são os triacilgliceróis de cadeia longa (com mais de 10 átomos de carbono) que, quando hidrolisados resultam na formação de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol, conforme ilustra a Figura 1 (SILVA, 2014).

Figura 1 - Reação sequencial da atuação de lipase sobre triacilglicerol.



Fonte: DEREWENDA, 1994.

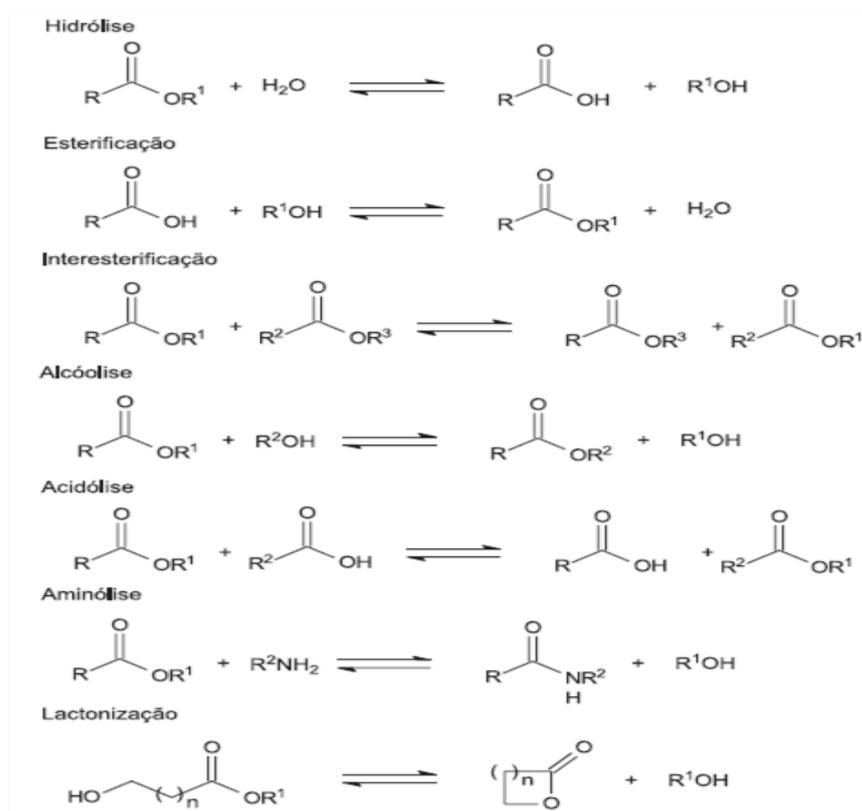
As lipases apresentam um modo de ação semelhante ao das esterases, porém sua atividade é aumentada quando situada na interface polar/apolar (VARGAS, 2004). As esterases são enzimas que apresentam a capacidade de realizar a catálise em acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos (MESSIAS *et al.*, 2009).

As lipases geralmente não requerem cofatores, atuando em uma ampla faixa de pH (que pode ir desde o ácido até o básico), apresentam maior estabilidade em temperaturas relativamente altas, além de possuírem elevada especificidade e propriedades de regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (BANERJEE, 2001; CORADI, 2012; MESSIAS *et al.*, 2011; SHARMA; CHISTI; VARGAS, 2004). Apesar de lipases de fontes distintas apresentarem a mesma função, o desempenho sob as mesmas condições de atuação pode ser difícil de ser alcançado (BRUNO, 2003).

As lipases podem também catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), bem como aminólise (síntese de amidas) e lactonização (LIMA, 2012).

As reações de esterificação resultam, como ilustrado na Figura 2, na formação de ésteres a partir de ácidos graxos e álcool e a liberação de água.

Figura 2 - Reações catalisadas por lipase.



Fonte: PAQUES; MACEDO, 2006.

O processo consiste na substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcoila (-OR). Tais processos são importantes na produção de ésteres de interesse comercial (BARCZA; CARDOSO, 2008).

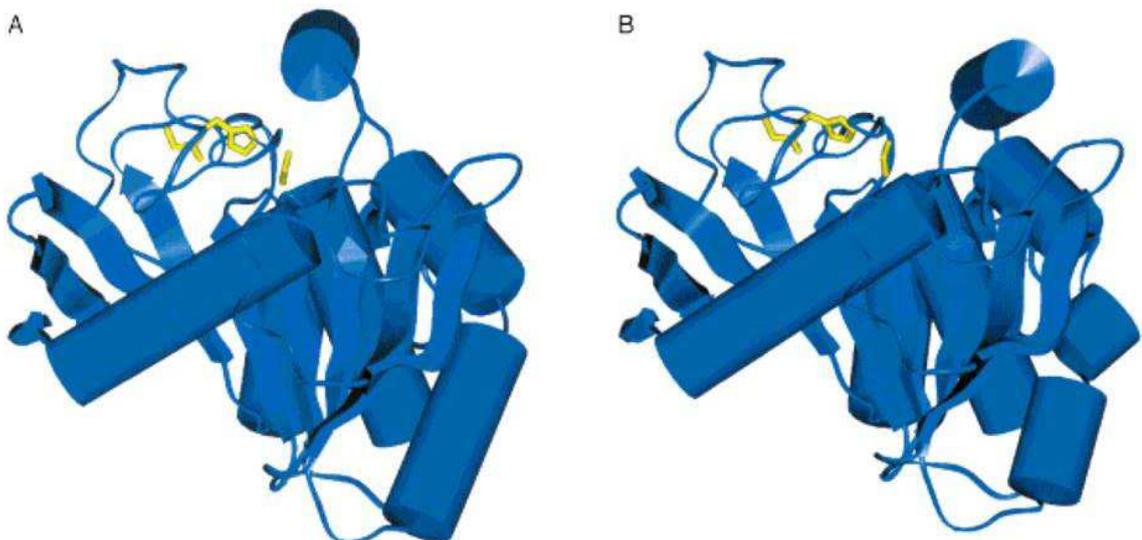
As reações de transesterificações compreendem uma classe de reações orgânicas em que um éster é transformado em outro. Quando um triacilglicerídeo reage com um álcool, em presença de catalisador básico ou ácido, gerando ésteres alquílicos e glicerol o processo é denominado alcoólise (ALVES, 2012; GERIS *et al.*, 2007). Quando a transesterificação parte a partir da troca de grupo acila entre ésteres e outros ésteres, denomina-se interesterificação e entre ésteres e ácidos é chamada acidólise (SOUZA, 2010).

Outras reações que podem ser promovidas por catálise enzimática de lipases são a aminólise, que trata da formação de amidas a partir de ésteres e, a lactonização para geração de lactonas.

### 3.1.1 Estrutura e mecanismo de ação

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 e 75 kDa e, são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente (MELO, 2012). As lipases possuem um núcleo constituído por uma folha  $\beta$  pregueada formada por oito segmentos  $\beta$ ( $\beta$ 1- $\beta$ 8), interligadas por seis  $\alpha$ -hélices (A-F) (JAEGER; REETZ, 1998). A estrutura tridimensional da lipase de *Mucor miehei* está representada na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura tridimensional da lipase de *Mucor miehei*

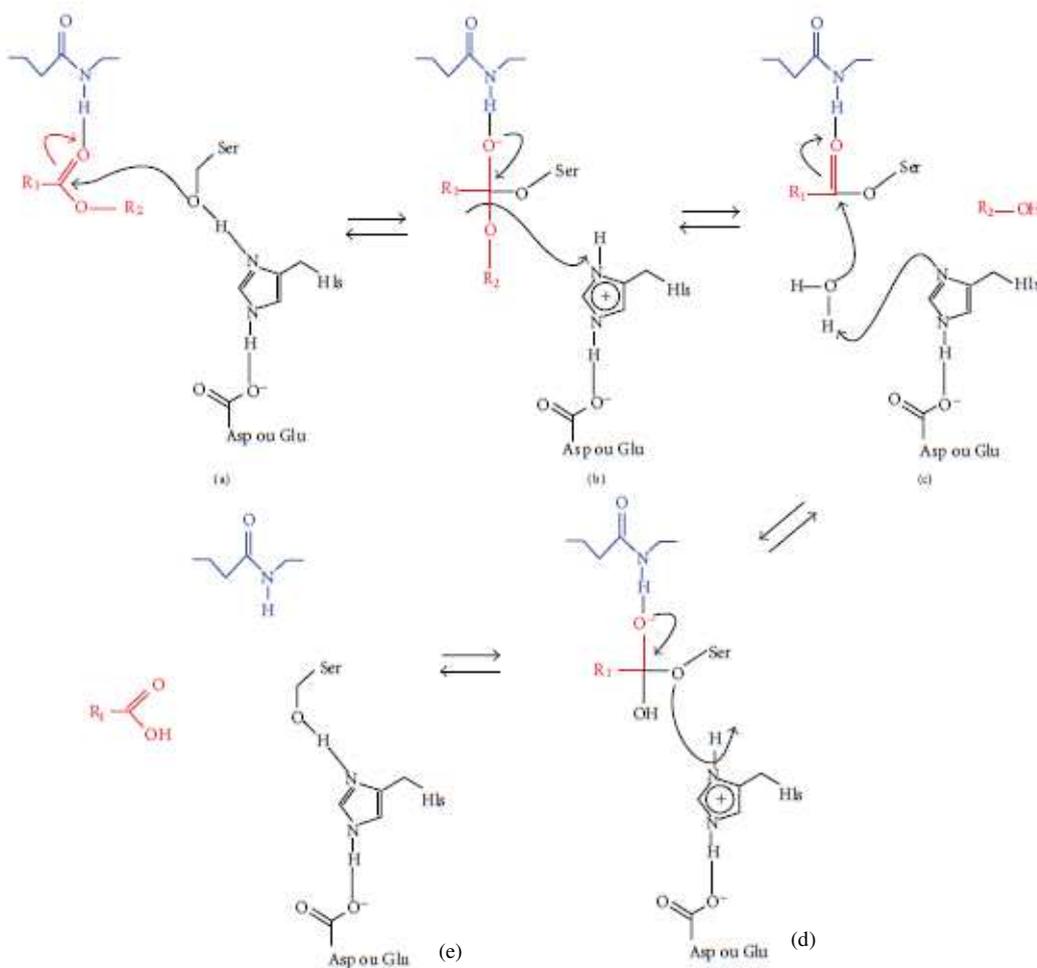


Estrutura da lipase na forma fechada (A) e na forma aberta (B) visualizada lateralmente. Tríade catalítica em amarelo e as estruturas secundárias em azul (SCHMID; VERGER, 1998).

Nas lipases, de modo geral, o acesso ao sítio ativo é controlado por uma estrutura helicoidal de oligo-peptídeo hidrofóbico chamada de “tampa” que é responsável por recobrir o centro ativo da enzima, deixando-o inacessível ao substrato (CORTÁS, 2008; MELO, 2012). A ativação interfacial pode ser entendida como uma mudança conformacional da “tampa” quando em contato com uma interface água/lipídio, o que resultaria no deslocamento da estrutura e a exposição do sítio ativo ao substrato (SCHMID; VERGER, 1998).

As lipases apresentam em sua constituição elevadas concentrações de aminoácidos hidrofóbicos, permitindo sua interação com substratos hidrofóbicos. Todavia, o caráter hidrofóbico das lipases está associado à posição dos aminoácidos na estrutura terciária (SILVA, 2014). O mecanismo catalítico das lipases é apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Mecanismo catalítico da lipase



Mecanismo da reação de hidrólise de lipases. (a) ataque nucleofílico da hidroxila da serina ao carbono suscetível da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil-enzima e ataque nucleofílico da água; (d) intermediário tetraédrico; (e) enzima livre (ALMEIDA, 2005).

Inicialmente a histidina aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio catalítico (CORTÁS, 2008). A hidrólise do substrato inicia-se com o ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico da ligação éster pelo oxigênio da serina do sítio catalítico (BRUNO, 2003), resultando na formação de um intermediário tetraédrico que é estabilizado pelos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio dos resíduos da cadeia principal. É formado um complexo acil-enzima, seguido da liberação de uma molécula de álcool. Num segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila da água, o complexo acil-enzima é hidrolisado, libertando o ácido graxo e a lipase regenerada (JAEGER; REETZ, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Segundo Volpato (2009) as propriedades catalíticas das lipases podem ser facilmente modeladas pelas condições de reações e pequenas variações na estrutura da enzima podem causar significativas mudanças em suas propriedades.

### 3.1.2 Microrganismos produtores de lipase

A demanda industrial por novas fontes de lipases estimula o isolamento e a seleção de novas linhagens de microrganismos produtores de lipase (TREICHEL *et al.*, 2010). Enzimas de origem microbianas são preferíveis para aplicações industriais em virtude dos menores tempos de geração para produção, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade (REINEHR *et al.*, 2014).

Microrganismos produtores de lipase podem ser encontrados em diferentes ambientes industriais, tais como resíduos vegetais, fábricas de processamento de petróleo, fábricas de produtos lácteos, e do solo contaminado com óleo e oleaginosas, entre outros (PANDEY, 2003).

Algumas das lipases mais comercializadas são obtidas por fungos filamentosos, em especial, dos gêneros *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Geotrichum sp.* (TREICHEL *et al.*, 2010). Apesar da utilização de fungos filamentosos, a produção das enzimas varia de acordo com o meio de cultura, pH, substrato e temperatura, sendo assim, distintos fungos do mesmo gênero poderão produzir lipases também distintas.

Na FES o fungo filamento penetra nos espaços inter-granulares e intra-granulares por meios físicos ou enzimáticos, com a fixação das hifas na parte superficial do substrato e ramificação na parede celular do substrato (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

Certas espécies do gênero *Aspergillus* são bastante promissoras na produção de lipases em fermentação em estado sólido (SANTOS *et al.*, 2014), além de grande importância

econômica em decorrência das suas propriedades bioquímicas de produzir enzimas com vasta aplicação, desde a indústria cervejeira e de panificação até a indústria de química fina (CHALFOUN; BATISTA, 2003).

Os fungos do gênero *Aspergillus* compreendem cerca de mais de 260 espécies e, são anamorfos de ascomicetos, sendo caracterizados pela produção de esporos assexuais. No referente à morfologia desde gênero, existe uma gama de variação na coloração das colônias, o que contribui na caracterização macroscópica. As colorações podem assumir os tons azuis, verde, pretos e cinzas (MONTEIRO, 2012). As colônias têm crescimento rápido, sendo compostas por micélio aéreo com conidióforos eretos, com intensa distribuição sobre a superfície (AMORIN, 2011).

Fungos do gênero *Aspergillus* são comumente encontrados em regiões de clima tropical, além de serem sapróbios, ou seja, encontrados onde existe matéria orgânica a ser decomposta (MAIA, 2014). São encontrados em vários habitats como em animais, vegetais, em efluentes e superfícies.

### **3.1.3 Aplicações das lipases**

A aplicação das lipases é bastante ampla, sendo estas utilizadas no tratamento de óleos e gorduras, indústria de detergentes, processamento de alimentos, formulação de produtos farmacêuticos, tratamento ambiental, processamento de papel e celulose, dentre outros processos (HASAN, 2006; SHARM; CHISTI; BANERJEE, 200).

Na indústria de detergentes, tanto os de uso doméstico quanto os de uso industrial, as lipases são utilizadas pela sua capacidade de degradação de resíduos orgânicos. Estima-se que aproximadamente 1000 toneladas de lipases são adicionadas em cerca de 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos a cada ano (TOMBINI, 2015). Devida às amplas faixas de pH e temperatura nas quais estas enzimas atuam, tendem a suportar condições severas no processo de lavagem (SHARM; CHISTI; BANERJEE, 2001), bem como permanecerem estáveis na presença de surfactantes e outras enzimas (DELGADO, 2014), o que resulta em estudos para verificar as melhores condições para a aplicação das lipases em detergente na remoção de resíduos gordurosos (JURADO *et al.*, 2011).

Na indústria de alimentos, as lipases são utilizadas na modificação de ácidos graxos visando obter aromas e sabores desejados. Isto é possível porque as propriedades dos triglicerídeos são influenciadas por características como o tamanho da cadeia dos ácidos graxos, seu grau de saturação e a posição da cadeia no glicerol (SHARM; CHISTI;

BANERJEE, 2001). A maioria das lipases comerciais produzidas é utilizada para o aprimoramento de sabor em produtos lácteos e no processamento de outros alimentos, tais como carne, legumes e frutas (ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007). Muitas são as aplicações destas enzimas na indústria de alimentos, como ocorre com a maturação do queijo e a melhoria do sabor (VERMA; THAKUR; BHATT, 2012), uso em produtos de confeitaria e panificação (DELGADO, 2014) e produção de bioaromas de embutidos de carne (SIMIQUELI; QUADROS; PASTORE, 2006).

As lipases também podem ser utilizadas como ferramentas na realização de diagnósticos, bem como marcadores na área médica, além de auxiliar na aferição dos níveis de atividade de lipase sérica (HASAN, 2006). Na indústria médica, as lipases ainda podem ser utilizadas na síntese de medicamentos, como acontece na prevenção de problemas digestivos.

Na área ambiental, as lipases podem ser utilizadas no tratamento de efluentes ricos em lipídios, como os derivados de matadouros, avícolas e laticínios. Os elevados níveis de lipídios nos efluentes apresentam desvantagens tais como, aumento no tempo de retenção hidráulica nas lagoas de estabilização e formação de lodos com diferentes características (MENDES; CASTRO, 2005).

No referente aos efluentes de laticínios, diversos estudos têm sido realizados visando melhores condições de aplicabilidade das lipases na redução das cargas de lipídios. Mendes *et al.* (2006), avaliaram o efeito do pré-tratamento por lipase pancreática na remoção de matéria orgânica e formação de metano por biodegradação anaeróbia. Outras pesquisas relacionadas à otimização da produção de lipases, bem como o uso em efluentes agroindústrias vêm sendo realizadas (BUENO *et al.*, 2015; CAMMAROTA; GUTARRA, 2015; ROECKER; SERPA, 2015;).

Na indústria de papel e celulose, Sharm *et al.* (2001), indicam que componentes de materiais resinosos como os triglicerídeos, são responsáveis por problemas no processo de extração. A adição de lipases pode facilitar a hidrólise dos triglicerídeos, promovendo a liberação dos ácidos graxos. O uso de enzimas é visto como uma melhoria no processamento de papel e celulose, resultando em pesquisas que buscam enzimas mais resistentes a condições alcalinas e de altas temperaturas (DEMUNER; JUNIOR; ANTUNES, 2011).

## 3.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

### 3.2.1 Conceito

O termo fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semissólida (FSS), ou fermentação em meio sólido (FMS) é aplicado ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos com reduzida quantidade de água livre (ROCHA, 2010). Este tipo de fermentação é utilizado há bastante tempo, principalmente no Oriente, para produção de produtos com importância comercial (CRUZ *et al.*, 2011).

### 3.2.2 Características da FES

Na FES uma das principais características é o uso de substratos com baixa atividade de água, o que proporciona condições de crescimento do microrganismo semelhante ao habitat natural, isto resulta na facilidade do fungo em crescer no substrato e, conseqüente produção de enzimas (ROCHA, 2010).

Neste tipo de fermentação, o suporte utilizado é formado por substratos em estado sólido, com um determinado teor de umidade, sendo esta uma variável de grande importância ao longo do processo, uma vez que a água é fator limitante (PONTES, 2009). Os substratos utilizados são em maioria produtos agrícolas que podem apresentar os nutrientes necessários à nutrição nos microrganismos. Em vista disso, o tratamento torna-se relativamente simples, podendo compreender apenas um cozimento ou moagem das partículas (JÚNIOR, 2014).

Alguns parâmetros influenciam a fermentação semissólida, tais como: umidade, temperatura, pH, granulometria das partículas e concentração de inóculo. O controle e acompanhamento destas variáveis ao longo do processo são essenciais para obtenção de bons rendimentos dos produtos de interesse (PANDEY, 2003).

O teor de umidade do substrato é um dos fatores mais importantes na FES. A determinação do teor de umidade adequado varia de acordo com o tipo de substrato, o microrganismo e o produto desejado. Um substrato com o teor de umidade adequado deve apresentar um filme superficial de água que possa facilitar a dissolução e transferência de nutrientes e de oxigênio. A difusão de gases e dissipação de calor deve ser alcançada pelos canais existentes entre as partículas. Portanto, em elevados teores de umidade poderá acontecer o decréscimo de porosidade, resultando em menor difusão de oxigênio no interior

do suporte, além de aumentar o risco de contaminação. Enquanto que, se os níveis forem muito baixos, haverá dificuldade na difusão de nutrientes, resultando na diminuição do crescimento microbiano (DEL BIANCHI *et al.*, 2001; PANDEY, 1999).

Durante o processo fermentativo, o crescimento microbiano gera calor e, este deverá ser dissipado, uma vez que altas temperaturas afetam o crescimento dos microrganismos e produção dos produtos de interesse. Para a dissipação do calor gerado, ar comprimido pode ser injetado no meio de cultura com o controle da temperatura do equipamento (ALCÂNTARA, 2008).

Em decorrência da estrutura heterogênea do substrato utilizado, o controle do pH torna-se complicado durante o processo. Uma solução para este problema é o uso de soluções-tampão na umidificação do substrato ou uso de substratos com boa capacidade tamponante (JUNIOR, 2014).

A granulometria das partículas usadas na FES é uma característica física muito importante, uma vez que estas partículas poderão servir tanto como suporte à fermentação quanto como substrato nutricional ao microrganismo. O tamanho das partículas está relacionado com a área superficial, a porosidade e o volume no leito. Sendo assim, o tamanho das partículas deverá ser adequado ao acesso por parte dos microrganismos aos nutrientes, bem como permitir a difusão de oxigênio (DEL BIANCHI *et al.*, 2001; PANDEY *et al.*, 1999; SILVA, 2014).

A concentração inicial do inóculo é fator importante no crescimento do microrganismo. Uma concentração baixa de esporos pode resultar em pouca formação de biomassa, além da possível geração de contaminantes. Entretanto, um inóculo com grande concentração de esporos pode resultar num grande crescimento de biomassa, limitando os nutrientes disponíveis (AMORIN, 2011).

A fermentação em estado sólido apresenta uma série de vantagens operacionais em relação ao processo submerso: possibilidade de usar exclusivamente resíduos agroindustriais como meio de cultivo, implicando na redução de custo do processo e no reaproveitamento dos resíduos antes descartados; condições semelhantes ao habitat natural dos microrganismos; aceleração na taxa de reação em virtude do contato direto entre o microrganismo e o substrato; facilidade no preparo do meio de cultura; reduzido risco de contaminação, em virtude da baixa umidade; possibilidade de obtenção de produtos mais concentrados e de fácil recuperação; uso de menor volume reacional do reator; os equipamentos empregados são de simples operação (DEL BIANCHI *et al.*, 2001; PARIS, 2008; SILVA, 2014).

### 3.2.3 Substrato (suporte)

O Brasil como país de economia agrícola forte é responsável pela produção de várias culturas que, após seu processamento e/ou consumo têm seus resíduos descartados. Nos últimos anos tem crescido o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, gerados tanto no setor industrial quanto nos resíduos domésticos (FEDERIZZI *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2006).

Estes resíduos, em virtude das tecnologias de bioprocessos disponíveis atualmente, podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos para obtenção de produtos de valor agregado, como enzimas. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (AMORIM *et al.*, 2012).

Uma alternativa para a recuperação e aproveitamento de resíduos agrícolas é o uso do farelo da casca de banana como substrato na FES. A importância da banana se mostra principalmente pelo consumo, uma vez que é a fruta fresca mais consumida no mundo. O Brasil é o quarto produtor mundial de banana, com produção de 7,1 milhões de toneladas de bananas que são quase que totalmente destinadas ao mercado interno (LIMA; SILVA; FERREIRA, 2012).

O Nordeste é a principal região produtora de bananas do país (SENA, 2011) e o Estado da Paraíba é o quarto produtor de banana da Região Nordeste, contribuindo com 9,8% da produção regional e, 3,8% da produção nacional (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A casca de banana, a qual é seca e triturada para obtenção do farelo, representa de 47 a 50% do peso total da fruta madura (BERTO *et al.*, 2015). A Tabela 1, apresenta a composição centesimal e de nutrientes da casca de banana (*Musa sp*), podendo-se verificar altos teores de cálcio, sódio e potássio.

Tabela 1 - Teor de nutrientes da casca de banana *in natura*

<b>Parâmetro</b>	<b>Valores</b>
Umidade (g)	89,47
Cinzas (g)	0,95
Lipídios (g)	0,99
Proteínas (g)	1,69
Fibras (g)	1,99
Carboidratos (g)	4,91
Calorias (Kcal)	35,30
Cálcio (mg)	66,71
Ferro (mg)	1,26
Sódio (mg)	54,27
Magnésio (mg)	29,96
Zinco (mg)	1,00
Cobre (mg)	0,10
Potássio (mg)	300,92

Fonte: Adaptado de (GONDIM *et al.*, 2005)

Apesar de alguns estudos (BAIG *et al.*, 2004; KARMANI *et al.*, 2011; SHAFIQUE *et al.*, 2004) utilizarem a banana como fonte de substrato na FES, a literatura deixa a desejar sobre o uso da banana e/ou partes dela para a produção de lipases. Dessa forma, torna-se válida a realização de trabalhos que avaliem a eficiência dessa fonte de nutrientes para a produção de enzimas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Câmpus Sumé – Paraíba.

### 4.2 MICRORGANISMO

Para a realização das atividades foi utilizado o fungo filamentosso *Aspergillus sp.* armazenado na Coleção de Fungos do CDSA/UFCG. O fungo foi isolado a partir de efluente da Indústria Laticínio Monteiro, localizada na cidade de Monteiro-PB e por esse motivo foi denominado LAT 01. O microrganismo foi selecionado por apresentar um Índice Enzimático (IE) de 10,75 em meio sólido, o que o caracteriza como um bom produtor de lipase. A conservação do microrganismo foi realizada em frascos tipo *eppendorf*, contendo água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939), mantidos em temperatura ambiente.

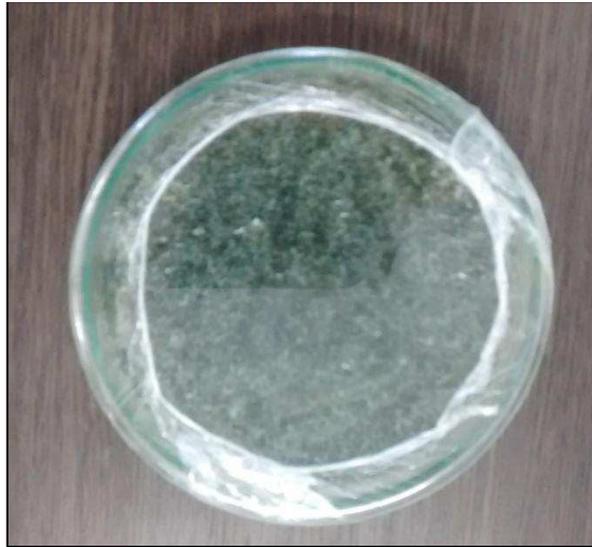
#### 4.2.1 Reativação do microrganismo

A partir do estoque contendo o fungo *Aspergillus sp.* (LAT 01), foi realizada a reativação. Para isso, uma alíquota da suspensão de esporos do *eppendorf* foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura de aveia, Tabela 2. As placas foram incubadas em *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) a 30°C até preenchimento das placas (Figura 5).

Tabela 2 - Composição do meio de cultura de aveia

COMPONENTE	QUANTIDADE
Ágar	20 g
Farinha de aveia	20 g
Água destilada	1 L

Figura 5 - Placa de Petri com o microrganismo *Aspergillus sp.*, após 120 horas em BOD a 30°C



Fonte: Próprio autor, 2016.

#### 4.2.2 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, os conídios foram suspensos em água destilada e filtrados em algodão e gaze para remover segmentos de hifas. A suspensão obtida foi ajustada para a concentração de  $10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$  esporos. A realização da quantificação de esporos contidas na suspensão foi realizada em câmara de Neubauer. Foi utilizado 1,0 mL dessa suspensão para inocular o substrato contido nos frascos de Erlenmeyer.

### 4.3 PRODUÇÃO DE LIPASES

#### 4.3.1 Preparo do substrato

O resíduo utilizado como suporte para o desenvolvimento do microrganismo na FES foi o farelo de casca de banana (*Musa spp.*). Para a preparação do substrato, as cascas de banana foram cortadas manualmente com auxílio de uma faca, de modo a facilitar as etapas posteriores de secagem e trituração, conforme é apresentada na Figura 6. Os fragmentos das cascas foram secos em secador solar artesanal, até massa constante e, posteriormente triturados em liquidificador. O farelo obtido permaneceu armazenado em recipiente fechado até a utilização.

Figura 6 - Cascas de banana seca (a) e trituradas para uso como substrato na FES (b).



Fonte: Próprio autor, 2016.

#### 4.3.2 Fermentação

As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 150 mL contendo 10 g de farelo de casca de banana umedecidos com água destilada, conforme a Figura 7. A umidade, bem como a temperatura de incubação foram ajustadas conforme o planejamento fatorial apresentado na Tabela 4. O óleo de fritura residual, utilizado como indutor, adicionado ao substrato em concentração de 1% (m/m). Os frascos foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm, por 40 minutos. Após o resfriamento, o substrato foi inoculado com 1 mL da suspensão de esporos na [concentração] de  $10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>. O cultivo foi interrompido a cada 24 horas para extração das enzimas e avaliação das variáveis pH e atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Figura 7 - Fermentação semissólida do farelo da casca de banana em frascos de Erlenmeyer



Fonte: Próprio autor, 2016.

### 4.3.3 Avaliação qualitativa do crescimento microbiano

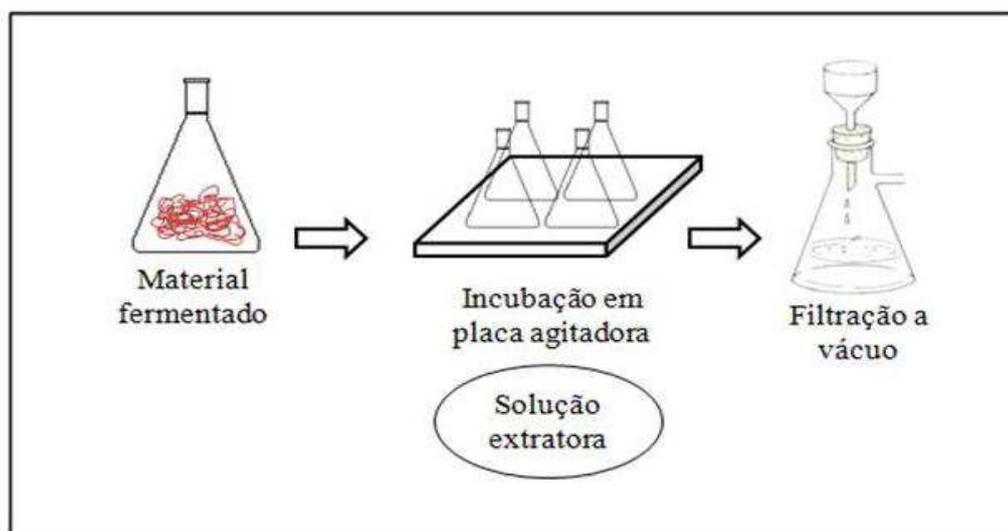
A análise do crescimento micelial pode ser determinada por observação visual durante os ensaios, de acordo com o padrão adaptado da ASTM (American Society for Testing Materials), *Standard Methods* G21-90 (1990), com as seguintes faixas de crescimento:

- (-) ausência de crescimento;
- (+) pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio;
- (++) moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio;
- (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo frasco.

### 4.3.4 Extração das enzimas

A obtenção do extrato enzimático foi realizada adicionando-se 20 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (SANTOS *et al.*, 2012). O conteúdo de cada frasco foi homogeneizado manualmente por 5 min. A mistura de sólido fermentado foi incubada com a solução extratora em agitador orbital durante 20 min, a 150 rpm e 35 °C (AMORIM, 2011), com modificação. O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro qualitativo com auxílio de uma bomba a vácuo e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática (Figura 8).

Figura 8 - Etapas do processo de extração das enzimas lipases



#### 4.3.5 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade das amostras pode ser medido com o auxílio de uma balança determinadora de umidade modelo MOC-63U/marca SHIMADZU, sendo retirados para análise 0,5 g do material, permanecendo durante 15 min. a 105 °C. O ajuste da umidade da massa do meio a ser umidificado foi obtido pela Equação 1.

$$VAA \text{ (g.cm}^{-3}\text{)} = mAA = [m_i \cdot (U_2 - U_1)] / (1 - U_2) \quad (1)$$

Sendo que:

VAA = volume de água a ser adicionada ao meio;

$m_i$  = massa do meio a ser umidificado;

$U_1$  = umidade do meio;

$U_2$  = umidade do meio desejada.

#### 4.3.6 Determinação do pH

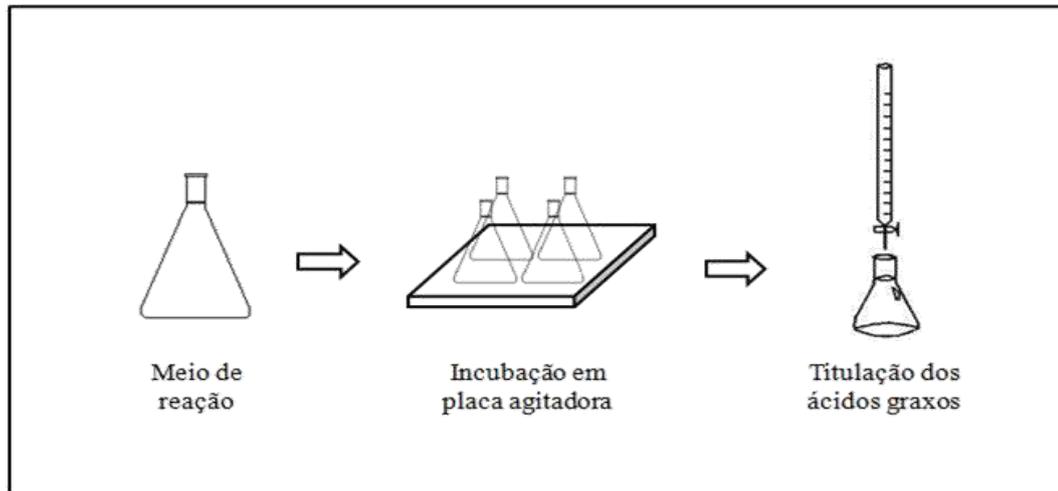
A determinação do pH nos extratos obtidos, foi realizada em pHmetro devidamente calibrado. A aferição aconteceu em cada período de coleta.

#### 4.3.7 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade lipolítica foi realizada de acordo com o método de (PASTORE *et al.*, 2003; DANTAS; AQUINO, 2010) com modificações. O meio de reação foi composto de: 1 mL de extrato enzimático; 4 mL de tampão fosfato de sódio (pH=7,0, 50 mM) e 1g de azeite de oliva comercial. O tampão fosfato e o azeite de oliva foram emulsionados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com auxílio de aparelho vórtice. Adicionou-se a este sistema 1 mL de extrato enzimático e o sistema foi mantido sob incubação a 30 °C por 30 minutos a 130 rpm. A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de acetona:etanol (1:1 v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,05M tendo fenolftaleína como indicador. Preparou-se um branco contendo o mesmo meio de reação sem o extrato enzimático, o qual foi mantido nas mesmas condições descritas anteriormente. O

branco recebeu o extrato enzimático logo em seguida à adição de acetona:etanol e titulado. As etapas do processo são mostradas na Figura 9.

Figura 9 - Etapas do processo de determinação da atividade enzimática



Fonte: Próprio autor, 2016.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{M}$  de ácido graxo por minuto nas condições de reação. A atividade enzimática no meio de extração pode ser calculada segundo a Equação 2 (CORTÁS, 2008).

$$U = \frac{(V_a - V_b) * M * 1000}{t * V_c} \quad (2)$$

Sendo:

U = Atividade enzimática da lipase ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ );

V<sub>a</sub> = Volume de NaOH gasto para titular a amostra (mL);

V<sub>b</sub> = Volume de NaOH gasto para titular o branco (mL);

V<sub>c</sub> = Volume da amostra (mL);

M = Concentração da solução de NaOH ( $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ );

t = Tempo de reação (min).

#### 4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A realização dos ensaios foi estruturada por planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  acrescido de três pontos centrais para aumento de reprodutibilidade, totalizando 7 ensaios de forma aleatória. Por meio do planejamento, as variáveis analisadas foram: umidade e temperatura. Os valores para a variável temperatura teve por base a temperatura em que o microrganismo foi isolado (35 °C). As variáveis e os níveis dos ensaios são mostrados na Tabela 3 e a matriz do planejamento na Tabela 4.

O tratamento estatístico compreendido pela determinação dos efeitos principais e a interação entre as variáveis, os valores da análise de variância (ANOVA) e, a aplicação da metodologia de superfície de resposta para análise da variável resposta, influenciada por diferentes fatores, foi efetuada pelo *software* Statistica® 8.0 (marca registrada da StatSoft).

Tabela 3 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial

<b>Variável</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
Umidade (%)	40	50	60
Temperatura (°C)	28	35	42

Fonte: Próprio autor, 2016.

Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  com três repetições no ponto central

<b>Ensaio</b>	<b>Variável</b>	
	<b>U<sub>B.U.</sub> (%)</b>	<b>T (°C)</b>
01	-1 (40)	-1 (28)
02	+1 (60)	-1 (28)
03	-1 (40)	+1 (42)
04	+1 (60)	+1 (42)
05	0 (50)	0 (35)
06	0 (50)	0 (35)
07	0 (50)	0 (35)

Fonte: Próprio autor, 2016.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE QUALITATIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento micelial do *Aspergillus sp.*, apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise qualitativa do crescimento microbiano de *Aspergillus sp.*, em cultivo de 120 h para produção de lipase.

Ensaio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
01	-	++	+++	+++	+++
02	-	++	+++	+++	+++
03	-	-	+	++	++
04	-	-	-	-	-
05	-	-	+	+++	+++
06	-	-	++	+++	+++
07	-	-	++	+++	+++

Fonte: Próprio autor, 2016.

No período de 24 h não foi visualizado crescimento microbiano em nenhum dos ensaios. Nos Ensaios 01 e 02 o microrganismo apresentou um perfil de crescimento semelhante. Já com 48 h de cultivo foi possível observar moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio. Entretanto, a partir de 72 h até o final do processo, foi possível visualizar um ótimo crescimento da massa micelial por toda superfície dos frascos. Com isto, é possível inferir que o microrganismo se adaptou bem à temperatura de 28°C.

No Ensaio 03 o microrganismo apresentou crescimento a partir de 72 h de cultivo, com pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio e, moderado crescimento a partir de 96 h. Neste ensaio, o aumento da temperatura (42°C) possivelmente resultou em menor crescimento do *Aspergillus sp.*

No Ensaio 04 não observou-se crescimento microbiano, mostrando que o microrganismo não se adaptou às condições iniciais de umidade 60% e temperatura 42°C.

Já nos Ensaios 05, 06 e 07 (triplicata no ponto central do planejamento fatorial) o fungo apresentou crescimento microbiano apenas com 72 h de cultivo, apresentando neste tempo pouco crescimento micelial. Enquanto que, a partir de 96 h houve um ótimo

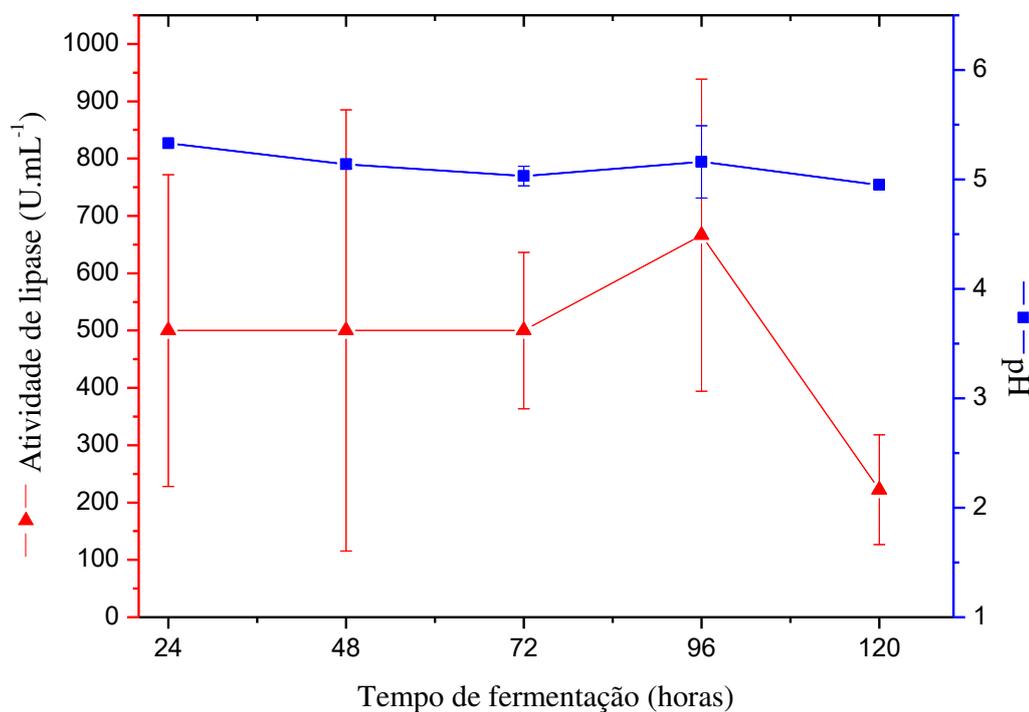
crescimento do microrganismo, mostrando que a umidade a 50% e temperatura de 35 °C são condições favoráveis ao crescimento de biomassa micelial.

## 5.2 ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO

Neste item é apresentado o comportamento das atividades enzimáticas e pH, ao longo do processo fermentativo semissólido do farelo de casca de banana pelo fungo *Aspergillus sp.*, para a produção de lipases, bem como a análise dos efeitos de umidade e temperatura iniciais do processo.

Na Figura 10 é mostrado o perfil cinético do processo fermentativo para produção de lipase por *Aspergillus sp.* em farelo de casca de banana, nas condições iniciais de umidade 40% e temperatura 28 °C.

Figura 10 - Perfil cinético do processo fermentativo do Ensaio 01 para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 40% e temperatura 28 °C.

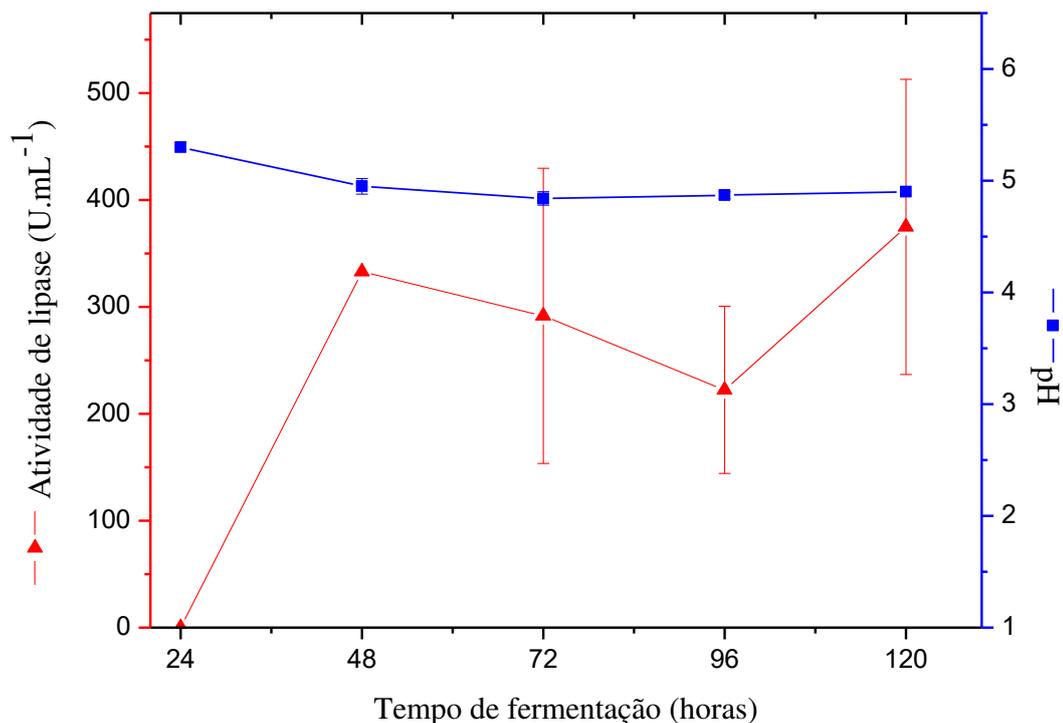


A partir de 24 h já é possível observar a ocorrência de atividade enzimática, permanecendo constante até 72 h. O pico de atividade enzimática ocorreu com 96 h horas de fermentação, atingindo um valor de 666,250 U.mL<sup>-1</sup>, ao final do cultivo (120 h) observa-se o decréscimo de atividade.

Após a umidificação, o farelo de casca de banana apresentou pH de 5,55. No tempo de 24 h de cultivo, o pH do extrato enzimático apresentou um valor de 5,33, no decorrer da fermentação houve uma ligeira tendência de diminuição chegando ao final de 120 h com valor de 4,95. De acordo com Ghori *et al.* (2011), a atividade enzimática de lipases pode ser alcançada em diferentes valores de pH, que pode variar de 4,0 até 11,0. Entretanto, este valor depende do microrganismo e das condições de cultivo.

Na Figura 11, é apresentado o perfil da atividade enzimática e os valores de pH referentes ao Ensaio 02, do processo fermentativo para produção de lipase por *Aspergillus sp.* em farelo de casca de banana, nas condições iniciais de umidade 60% e temperatura 28°C.

Figura 11 - Perfil cinético do processo fermentativo do Ensaio 02 para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 60% e temperatura 28 °C.



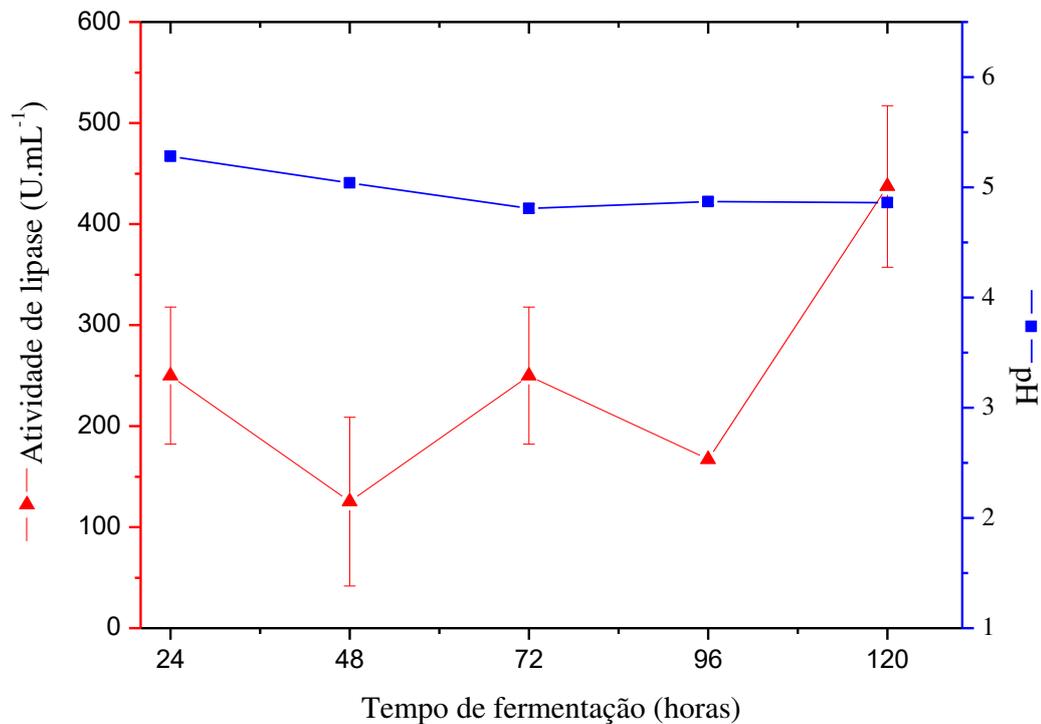
Na Figura 11 é possível observar que a ocorrência de atividade enzimática de lipase teve início com 48 h de cultivo (333,000 U.mL<sup>-1</sup>). O pico de atividade enzimática ocorreu com 120 h horas de fermentação, atingindo um valor de 375,000 U.mL<sup>-1</sup>. Pode-se então perceber, que o cultivo com umidade 60% apresentou atividade enzimática bem menor, quando comparado ao Ensaio 01. Segundo Amorim (2012), a umidade é um fator crítico para o crescimento de fungos em substratos sólidos, influenciando na dissolução e na transferência

de nutrientes e oxigênio. De acordo com Lins (2012), em condições desfavoráveis, a exemplo de baixa umidade, o microrganismo é obrigado a produzir enzimas para o seu desenvolvimento, o que pode explicar a diminuição da atividade enzimática em cultivo de maior umidade.

No tempo de 24 h de cultivo o pH do meio apresentou um valor de 5,31, seguido de uma ligeira diminuição até 48 h. O pH a partir de então, permaneceu estável até as 120h de cultivo, mostrando um comportamento semelhante ao Ensaio 01.

A cinética do processo fermentativo, referente ao Ensaio 03 é mostrada na Figura 12, nas condições iniciais de umidade 40% e temperatura 42 °C.

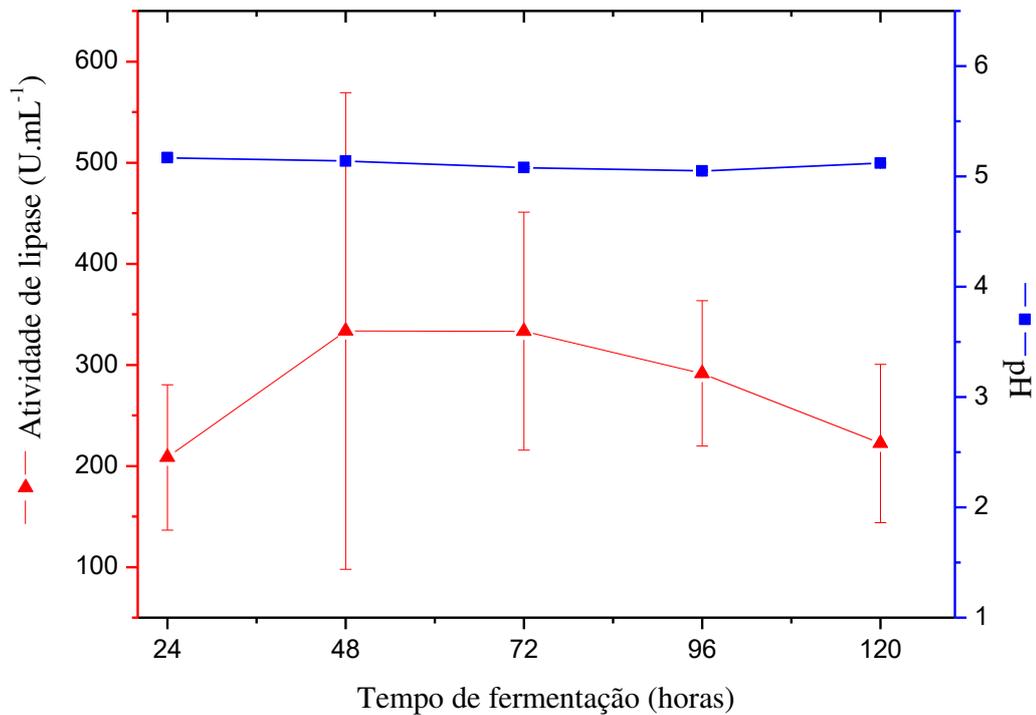
Figura 12 - Perfil cinético do processo fermentativo do Ensaio 03 para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 40% e temperatura 42 °C.



Pode-se observar que no Ensaio 03 a atividade enzimática de lipase teve início a partir de 24 h com 250,000 U.mL<sup>-1</sup>, atingindo um pico de produção de lipase em 120 h com 437,000 U.mL<sup>-1</sup>. Semelhantemente ao Ensaio 01, a produção enzimática teve início nas primeiras 24 horas de cultivo. Ambos os ensaios foram realizados com umidade inicial de 40%, obtendo-se valores de atividade mais altos. O extrato enzimático obtido com 24 h de fermentação apresentou pH igual a 5,29, passando por uma redução até atingir o valor de 4,86 com 120 h de cultivo.

Na Figura 13 encontra-se o perfil do processo fermentativo para produção de lipase por *Aspergillus sp.* em farelo de casca de banana, nas condições iniciais de umidade de 60% e temperatura de 42 °C.

Figura 13 - Perfil cinético do processo fermentativo do Ensaio 04 para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 60% e temperatura 42 °C.

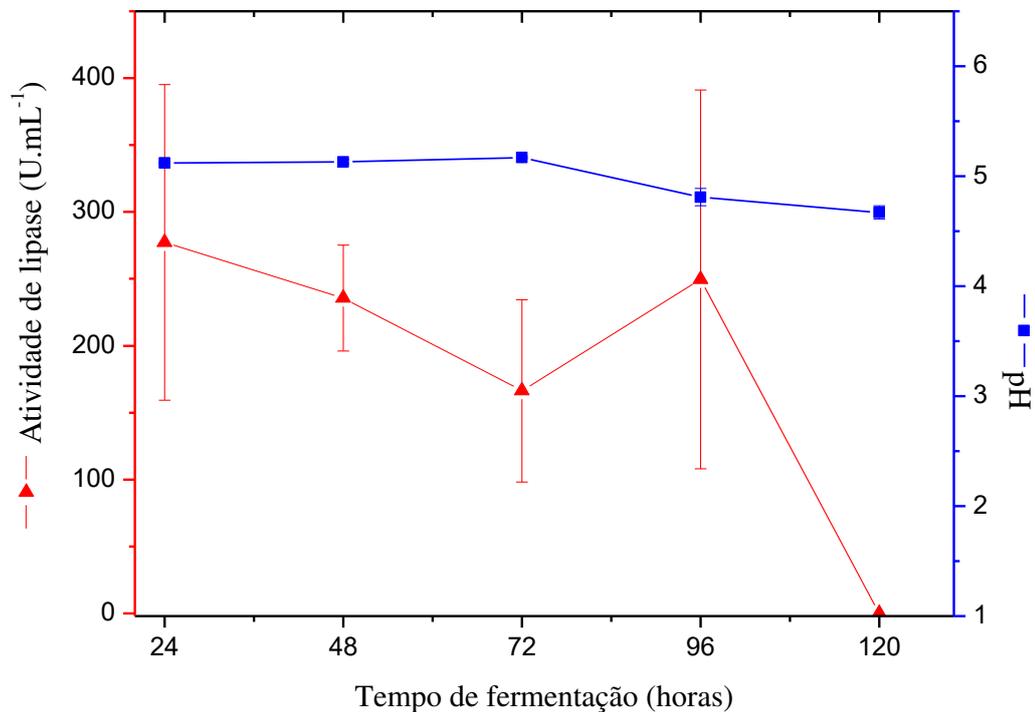


No Ensaio 04, a partir de 24 h pode-se observar a produção enzimática com 208,500 U.mL<sup>-1</sup>, sendo observado um pico de atividade em 48 h horas de fermentação (333,667 U.mL<sup>-1</sup>) e apresentou tendência de diminuição. Segundo Del Bianchi *et al.* (2001), em elevados teores de umidade poderá acontecer o decréscimo de porosidade das partículas do substrato, resultando em menor difusão de oxigênio no interior do suporte, diminuindo o crescimento microbiano. A ausência de observação visual de crescimento neste ensaio a 60% de umidade também é vista na Tabela 5 e pode estar relacionada à baixa atividade enzimática, quando comparados os valores obtidos no Ensaio 01 com umidade 40% e pico de 666,250 U.mL<sup>-1</sup>.

O extrato enzimático obtido no tempo 24 h apresentou pH igual a 5,18, permanecendo estável ao longo do cultivo.

Na Figura 14, é apresentado o perfil cinético do processo fermentativo dos Ensaios 05, 06 e 07, referentes à triplicata do ponto central (média) do planejamento fatorial nas condições iniciais de umidade 50% e temperatura 35°C.

Figura 14 - Perfil cinético do processo fermentativo da triplicata no ponto central para produção de lipase nas condições iniciais de umidade 50% e temperatura 35 °C.

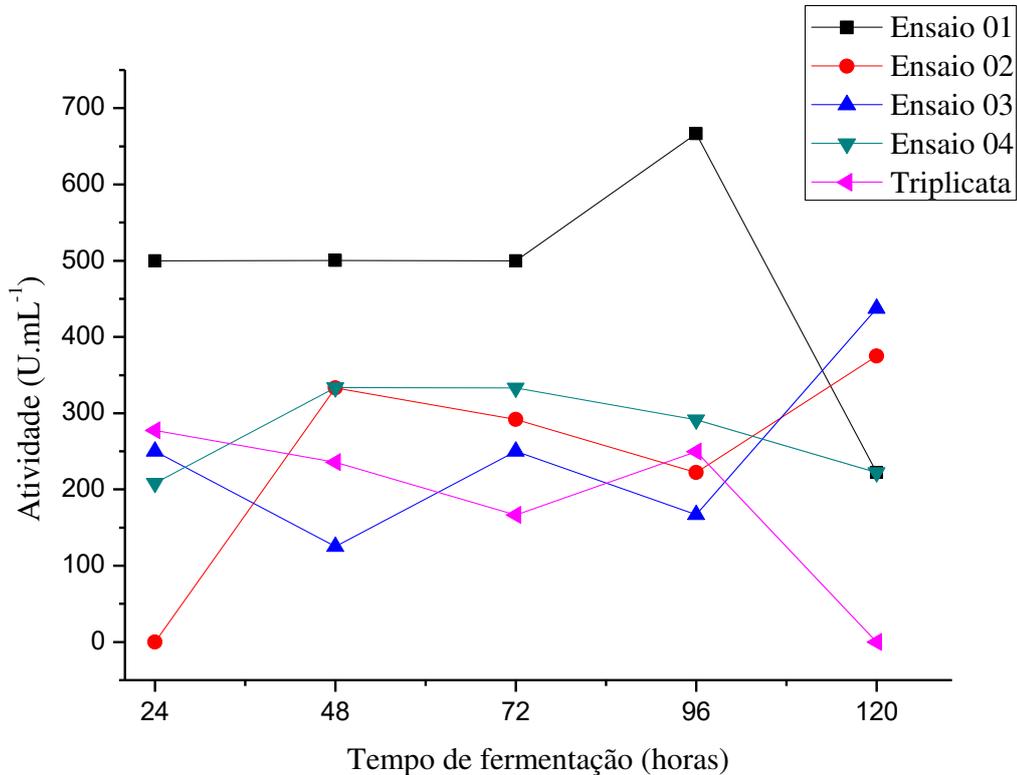


Observa-se que em 24 h de cultivo foi obtida a produção enzimática máxima da triplicada com 277,283 U.mL<sup>-1</sup>. A produção enzimática manteve-se estável até 96 h, porém com 120 h a atividade de lipase não foi detectada. Às 24 h de cultivo o extrato enzimático apresentou pH igual a 5,12, permanecendo estável até o tempo de 72 h, apresentou uma diminuição até alcançar o valor de 4,67 com 120 h.

Segundo Lins (2012) os processos biológicos, como aqueles envolvendo fungos filamentosos, por se tratarem de processos complexos, os erros mínimos geram uma diferença considerável nos resultados. Dessa forma algumas variações na produção enzimática podem estar relacionadas à complexidade do processo fermentativo.

Na Figura 15, é mostrado o perfil de atividade enzimática ao longo do processo fermentativo para produção de lipase em todos os ensaios realizados do planejamento fatorial.

Figura 15 - Perfil de atividade enzimática de todos os ensaios do planejamento fatorial



Ao analisar todos os ensaios percebe-se que o Ensaio 01, nas condições iniciais de umidade 40% e temperatura 28°C apresentou maior atividade enzimática, com pico de 666,250 U.mL<sup>-1</sup> após 96 h de cultivo. O Ensaio 03, também realizado com umidade inicial de 40% apresentou a segunda maior atividade enzimática, com pico de 437,250 U.mL<sup>-1</sup>, com 120 h de cultivo. Com isto, pode-se inferir que as maiores produções enzimáticas são alcançadas em condições de baixa umidade.

Os Ensaios 02 e 04, realizados com umidade inicial de 60% e temperaturas de 28°C e 42°C, respectivamente, tiveram atividades bem mais baixas que aquelas verificadas nos demais ensaios. No Ensaio 02 o microrganismo apresentou um perfil de alto crescimento micelial (Tabela 5), o mesmo não foi capaz de gerar grande produção enzimática, nas condições estudadas, possivelmente porque a elevada umidade deve ter prejudicado a difusão de oxigênio (PANDEY, 1999).

Em relação aos ensaios do ponto central, ocorreu atividade enzimática da lipase ao longo da fermentação até o tempo de 96 h, não sendo registrada atividade no tempo de 120 h. O pico de atividade da triplicata foi de 416,000 U.mL<sup>-1</sup>.

### 5.3 ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO O PLANEJAMENTO FATORIAL

Na Tabela 6 encontra-se a interação das variáveis independentes analisadas no planejamento fatorial e a máxima atividade enzimática nos respectivos ensaios.

Tabela 6 - Atividade enzimática máxima em cada um dos ensaios do planejamento fatorial.

<b>Ensaio</b>	<b>U<sub>B.U.</sub> (%)</b>	<b>T (C°)</b>	<b>Atividade de lipase (U.mL<sup>-1</sup>)</b>
01	-1 (40)	-1 (28)	666,250
02	+1 (60)	-1 (28)	375,000
03	-1 (40)	+1 (42)	437,000
04	+1 (60)	+1 (42)	333,667
05	0 (50)	0 (35)	375,000
06	0 (50)	0 (35)	416,000
07	0 (50)	0 (35)	416,000

Fonte: Próprio autor, 2016.

As maiores atividades ocorreram nos ensaios realizados com umidade inicial de 40% (Ensaio 01 e 03). Segundo Pandey *et al.* (1999) o teor de umidade do substrato na fermentação semissólida afeta diretamente a produtividade do processo. No estudo realizado, o menor teor de umidade inicial foi mais favorável à produção enzimática. Em fermentação de bagaço de cana *in natura* Pinotti *et al.* (2015), verificaram produção enzimática de lipase de 0,18 U.mL<sup>-1</sup> nas condições de 40% de umidade e 28°C.

Segundo Sbardelotto *et al.* (2013), na fermentação de torta de canola por *Aspergillus sp.* para produção de lipase, a variável de maior influência na atividade de lipase é a umidade, com uma atividade máxima de 0,84 U.g<sup>-1</sup> a 60% de umidade em 48 h de cultivo. Este perfil de maiores produções enzimáticas no tempo de 48 h em umidade 60% também é verificado no Ensaio 04. Entretanto, Penha *et al.* (2016) avaliaram que a fermentação da torta de dendê para produção de lipase com 60% de umidade, resultou na baixa produção de lipase por *A. niger* 11T53A14 em 72h (10,64 U.g<sup>-1</sup>). Isto mostra que em altos teores de umidade a produção de lipase pode se alta ou baixa, dependendo do microrganismo e das demais variáveis envolvidas no processo.

Tendo-se por base as atividades máximas obtidas em cada ensaio (Tabela 6) foi construído um modelo empírico por regressão linear (Equação 3) para representação da atividade enzimática em função da umidade e temperatura iniciais.

$$\text{Atividade (U.mL}^{-1}\text{)} = 431,274 - 98,646U - 67,646T + 46,978 UT \quad (3)$$

O modelo apresentou um coeficiente de determinação  $R^2 = 0,923$ , logo o modelo explica 92,3% da variação dos dados. Este coeficiente indica o quanto o modelo foi capaz de explicar os dados analisados, sendo uma medida da qualidade do ajuste dos dados.

A análise de variância (ANOVA) acerca dos dados do planejamento fatorial, tendo-se em consideração apenas as atividades máximas em cada ensaio, é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para atividade enzimática.

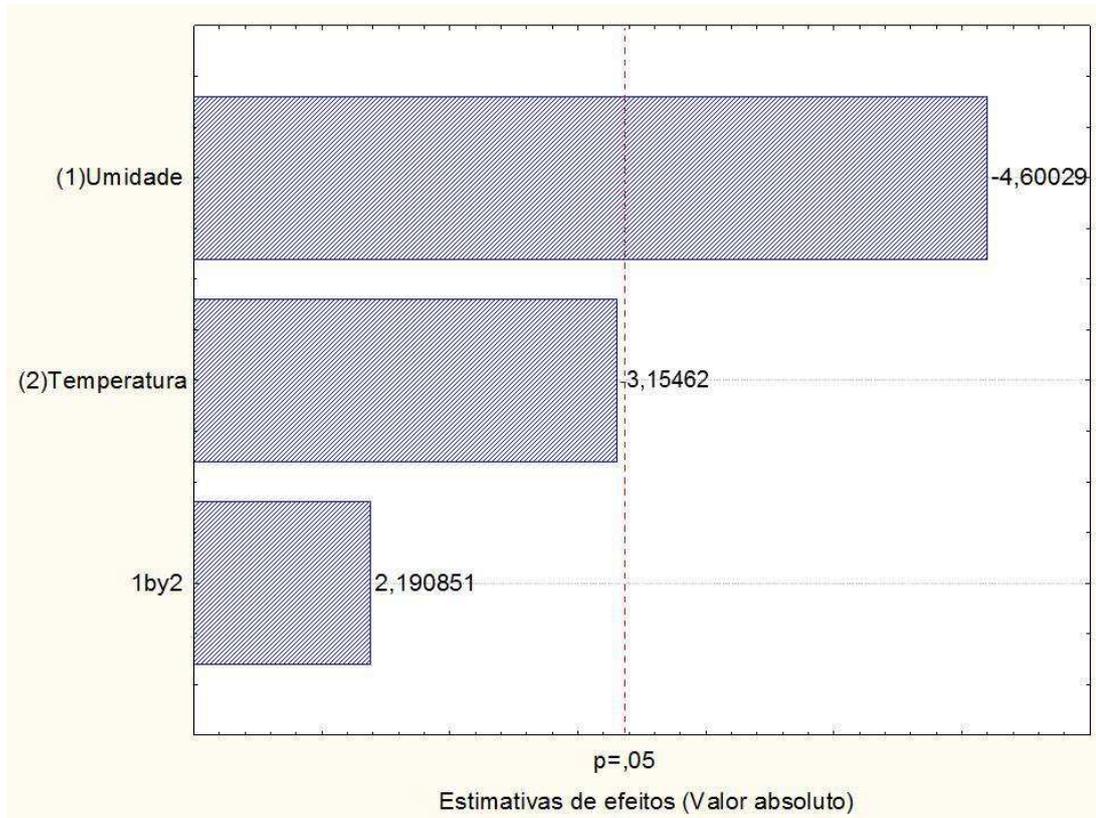
<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
(1)Umidade	38923,94	1	38923,94	21,16265	0,019309
(2)Temperatura	18303,79	1	18303,79	9,95163	0,051083
1by2	8828,20	1	8828,20	4,79983	0,116162
Erro	5517,82	3			
Total	71573,75	6			

Fonte: Próprio autor, 2016.

O valor de  $p$  a um nível de significância de 0,05 do efeito principal umidade foi significativo, mostrando que a umidade exerce influência na variável dependente atividade enzimática da lipase.

Na Figura 16, o diagrama de Pareto representa os efeitos estimados, em ordem decrescente de magnitude, das variáveis umidade e temperatura, bem como suas interações na Atividade de lipase.

Figura 16 - Diagrama de Pareto para as variáveis independentes umidade e temperatura na resposta atividade enzimática.

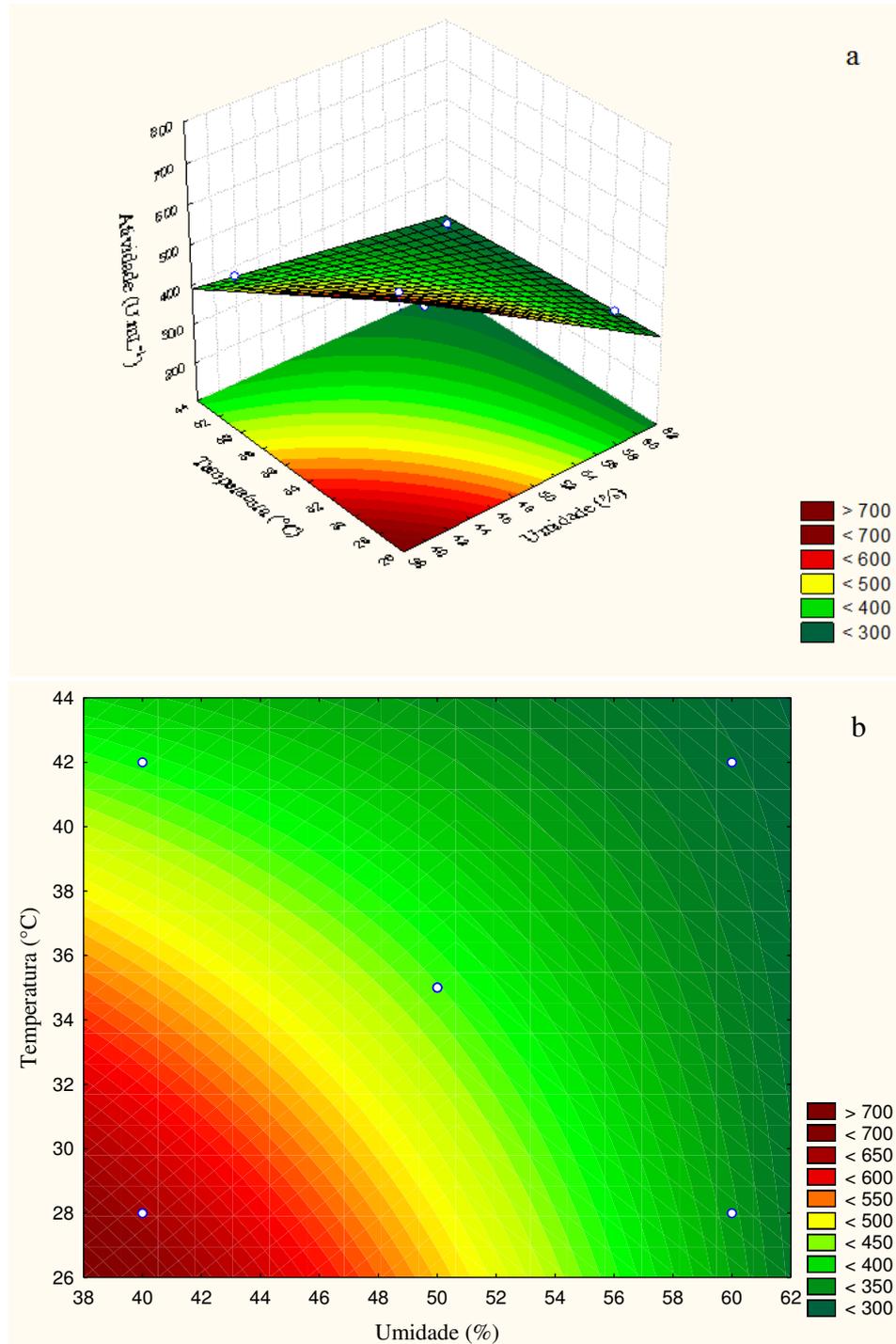


Apenas o efeito principal umidade (1) foi significativo para a resposta atividade enzimática. Notou-se que a variável Temperatura (2), e a interação 1 e 2, não foram significativas. Observou-se ainda que a variável (2) apresentou uma estimativa maior que o efeito interativo entre as variáveis 1 e 2, embora ambas estejam abaixo do nível de significância. Com base nas análises, pode-se inferir que a umidade é o fator mais relevante no processo de produção de lipase pelo fungo *Aspergillus sp.* por FES, tendo como substrato o farelo da casca de banana.

Os resultados apresentados anteriormente também podem ser visualizados por meio da superfície de resposta e das curvas de nível, que fornecem uma análise da tendência de resposta da variável dependente. Nas curvas de nível, ao longo de cada linha do gráfico, têm-se o mesmo valor da variável resposta.

Na Figura 17 encontra-se a superfície de resposta (a) e as curvas de nível (b) da variável dependente atividade enzimática em função das variáveis umidade e temperatura.

Figura 17 - Superfície de resposta (a) e curvas de nível (b) da variável dependente atividade enzimática em função das variáveis umidade e temperatura.



A superfície de resposta (a) ilustra a variação da resposta atividade enzimática em função das variáveis independentes umidade e temperatura. As curvas de nível (b) também permitem uma visualização do comportamento da atividade enzimática de lipase em função da umidade e temperatura. Em ambas é observado que à medida que os níveis inferiores de umidade e temperatura tendem à região do vermelho, tem-se uma maior atividade de lipase.

As Figuras 17 (a) e 17 (b) mostram que os níveis inferiores de umidade e temperatura coincidem com a atividade máxima obtida nos ensaios, entretanto, aumentando-se os valores de ambos os níveis, ocorrerá a diminuição da atividade enzimática. Este comportamento também é previsto pelo modelo de atividade enzimática em função da umidade e temperatura, Equação 3.

Além disso, as linhas nos gráficos não são paralelas, expressando a importância do efeito de interação entre as variáveis. Diante destas análises pode-se inferir que a umidade inicial foi o fator de maior influência na resposta atividade enzimática da lipase.

A maior produção de lipase foi observada nas condições iniciais de umidade 40% e temperatura de 28%, logo, os níveis inferiores analisados no planejamento fatorial, resultaram nas maiores atividades de lipase.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir:

1. A casca de banana acrescida com 1% de óleo de fritura apresentou-se como um substrato promissor para produção de lipase em FES;
2. Visualmente foi possível verificar crescimento do fungo *Aspergillus sp.* nas condições de cultivo dos ensaios realizados, exceto no Ensaio 04;
3. Dentre as variáveis analisadas, apenas a umidade influenciou significativamente a produção de lipase pelo fungo *Aspergillus sp.* por FES utilizando farelo da casca de banana;
4. A maior produção de lipase foi 666, 250 U.mL<sup>-1</sup> obtida no Ensaio 1 nas condições de 40% de umidade inicial e 28°C de temperatura.

## **7 CONSIDERAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

1. Realização de estudos para avaliar o caráter ácido da lipase;
2. Levando-se em consideração outra forma de preparo do substrato, um pré-tratamento da casca de banana é sugerido;
3. A avaliação do efeito de outros fatores como pH de extração e uso de tampão para umedecer o substrato poderão ser verificadas.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM G21**: Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi, 1990.
- ALCÂNTARA, S. R. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida com bagaço do pedúnculo do caju**: influência da atividade de água e fonte de nitrogênio. 2008. 127f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2008.
- ALMEIDA, R. V. **Clonagem, expressão, caracterização e modelagem estrutural de uma esterase termoestável de *Pyrococcus furiosus***. 2005. 132f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- ALVES, C. T. **Transesterificação de óleos e gorduras residuais via rotas metálica e etílica utilizando o catalisador aluminato de zinco, em presença ou não de CO<sub>2</sub> supercrítico**. 2012. 203f. Tese (Doutorado em Engenharia Industrial) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.
- AMORIM, G. M.; SANTOS, T. C. dos.; PACHECO, C. S. V.; BARRETO, I. M. A.; FREIRE, D. M. G.; FRANCO, M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 24-27, 2012.
- AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal**. 2011. 60f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2011.
- ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 141-158, 2007.
- BAIG, M. M. V.; BAIG, L. M. B.; BAIG, M. I. A.; YASMEEN, M. Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes. **African Journal of Biotechnology**, v. 3 n. 9, p. 447-450, 2004.
- BARCZA, M. V. **Esterificação**. Disponível em: <<http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Esterificacao.pdf>> Acesso em: 15 abr. 2016.
- BERTO, P. O. R.; DALCOLLE, J. C.; FERREIRA, L. A.; CANCIAM, C. A.; PEREIRA, N. C.; VIEIRA, M. F. Estudo da cinética de secagem das cascas de bananas das variedades nanica e prata. In: **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2015, Campinas. Campinas: Unicamp, 2015.
- BON, E. P. S.; PEREIRA JÚNIOR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; RESEIRO, J. C. R.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Org.) **Enzimas em biotecnologia**: Produção, aplicações e mercado. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BRASIL, M. D. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2005. 1020p.

BRUNO, L. M. **Desenvolvimento de sistemas enzimáticos (lipases) para a aplicação na hidrólise e síntese de ésteres**. 2003. 111f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2003.

BUENO, P. R. M.; OLIVEIRA, T. F. de.; GASTIGLIONI, G. L.; SOARES JÚNIOR, M. S.; ULHOA, C, J. Application of lipase from *Burkholderia cepacia* in the degradation of agroindustrial effluente. **Water Science & Technology**, p. 957-964, 2015.

CARDOSO, A. L. **Estudo cinético das reações de esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácidos de Lewis e de Brønsted para produção de biodiesel**. 2008. 52f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 24, p. 270-276, 1939.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos do café**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

CORADI, G. V. **Produção de lipase por *fusarium oxysporum* em fermentação em estado sólido e sua aplicação em reações de síntese de ésteres de biodiesel**. 2012. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

CORTÁS, L. C. **Produção de lipases de *Aspergillus parasiticus* por fermentação no estado sólido**. 2008. 74f. Monografia (Química) - Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M. de.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 4, p. 245-249, 2011.

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

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALHO, D. M. F.; Fermentação em estado sólido. In: SCHIMEDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Orgs). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgar Blucheir, v2, 2001.

DELGADO, C. H. O. **Obtenção, caracterização e aplicação de lipases vegetais**. 2014. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

DEMUNER, B. J.; JUNIOR, N. P.; ANTUNES, A. M. S. Technology prospecting on enzymes for the pulp and paper industry. **J. Technol. Manag. Innov**, v. 6, n. 3, p. 148-158.  
DEREWENDA, Z. S. Structure and function of lipases. **Advances in Protein Chemistry**, v. 35, p. 1-52, 1994.

FEDERIZZI, M. **Potencialidade do uso de resíduos lignocelulósicos da bananicultura como substrato de fermentação do processo de metanização**. 2008. 111f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2008.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 131f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C. dos.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. de SOUZA.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1369-1373, 2007.

GHORI, M. I., IGBAL, M. J., HAMEED, A. Characterization of a novel lipase from *Bacillus sp.* Isolated from tannery wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 22-29, 2011.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. de F. V.; DANTAS, A.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em casas de frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25 n. 4, p. 825-827, 2005.

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

HEINEHR, C. O. *et al.* Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v.16, p. 396-403, 1998.

JÚNIOR, S. D. O. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo do caju como substrato**. 2014. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

JURADO, E. Optimization of lipase performance in detergent formulations for hard surfaces. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, n. 50, p. 11502–11510, 2011.

KANMANI, R.; VIJAYABASKAR, P.; JAYALAKSHMI, S. Saccharification of banana-agro waste and clarification apple juice by cellulase enzyme produced from *Bacillus pumilis*. **World Applied Sciences Journal**, v. 12, n. 11, p. 2120-2128, 2011.

LIMA, A. C. P.; CAMMAROTA, M. C.; GUTARRA, M. L. E. Produção de lipase por fermentação no estado sólido para pré-tratamento enzimático da gordura de efluentes domésticos. In: **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio Nacional de Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Fortaleza, 2015.

LIMA, B. M.; SOUZA, S. de O e.; FERREIRA, C. F. **Banana : o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2.ed. Brasília: Embrapa, 2012. 214p.

- LINS, S. A. da S. **Produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de pedúnculo do caju utilizando *trichoderma reesei* LCB 48**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.
- MACEDO, L. N.; OLIVEIRA, A. C. P. de.; FERREIRA, A. D. da F.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S. Estudo da influência de variáveis de processo na produção de lipases por fungo filamentosos. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Natal, agosto 2009.
- MAIA, T. F. ***Aspergillus da seção nigri* de interesse biotecnológico isolados de solo e serapilheira**. 2014. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.
- MARRA, I. S.; SILVA, T. B. da.; SCHEUFELE, F. B.; GEBERT, D. G. C.; LANGARO, C.; FIORESE, M. L.; HASAN, S. D. M. Efeito do pH, umidade e indutores sobre a produção de celulases por trichoderma sp. Em fermentação em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.17, n.2, p.125-131, 2015.
- MELO, A. F. **Produção e aplicação de lipase no desenvolvimento de um biossensor potenciométrico**. 2012. 118f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 194f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratadas por lipases. **Braz. J. Food Technol.**, v.9, n.2, p. 143-149, 2006.
- MENDES, A.A.; CASTRO, H. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D de. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 440-43, 2009.
- MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z. da.; LIMA, V. M. G. de.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. de M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.
- MONTEIRO, M. C. P. **Identificação dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- MURUCI, L. N. M.; SANTOS, R. R. S.; VIANA, L. A. N.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S.; PENHA, E. M. Estudo da estabilidade a temperatura, ph e a estocagem, de lipase produzida por *aspergillus niger* em fermentação semi -sólida. In: **X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, 2012, Blumenau. Blumenau: ENZITEC, 2012.

OLIVEIRA, F. J. da C.; ROZENDO, A. S.; BRAZ, L. C. C.; ALVEZ, M. Z. Doenças fúngicas pós-colheita em bananas comercializadas na feira livre de sumé-pb. In: **I Seminário Regional sobre Potencialidades do Bioma Caatinga**, 2014. Sumé. Sumé: Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.**, v. 77, p. 149-162, 1999.

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

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

PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. 2008. 127f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. dos S. R. da; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.

PENHA, E. das M.; VIANA, L. de A. N.; GOTTSCALK, L. M. F.; TERZI, S. da C.; SOUZA, E. F. de. FREITAS, S. C. de.; SANTOS, J. de O.; SALUM, T. F.C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. **Ciência Rural**, v.46, n.4, p.755-761, 2016.

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. 2006. 120f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2006.

PINOTTI, L. M.; LACERDA, J. X.; OLICEIRA, M. M.; TEIXEIRA, R. D. Produção de lipases por fermentação no estado sólido. In: **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2014, Florianópolis. Florianópolis: [s.l.], 2014.

PINOTTI, L. M.; OLIVEIRA, M. M. de.; LACERDA, J. X.; TEIXEIRA, R. D.; RODRIGUES, C.; CASSINI, S. T. A. Produção de lipase por cepas fúngicas. . In: **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio Nacional de Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Fortaleza, 2015.

PONTOS, C. R. **Enriquecimento proteico do bagaço do caju através de fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger***. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M. de.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 1, p. 1-16, 2011.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 161f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ROECKER, P. B.; SERPA, G. Otimização da produção de lipase a partir de *Geotrichum sp* isolado de resíduos gordurosos domésticos. In: **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio Nacional de Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Fortaleza, 2015.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-31, 2010.

SAID, S.; PITRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos, 2002. 121p.

SANTOS, R. R. S.; MURUCI, N. M.; DAMASO, M. C. T.; SILVA, J. P. L.; SANTOS, L. O. Uso de planejamento experimental na produção de lipase fúngica a partir de farelo de trigo. In: **X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, 2012, Blumenau. Blumenau: ENZITEC, 2012.

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

SANTOS, R. R. dos.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M.; FINOTELLI, P. V.; AMARAL, P. F. F. Lipase Production by *Aspergillus niger* 11T53A14 in Wheat Bran Using Experimental Design Methodology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 10, p. 659-663, 2014.

SBARDELOTTO, M.; AGNOL, A. D.; VENTURIN, B.; MULINARI, J.; TREICHEL, H.; VARGAS, G. D. L. P. Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus sp.*, utilizando torta de canola como substrato. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 293-296, 2013.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angew. Chem. Int**, v. 37, p. 1608-1638. 1998.

SENA, J. V. C. Aspectos da produção e mercado da banana no nordeste. **Informe Rural Etene**, n. 10, p. 1-7, 2011.

SHAFIQUE, S.; ASCHER, M.; SHEIKH, M. A.; ASAD, M. J. Solid state fermentation of banana stalk for exoglucanase production. **Int. J. Agri. Biol.**, v. 6, n. 3, p. 486-491, 2004.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U, C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SILVA, J. N. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Rhizomucor miehei***. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SIMIQUELI, AP. P. R.; QUADROS, C. P. PASTONE, G. M. Seleção de lipases microbianas para produção de bioaromas para embutidos de carne. In: **XIV congresso interno de iniciação científica unicamp**, 2006, Campinas. Campinas: Unicamp, 2006.

SOUZA, L. T. A. **Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica**. 2010. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

TOMBINI, J. **Produção de lipase fungica a partir de subprodutos do processamento de soja**. 2015. 74f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D de.; MAZZUTI, M. A.; DI LUCCIO, M. OLIVEIRA, J. V. A Review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technol**, v. 3, p. 182–196, 2010.

VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. 2004. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2004.

VERMA, N.; THAKUR, S.; BHATT, A. K. Microbial lipases: industrial applications and properties (a review). **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 8, p. 88-92, 2012.

VOLPATO, G. **Clonagem, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warwri* EX17 produzidas em glicerol**. 2009. 158f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.