



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CYNDY MARY DE MELLO FARIAS

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASES OBTIDAS DE *ASPERGILLUS*
SEÇÃO *TERREI* UTILIZANDO RESÍDUO HIDROLISADO PROTEICO DE
PEIXE COMO SUBSTRATO**

Recife

2017

CYNDY MARY DE MELLO FARIAS

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASES OBTIDAS DE *ASPERGILLUS*
SEÇÃO *TERREI* UTILIZANDO RESÍDUO HIDROLISADO PROTEICO DE
PEIXE COMO SUBSTRATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Microbiologia Aplicada, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof.^o Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Keila Aparecida Moreira e Prof.^a Dr.^a Cristina M. Souza Motta

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso, CRB-4/ 1728

Farias, Cyndy Mary de Mello

Produção e aplicação de lipases obtidas de *Aspergillus* seção *Terrei* utilizando resíduo hidrolisado protéico de peixe como substrato/ Cyndy Mary de Mello Farias. – 2017.

143 f. : il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadores: Keila Aparecida Moreira e Cristina M. de Souza Motta Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Micologia Aplicada, Recife, 2017.

Inclui referências e anexo

1. *Aspergillus* 2. Lipase 3. Peixes I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.) II. Moreira, Keila Aparecida (coorient.) III. Motta, Cristina M. de Souza (coorient.) IV. Título

579.5657

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-007

CYNDY MARY DE MELLO FARIAS

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASES OBTIDAS DE *ASPERGILLUS*
SEÇÃO *TERREI* UTILIZANDO RESÍDUO HIDROLISADO PROTEICO DE
PEIXE COMO SUBSTRATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Microbiologia Aplicada, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 21/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Oliane Maria Correia Magalhães (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Lidianne Roberta Cruz (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Juliett de Fátima Xavier da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Alagoas

Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

Dedico...

A minha “estrelinha do céu”, minha eterna amada
Vovó Zezete (*in memoriam*), pelas inúmeras
vezes que sentou ao meu lado e me ensinou
com um simples olhar a ser quem eu sou.

Ofereço...

Ao meu “anjo da guarda”, meu marido
Rômulo por me apoiar nos momentos de
turbulências, demonstrando compreensão, carinho
e amor.

AGRADECI ME NT OS

A Deus, pela infinita misericórdia e amor em todos os meus passos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo apoio no desenvolvimento do projeto e por possibilitarem a minha formação.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste projeto.

Ao meu orientador, Dr. Ranilson de Souza Bezerra e as minhas co-orientadoras, Dr.^a Cristina Maria de Souza Motta e Dr.^a Keila Aparecida Moreira, pela excelente orientação, dedicação, compreensão e paciência durante a realização desta tese, principalmente pelo respeito e amizade.

Aos pesquisadores e funcionários do Centro de Ciências Biológicas e do Departamento de Micologia pelo bom atendimento e ensinamentos.

A minha mãe Cintia Maria Farias Tenório e minha tia Rosemary Farias por acreditarem no meu potencial, escutando e mostrando os caminhos a serem seguidos.

Aos meus irmãos Fábio, Fabiana e Suendy, aos meus adorados sobrinhos Davison e Wendy, belas risadas e companheirismo. A Luiz Carlos, Lídia, Lívia, Lícia, Leo e Vó Lenita, por me abraçarem como mais um membro da família.

A Rômulo, pela amizade, dedicação, companheirismo e delicado amor.

Aos companheiros do Departamento de Bioquímica, Ana Claudia, Cybelli, Augusto (Guto), Helane, Juliett, Luiz, Marina, Natália, Robson, Thiago, e do Departamento de Micologia, principalmente, Ana, Bruno, Eliane, Gorete, Juliana, Jullyanna, Luan, Minelli, Odacy, Oliane, Roberta, Silvana e Susana, pelos prazerosos dias de convivência no decorrer desses anos.

Aos amigos de toda vida, tia Ana, Cecília L., Daniele M., Danielli L., Emília, Fúlvio, Gleyson, Leandra, Patrícia, Sérgio e Teresa, pelos abraços dados nos momentos mais oportunos da vida.

A Morte Devagar

*Quem se transforma em escravo do hábito,
repetindo todos os dias os mesmos trajetos,
quem não muda de marca não se arrisca a vestir uma nova cor
ou não conversa com quem não conhece.
Morre lentamente
quem faz da televisão o seu guru.
Morre lentamente
quem evita uma paixão,
quem prefere o preto no branco
e os pingos sobre os "is" em detrimento de um redemoinho de emoções,
justamente as que resgatam o brilho dos olhos, sorrisos dos bocejos,
corações aos tropeços e sentimentos.
Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com o seu trabalho,
quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho,
quem não se permite pelo menos uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos.
Morre lentamente
quem não viaja,
quem não lê,
quem não ouve música,
quem não encontra graça em si mesmo.
Morre lentamente
quem destrói o seu amor-próprio,
quem não se deixa ajudar.
Morre lentamente,
quem passa os dias queixando-se da sua má sorte ou da chuva incessante.
Morre lentamente,
quem abandona um projeto antes de iniciá-lo,
não pergunta sobre um assunto que desconhece
ou não responde quando lhe indagam sobre algo que sabe
Evitemos a morte em doses suaves,
recordando sempre que estar vivo exige um esforço muito maior que o simples fato de respirar.
Somente a perseverança fará com que conquistemos
um estágio esplêndido de felicidade.*

Martha Medeiros (2000)

RESUMO

Espécies de *Aspergillus* vem sendo objeto de estudos devido à capacidade de produzir lipases, aumentando sua aplicabilidade em escala industrial. Os objetivos deste trabalho foram detectar e produzir lipases utilizando como substratos Hidrolisado Proteico de Peixe, por culturas de *Aspergillus* seção *Terrei* mantidas na Micoteca URM; autenticar por taxonomia clássica e molecular as culturas de *Aspergillus* seção *Terrei* da Micoteca URM; selecionar o melhor produtor, verificar as melhores condições de produção da enzima; determinar o efeito e a estabilidade das lipases ao pH, temperatura, solventes orgânicos, inibidores e íons metálicos; Otimizar as etapas de aplicação da lipase no tratamento de efluente de laticínios. Foram realizadas a reativação e autenticação das culturas através das características morfofisiológicas. A seleção do melhor produtor foi realizada por fermentação submersa, utilizando hidrolisado de peixe como substrato. Das 28 culturas preservadas sob óleo mineral, todas foram analisadas com perfil morfológico, sendo confirmadas como espécies pré-descritas pela abordagem molecular, 21 culturas foram identificadas como da espécie *Aspergillus terreus*. O estudo de produção foi dirigido utilizando Planejamento Estatístico do tipo Plackett-Burman, o qual foram analisadas 10 variáveis, sendo concentração do hidrolisado proteico de peixe e extrato de levedura as únicas que influenciaram na produção da enzima. Os valores ótimos de produção foram: concentração do hidrolisado proteico de peixe (10% v/v), extrato de levedura (0,2 p/v), tempo de fermentação (120 h), rotação (150 rpm), pH 7,5 a 30 °C. O extrato enzimático bruto, após a etapa de otimização de produção, foi submetido a testes de caracterização enzimática, cujo foi demonstrado a estabilidade da enzima frente uma grade faixa de pH, a solventes orgânicos, íons metálicos e não teve sua atividade comprometida pela maioria dos inibidores. Posteriormente, foi realizada a etapa de pré-purificação do extrato bruto afim de diminuir os contaminantes presentes, através da precipitação com sulfato de amônio e diálise. Com isso, foi realizada a etapa de aplicação da enzima, no estado bruto e pré-tratado, mostrando eficácia no processo quando utilizado o extrato enzimático bruto. Isso mostra a viabilidade da aplicação da enzima em etapas que não necessitam de sua purificação, diminuindo o custo final do processo de tratamento do efluente para uma escala industrial.

Palavras-chave: Lipases. Resíduo Pesqueiro. Efluente de laticínios.

ABSTRACT

Aspergillus species have been studied because of the ability to produce lipases, increasing their applicability on an industrial scale. The objectives of this work were to detect and to produce lipases using Fish Protein Hydrolyzate substrates, by cultures of *Aspergillus Terrei* section kept in the URM Micoteca; authenticate by classical and molecular taxonomy the cultures of *Aspergillus Terrei* section of the URM Micoteca; select the best producer, check the best production conditions of the enzyme; determine the effect and stability of lipases at pH, temperature, organic solvents, inhibitors and metal ions; Optimize the steps of lipase application in the treatment of dairy effluent. The reactivation and authentication of the cultures through the morphophysiological characteristics were performed. The selection of the best producer was performed by submerged fermentation using fish hydrolyzate as substrate. Of the 28 cultures preserved under mineral oil, all were analyzed with morphological profile, being confirmed as species pre-described by the molecular approach, 21 cultures were identified as of the species *Aspergillus terreus*. The production study was conducted using Plackett-Burman Statistical Planning, which analyzed 10 variables, being the concentration of fish protein hydrolyzate and yeast extract the only ones that influenced the production of the enzyme. The optimal production values were: fish protein hydrolyzate concentration (10% v / v), yeast extract (0.2 p / v), fermentation time (120 h), rotation (150 rpm), pH 7, 5 to 30 ° C. The crude enzymatic extract, after the production optimization stage, was submitted to enzymatic characterization tests, which demonstrated the stability of the enzyme against a high pH range, to organic solvents, metallic ions and was not affected by the majority of inhibitors. Subsequently, the pre-purification step of the crude extract was carried out in order to reduce the contaminants present, through precipitation with ammonium sulfate and dialysis. With this, the step of applying the enzyme, in the raw and pre-treated state, was shown to be effective in the process when the crude enzyme extract was used. This shows the feasibility of applying the enzyme in steps that do not require its purification, reducing the final cost of the effluent treatment process to an industrial scale.

Keywords: Lipases. Fishery residue. Effluent of dairy products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 - Reação de formação de um triglicerídeo. Fonte: Braga (2012)	18
Figura 2 - Lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas conformações (A) aberta e (B) fechada. Fonte: Cherukuvada et al., (2005)	27
Figura 3 – Estrutura tridimensional de uma lipase.....	28
Figura 4 – Imagens de <i>Aspergillus terreus</i> URM 4199. Macroscopia (A) e microscopia (B).....	32
...	
Figura 5 – Aspectos gerais da oliveira: (A) planta, (B) fruto e (C) óleo de oliva.....	36
Figura 6 – Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i> L.)	38
Figura 7 – Fluxograma geral do processo de beneficiamento de pescados, com a indicação do processamento (setas contínuas) e dos resíduos gerados (setas pontilhadas). Adaptado de Feltes et al., (2010)	39
Figura 8 – Procedimento para a obtenção do hidrolisado proteico de peixe (<i>Colosso macropomun</i>). Fonte Bezerra (2000)	40
Figura 9 – Fluxograma do procedimento para a obtenção do óleo de pescado. Fonte: adaptado de Moraes et al., (2001)	41
Figura 10 – Processo de extração do óleo a partir do hidrolisado proteico de peixe Tilápia. (A) porção oleosa após a separação na desnatadeira da porção proteica; (B) óleo após o processo de centrifugação junto com as cinzas; (C) óleo coletado como sobrenadante e estocado em tubos Falcon. Foto: Cyndy Mary Farias.....	43
Figura 11 – Esquema do processo de diálise. As proteínas (vermelho) ficam retidas no interior da membrana, enquanto moléculas pequenas (azul) atravessam a membrana. Fonte: Adaptado de Berg et al., (2010)	50
Figura 12 – Indústria alimentícia produtora de laticínios, situada na cidade de Garanhuns-PE. (A) Entrada da indústria; (B) Tanques de coleta do efluente; (C) Imagem do efluente no tanque. Foto: Cyndy Mary Farias.....	55

Artigo 1

Figura 1 – Fluxograma do procedimento para a obtenção do óleo de peixe a partir do hidrolisado proteico.....	61
Figura 2 – Atividade lipolítica das culturas de <i>Aspergillus</i> com 96 horas de fermentação.....	64
Figura 3 - Efeito do pH sobre a atividade lipásica de <i>Aspergillus versicolor</i> URM 6647.....	65
...	
Figura 4 – Estabilidade ao pH da atividade lipásica de <i>Aspergillus versicolor</i> URM 6647, por até 4 h de incubação.....	65
Figura 5 – Efeito da temperatura sobre a atividade lipásica de <i>Aspergillus versicolor</i> URM 6647.....	66
Figura 6 – Estabilidade a temperatura da atividade lipásica de <i>Aspergillus versicolor</i> URM 6647 por até 2 horas de incubação.....	67
Figura 7 – Compatibilidade e estabilidade da lipase de <i>Aspergillus versicolor</i> URM 6647 em detergente lava-louças.....	68

Artigo 2

Figura 1- URM 4318 (2) Culturas incubadas durante 7 dias A/B – 37 °C em CYA; C/D – 25 °C; E – 5°C em CYA; F/G – 37 °C em MEA; H/I – 25 °C em MEA; J – 5 °C em MEA.....	79
Figura 2 - URM 4658 (10) Culturas incubadas durante 7 dias A/B – 37 °C em CYA; C/D – 25 °C; E – 5 °C em CYA; F/G – 37 °C em MEA; H/I – 25 °C em MEA; J – 5 °C em MEA.....	79
Figura 3 - URM 5245 (22) Culturas incubadas durante 7 dias A/B – 37°C em CYA; C/D – 25 °C; E – 5 °C em CYA; F/G – 37 °C em MEA; H/I – 25 °C em MEA; J – 5 °C em MEA.....	79
Figura 4 - Reconstrução filogenética das culturas de <i>Aspergillus</i> da Micoteca URM a partir do alinhamento de nucleotídeos. Árvore NJ obtida com dados de sequência de ITS.....	81
Figura 5 - Reconstrução filogenética das culturas de <i>Aspergillus</i> da Micoteca URM a partir do alinhamento de nucleotídeos. Árvore NJ obtida com dados de sequência de β - tubulina.....	82
Figura 6 - Atividades lipásicas das 28 linhagens de <i>Aspergillus</i> em 96 horas, utilizando óleo de peixe de Tilápia como substrato.....	83
Figura 7 - Atividades lipásica dos substratos testados para melhor produção de lipases	86

Figura 8 - Efeitos de pH (A) e temperatura (B) sobre a atividade lipásica.....	87
Figura 9 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis para a produção das lipases baseados nos resultados experimentais Plackett-Burman (PB).....	88
Figura 10 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis e suas interações para a produção das lipases baseados nos resultados experimental Doehlert..	90
Figura 11- Gráfico de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais para a produção de lipases por <i>A. terreus</i> URM 6614.....	91
Figura 12 - Superfície de contorno mostrando os efeitos das variáveis significativas para a produção lipásica baseados nos resultados experimentais de Doehlert.....	91

Artigo 3

Figura 1 - Estabilidade a temperatura frente à atividade lipásica em até 4 horas de incubação.....	101
Figura 2 - Estabilidade ao pH frente à atividade lipásica com até 4 horas de incubação.....	102
Figura 3 - Efeito de surfactantes, íons metálicos e solventes orgânicos na atividade lipásica de <i>Aspergillus terreus</i> URM 6614.....	105
Figura 4 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das principais variáveis na aplicação do extrato enzimático no tratamento do efluente de laticínios baseados nos resultados experimentais do planejamento fatorial Plackett-Burman (PB).....	109
Figura 5 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das principais variáveis na aplicação do extrato enzimático em efluente de laticínios baseados nos resultados experimentais do planejamento fatorial Box-Behnken Designs. Resultado do Pareto utilizando o extrato bruto (A) e pré-tratado (B).....	111
Figura 6 - Gráficos de superfície de contorno mostrando as variáveis significativas para a aplicação da lipase produzida por <i>A. terreus</i> URM 6614; (A) pH e agitação e (B) concentração do extrato bruto e agitação.....	112
Figura 7 - Gráficos de projeção da superfície de resposta da atividade lipásica (AL) em função dos fatores experimentais, pH e agitação, na aplicação da lipase contida no extrato bruto produzida por <i>A. terreus</i> URM 6614.....	112

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1- Características bioquímicas de lipases de fungos filamentosos	24
Tabela 2 – Fungos filamentosos relatados como sendo produtores de lipases.....	29
Tabela 3 – Subgênero e seções para o gênero <i>Aspergillus</i> segundo Peterson (2000)	31
Tabela 4 – Composição em ácidos graxos do óleo de hidrolisado de peixe Tilápia. Fonte: Bastos (2013)	42
Tabela 5 – Aplicações industriais das lipases microbianas. Fonte: Colla et al., (2012)....	51
Tabela 6 – Fontes de lipídeos e suas concentrações em águas residuárias.....	52
Tabela 7 – Valores de Demanda Química de Oxigênio (DBO) para diferentes tipos de águas residuárias. Fonte: Harper (2014)	53

Artigo 1

Tabela 1 – Espécies de <i>Aspergillus</i> avaliadas quanto à capacidade de produzir lipases....	60
---	----

Artigo 2

Tabela 1 – Variáveis e níveis utilizados no planejamento Plackette-Burman (PB)	77
Tabela 2 – Variáveis significativas utilizadas no planejamento Doehlert.....	77
Tabela 3 – Autenticação taxonômica clássica e molecular dos isolados da seção <i>Terrei</i> preservados na Coleção de Cultura Micoteca URM, da UFPE.....	84
Tabela 4 - Desenho experimental e resultados do Planejamento Doehlert.....	89
Tabela 5 - Análise de variância da ANOVA da produção de lipases por <i>A. terreus</i> utilizando hidrolisado de peixe como fonte de carbono.....	90

Artigo 3

Tabela 1 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^4) Plackett-Burman (PB) para a aplicação de lipases por <i>Aspergillus terreus</i> URM 6614 com o extrato bruto e pré-tratado.....	100
Tabela 2 - Acompanhamento do comportamento do extrato enzimático durante as etapas de pré-tratamento.....	107
Tabela 3 - Resultado do planejamento fatorial Plackett-Burman (PB) 2^4 da atividade lipásica do extrato bruto e pré-tratado no tratamento de efluente de laticínios.....	108
Tabela 4 - Resultado da atividade enzimática com os níveis das variáveis do Planejamento Fatorial Box-Behnken Designs para a aplicação de lipases por <i>Aspergillus terreus</i> URM 6614 com o extrato bruto e pré-tratado, durante 16 horas a 35 °C.....	109
Tabela 5 - Análise de variância da ANOVA da aplicação do extrato enzimático bruto e pré-tratado em efluente de laticínios.....	110

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 ÓLEOS E GORDURAS.....	18
2.1.1 Composição e estrutura dos óleos e gorduras.....	19
2.1.1.1 Ácidos graxos.....	19
2.1.1.2 Não glicerídeos.....	20
2.1.1.3 Glicerídeos.....	20
2.2 LIPASES.....	20
2.2.1 Biotecnologia e lipases	22
2.2.2 Características físico-químicas e cinéticas das lipases.....	23
2.2.3 Características estruturais das lipases.....	26
2.3 FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES.....	28
2.4 GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i> MICHELL.....	30
2.4.1 <i>Aspergillus</i> seção <i>terrei</i>.....	33
2.5 FERMENTAÇÃO.....	34
2.5.1 Fermentação Submersa (FS).....	34
2.6 SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES.....	35
2.6.1 Óleo de oliva.....	35
2.6.2 Resíduo de pescado.....	36
2.6.2.1 Hidrolisado Proteico de Peixe (HPP).....	39
2.6.2.2 Óleo de peixe.....	41
2.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES.....	43
2.7.1 Planejamento estatístico.....	43
2.7.2 Efeito das fontes de carbono.....	45
2.7.3 Efeito das fontes de nitrogênio.....	46
2.7.4 Efeito das condições ambientais.....	47
2.8 PRÉ-TRATAMENTO DE LIPASES.....	48
2.9. APLICAÇÃO DAS LIPASES.....	50
2.9.1 Indústria de detergentes.....	51
2.9.2 Tratamento de efluente.....	52

3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>ASPERGILLUS</i> A PARTIR DO PROCESSAMENTO DE PEIXE COMO SUBSTRATO E SUA APLICAÇÃO EM DETERGENTE LÍQUIDO.....	56
4 SELEÇÃO E AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA POR ABORDAGEM POLIFÁSICA DE CULTURAS DE <i>ASPERGILLUS</i> SEÇÃO <i>TERREI</i> PRESERVADAS NA MICOTECA URM QUANTO À PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO RESÍDUO PESQUEIRO COMO SUBSTRATO.....	70
5 APLICAÇÃO DE LIPASES PRODUZIDAS POR <i>ASPERGILLUS TERREUS</i> URM 6614 NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE LATICÍNIOS.....	93
6 CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXO A – RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 132.417.....	141
ANEXO B – RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 134.284	142

1 INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à família das hidrolases, que atuam na interface orgânico-aquosa, demonstrando níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes aquosos e não aquosos, ao contrário de outras enzimas. Em baixas concentrações de água, podem ainda catalisar reações de esterificação e transesterificação (Martins et al., 2008; Silva et al., 2014). Estas enzimas se destacam por apresentarem diversas aplicações em vários setores industriais como na indústria alimentícia (Kar et al., 2012); indústria farmacêutica (Singh et al., 2012); indústria oleoquímica (Mota et al., 2014); em formulação de detergentes (Nunes et al., 2012), no tratamento de resíduos industriais (Hughes et al., 2012), dentre outras.

Amplamente encontradas na natureza, as lipases podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (Castro et al., 2004). Entretanto, as lipases microbianas são comercialmente utilizadas. Estas, constituem um importante grupo de enzimas, devido à versatilidade, ou seja, a capacidade de reconhecer diferentes substratos e, portanto, de catalisar uma série de reações. As lipases ainda são objetos de estudo de diversas pesquisas científicas (Akanbi et al., 2013; Grosso et al., 2013).

Dentre os fungos produtores de lipases, destacam-se algumas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* (Hasan et al., 2006). Trata-se de um gênero com aproximadamente 837 espécies (Hawksworth, 2011), comumente isolados do solo e de planta em decomposição (Guimarães et al., 2007). Atualmente com 16 seções, o gênero se destaca com espécies da seção *terrei* pois possui espécies relatadas como produtoras de enzimas de interesse biotecnológico (Raper; Fennell, 1965). São reconhecidas nove espécies para a seção, sendo *A. terreus* e *A. carneus*, mencionadas como produtoras de lipases (Varga et al., 2005; Peterson, 2008; Samson et al., 2011), mostrando assim a importância de estudos com outras espécies da seção *Terrei* quanto a produção enzimática (Sexana et al., 2003; Kaushik et al., 2006).

Uma das limitações atuais para a utilização industrial extensiva das lipases de origem microbiana tem sido o custo para a sua obtenção, que é determinado pelo rendimento da produção, pelas condições do processo e pela estabilidade da enzima. Portanto, é interessante que se procure aumentar a produtividade dos processos fermentativos pelo emprego de novos micro-organismos produtores e pela otimização das condições de cultivo, como a composição do substrato e parâmetros físicos como temperatura e pH (Silva et al., 2011). A utilização de subprodutos de pescados como fontes para produção de lipases, além de agregar valor a estes

materiais de baixo custo, pode vir a reduzir o impacto ambiental e o preço final da enzima (Ghasemi et al., 2014).

O setor pesqueiro é uma atividade de grande importância econômica em diversas localidades do Brasil. A industrialização de peixe gera uma quantidade expressiva de resíduos ricos em proteínas e em ácidos graxos de cadeia longa. As gorduras animais são geralmente mais baratas do que óleos vegetais, porque, em vez de um produto primário, representam um subproduto da agroindústria animal; entretanto a demanda de acordo com dados da FAO (2014), a demanda por óleo tem crescido e já não é mais considerado um produto de baixo valor, pois existe uma tendência crescente no uso de peixes pelágicos para consumo humano ao invés de se utilizar apenas para produção de farinha. Segundo a organização internacional de farinha e óleo de peixe, em 2010, 71% da produção de óleo foi destinada a aquicultura e 26% para consumo humano (FAO, 2014).

Entre as gorduras animais, destacam-se os óleos de peixe, que representam um grande potencial de oferta, pois dos 158 milhões de toneladas produzidos, 21,7 milhões de ton. (14%) foram destinadas para alimentação animal e produtos farmacêuticos, dos quais 16,3 milhões de ton. (75%) foram utilizados na elaboração de farinha e óleo de peixe (FAO, 2014). Os resíduos sólidos do beneficiamento de peixe são destinados principalmente à alimentação animal, mas também podem ser aproveitados para a produção de produtos bioquímicos (Lima, 2013).

A produção de enzimas, como a lipase, representa uma boa opção de mercado para aproveitamento do óleo extraído, além de outros subprodutos, dos resíduos gerados pela indústria de beneficiamento de peixe. Considerando o aproveitamento de resíduos da indústria pesqueira, associado a crescente preocupação com os impactos ambientais, igualmente a extraordinária diversidade microbiana, é importante caracterizar novas espécies de *Aspergillus* produtoras de lipases e identificar novas fontes de substrato para produção desta enzima, bem como testar a viabilidade da sua utilização biotecnológica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana, formados predominantemente de produtos de condensação entre glicerol ou glicerina e ácidos graxos chamados triglicerídeos (Moretto; Fett, 1989). Segundo Lehninger et al., (2002) os lipídeos mais simples contendo ácidos graxos são os triacilgliceróis, também chamados triglicerídeos, gorduras ou gorduras neutras.

Os triacilgliceróis são compostos por três moléculas de ácido graxo, unidas por ligação éster a uma só molécula de glicerol. Aqueles contendo o mesmo tipo de ácido graxo em todas as três posições esterificáveis do glicerol são chamados triacilgliceróis simples. Em sua maioria, os triacilgliceróis encontrados na natureza são mistos, isto é, contêm dois ou três ácidos graxos diferentes entre si (Braga, 2012). Como as hidroxilas polares do glicerol e os grupos carboxilatos polares dos ácidos graxos estão unidos nas ligações ésteres, os triacilgliceróis são moléculas não polares, hidrofóbicas e essencialmente insolúveis em água (Fig. 1).

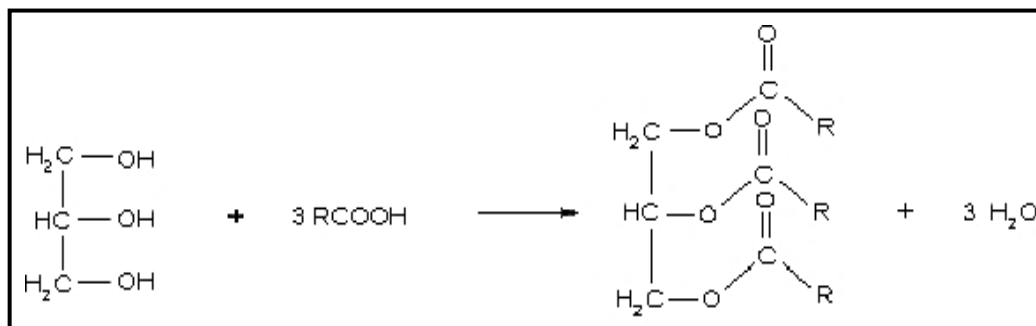


Figura 1. Reação de formação de um triglicerídeo. Fonte: Braga (2012).

A diferença entre óleos e gorduras reside exclusivamente na sua aparência física. As gorduras apresentam aspecto sólido e os óleos líquidos. A Resolução nº20/77 do Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) define a temperatura de 20°C como limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão se situa abaixo de tal temperatura. O termo gordura, contudo, é o mais abrangente e usualmente empregado quando o estado físico não tem maior significância.

As propriedades físicas e químicas das matérias graxas são determinadas pela natureza dos ácidos graxos que as constituem. A proporção de grupos acilas saturados e insaturados presentes nos triglicerídeos é o que diferencia os óleos (líquidos) das gorduras (sólidas);

triacilglicerídeos são constituídos predominantemente por ácidos graxos saturados com número de átomos de carbonos maior ou igual a dez são sólidos. Os óleos, líquidos a temperatura ambiente, são constituídos em maior proporção por triglicerídeos formados em insaturados (Viani, 1996).

2.1.1 Composição e estrutura dos óleos e gorduras

Os óleos e gorduras trazem como componentes substâncias que podem ser reunidas em duas grandes categorias - os glicerídeos e os não glicerídeos. Tendo uma participação importante na constituição das moléculas dos glicerídeos e de certos não glicerídeos, os ácidos graxos livres (AGL), ocorrem em quantidades geralmente pequenas e, conforme Lehninger et al. (1986), estes são não esterificados, com um grupo carboxilato livre. Esses componentes chegam a representar até 96% do peso total dessas moléculas e, assim, contribuem nas propriedades mais características dos diferentes óleos e gorduras. Os AGL têm, no entanto, uma participação tão importante na constituição das moléculas dos glicerídeos, e de certos não glicerídeos, que chegam a apresentar até 96% do peso total dessas moléculas e, assim, contribuem nas propriedades mais características dos diferentes óleos e gorduras (Braga, 2012).

2.1.1.1 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa, podendo ser saturados ou insaturados, dependendo de sua natureza. Estes ocorrem naturalmente nas gorduras e óleos vegetais, diferindo uns dos outros basicamente pelo número de átomos de carbono na sua cadeia e pela presença ou ausência de insaturações. (Moretto; Fett, 1989).

Solomons (1996) define ácidos carboxílicos ou carboxilácidos como compostos orgânicos com um ou mais grupos carboxila (carbonila + hidroxila), simbolizado por (-CO₂H ou -COOH) ligados à cadeia carbônica. O grupo carboxila é um dos grupos funcionais de presença mais ampla na Química e na Bioquímica. São substâncias polares, e suas moléculas formam fortes ligações hidrogênio umas com as outras, além da água.

Os ácidos graxos de ocorrência natural nas gorduras, em geral, possuem longa cadeia constituída de átomos de carbono e hidrogênio (cadeia hidrocarbonada) e um grupo terminal, chamado grupo carboxila, característico dos ácidos orgânicos. Os ácidos graxos saturados são os que possuem todos os átomos de carbono da cadeia hidrocarbonada ligados a, pelo menos, dois átomos de hidrogênio (Braga, 2012).

2.1.1.2 Não glicerídeos

Em todos os óleos e gorduras, encontram-se pequenas quantidades de componentes não glicerídeos; os óleos vegetais brutos contêm menos de 5% e os óleos refinados menos de 2%. Moretto e Fett (1989), relatam que dependendo da importância prática, os não glicerídeos são usualmente reunidos em seis grupos: óleos e gorduras, ceras, hormônios esteroidais, colesterol, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e os fosfatídeos.

Os fosfatídeos são os principais representantes dos não glicerídeos de principal ocorrência nos óleos brutos. Todos os óleos e gorduras brutos contêm uma variedade de fosfatídeos. Nas moléculas dos fosfatídeos, há uma região de grande afinidade pela água (sítio hidrofílico e outra representada pelas cadeias hidrocarbonadas dos ácidos graxos, hidrofóbica). Quando a região hidrofílica é hidratada, os fosfatídeos se insolubilizam no óleo. Nessa condição, facilmente são removidos (degomagem) (Moretto; Fett, 1989).

2.1.1.3 Glicerídeos

Os glicerídeos são definidos como produtos da reação entre a molécula de glicerol com até três moléculas de ácidos graxos, sendo classificados em monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos (Moretto; Fett, 1989). Tratam-se de ésteres de glicerol, enquanto os ácidos graxos são produtos da hidrólise dos glicerídeos. Os óleos e graxas são quase sempre, uma mistura de triglicerídeos mistos, pois os demais constituintes aparecem em menores proporções, inferiores a 5%. É pequena a ocorrência de mono e diglicerídeos e de ácidos graxos livres nos óleos brutos. Reda; Carneiro (2007) também citam que, além de triglicerídeos, os óleos contêm vários outros constituintes presentes em menor proporção, como mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, tocoferol, proteínas, esteróis e vitaminas.

2.2 LIPASES

As lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3) constituem uma classe especial entre as carboxil éster hidrolases. Estas enzimas hidrolíticas amplamente distribuídas na natureza. Formam o grupo enzimático que estão associados ao metabolismo e à hidrólise dos lípidios. Catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), fornecendo diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, sendo a trioleína o seu substrato padrão, aos ácidos graxos correspondentes e glicerol,

constituem uma classe especial de carboxil éster hidrolases (Diaz et al., 2006; Dimitrijevic et al., 2012).

Estas enzimas foram descobertas por Claude Bernard, em 1856 obtidas a partir do pâncreas de animais. Há aproximadamente cem anos atrás, o microbiologista Eijkmann relatou que diferentes cepas poderiam produzir e secretar as lípases e a partir de 1906 iniciaram-se os primeiros estudos sobre produção dessas enzimas utilizando-se diversos microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Ribeiro et al., 2011).

As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de lipídeos para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes não aquosos. Este fenômeno é devido à sua capacidade de utilização em uma ampla gama de substratos, à sua estabilidade na presença de solventes orgânicos e à sua quimio, regio e enantiosseletividade (Mendes et al., 2013).

Atualmente as lipases podem ser obtidas de várias fontes, sendo elas: nos animais de origem pancreática, hepática e gástrica, nos vegetais são encontradas nos tecidos de reserva energética e nos micro-organismos (Colla et al., 2012). Embora a lipase mais estudada até hoje seja a lipase pancreática, a pesquisa da produção de lípases a partir de micro-organismos vem crescendo nos últimos anos. Do ponto de vista industrial estas enzimas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura, além disso, permitem produção em maior escala e podem ser mais facilmente expressas via clonagem em outros organismos, o que facilita sua obtenção e purificação (Hasan et al., 2006).

Apesar de células vegetais e animais também serem utilizadas como fontes de enzimas, as enzimas extracelulares de micro-organismos são preferíveis devido ao custo de sua extração, isolamento e purificação (Said, Pietro, 2004). As principais vantagens das enzimas de origem microbiana, segundo Oliveira et al., (2006), são a sua maior facilidade de produção em larga escala; características físico-químicas diferentes, geralmente relacionadas ao habitat e à fisiologia do micro-organismo produtor (organismos termófilos produtores de enzimas termoresistentes); possibilidade de manipulação genética e representam recurso renovável. Por isso que a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (Pereira, 2013).

As lipases também atuam como catalisadores em diversas reações. Possuem alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, incluindo as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise (Colla, 2012). Estima-se que

apenas 5% dos fungos já foram avaliados e identificados como produtores de enzimas de interesse industrial. Muitas linhagens de micro-organismos já foram melhoradas geneticamente em laboratório para atender um potencial enzimático considerável, porém há sempre uma grande possibilidade que a natureza abrigue uma linhagem com ainda um maior potencial de produção e qualidade enzimática na forma selvagem (Pereira, 2013).

Atualmente, muitas fontes de carbono têm sido estudadas pois existe um interesse expressivo em otimizar estas fontes durante a produção de lipase e também em encontrar alternativas economicamente mais atrativas. As lipases têm encontrado aplicações promissoras em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos, detergentes, na biotransformação de óleos e gorduras, obtenção de fármacos, tratamento biológico de águas residuárias, aceleração da biodegradação de polímeros. Alguns desses polímeros como os hidrocarbonetos de petróleo, têm sido mencionados como substratos potenciais para a produção microbiana de várias enzimas comerciais importantes e metabólitos secundários (Gonçalves, 2007; Ribeiro et al., 2011).

2.2.1 Biotecnologia e lipases

A produção de enzimas microbianas é considerada é um dos principais setores da biotecnologia industrial (Almeida et al., 2012). Nos últimos anos os avanços biotecnológicos na produção industrial das lipases vêm proporcionando sua aplicação nos diferentes segmentos industriais e biotecnológicos (Padilha, 2011). Novas enzimas e usos estão sendo descobertas a partir do trabalho conjunto de equipes multidisciplinares da Microbiologia, Bioquímica, Química, Engenharia Bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas (Orlandelli et al., 2012).

O mercado mundial das enzimas divide-se em três segmentos: enzimas empregadas na indústria de alimentos; enzimas técnicas e enzimas empregadas na produção de ração animal. Destes três grupos, destacam-se as enzimas destinadas aos setores de alimentos, que são empregadas basicamente na produção de xarope de açúcar invertido e de compostos aromatizantes, e as enzimas técnicas, que são utilizadas na formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couros e produção de fármacos. No setor industrial as enzimas mais utilizadas são as proteases, que ocupam 40% do mercado de enzimas, seguidas das carboidrases (amilases e celulasas) e lipases (Mendes et al., 2011).

Silva (2014) discute em seu trabalho a importância dos avanços em relação às pesquisas com lipases quando afirma que grupos brasileiros e estrangeiros têm procurado lipases com

propriedades melhoradas e apropriadas à sua utilização como eficientes biocatalisadores de processos industriais. A escolha do micro-organismo, meio de cultivo e processos adequados, visa aumentar a produtividade e o rendimento, aperfeiçoar o processo, objetivando reduzir custos e ampliar a produção, saindo da escala de bancada para a produção em larga escala.

A maioria das lipases microbianas industriais são derivadas de fungos, diversos gêneros de fungos demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. As enzimas obtidas dos fungos são especialmente valorizadas por não serem nocivas à saúde humana, reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe). Lipases de *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembert*, *Penicillium roquefort*, e da levedura *Candida rugosa* estão sendo comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltda., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivo em preparações digestivas e para síntese quiral. Considerando a extraordinária diversidade microbiana e a importância dos fungos como produtores de enzimas, justifica-se a busca de novos biocatalisadores com características especiais e passíveis de aplicação em biocatálise (Dimitrijevic' et al., 2012).

2.2.2 Características físico-químicas e cinéticas das lipases

As enzimas são sensíveis às variações da concentração de H^+ do meio. Existe uma faixa de pH onde a atividade enzimática é máxima. Geralmente, cada enzima possui um pH ótimo por possuírem muitos grupos ionizáveis, pertencentes a resíduos de aminoácidos da molécula, de maneira que as trocas de pH podem alterar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo (Pereira, 2013).

A taxa específica máxima de crescimento varia com a temperatura de forma análoga à observada com a velocidade de uma reação enzimática. A atividade enzimática aumenta com a temperatura até um determinado valor, observando-se, a partir daí um decréscimo acentuado, decorrente da desativação térmica das proteínas. A temperatura ótima para uma determinada cepa, quando cultivada num meio com uma determinada composição e a um valor controlado de pH, resulta da interação entre estes dois efeitos (Teixeira et al., 2007; Pereira, 2013).

A variação da atividade enzimática em função da temperatura é resultado de duas tendências antagônicas. De um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima e do outro, a desnaturação da enzima, frente à ação do calor. A desnaturação da proteína leva tempo para ocorrer, mesmo que o aumento da velocidade da reação se produza de maneira instantânea. Dessa

forma, a uma temperatura determinada, a atividade real, medida em unidades, irá diminuindo à medida que se aumenta do tempo de incubação (Pereira, 2013).

A desnaturação modifica a estrutura terciária e quaternária da proteína globular e faz a enzima passar de uma conformação ativa para uma conformação desprovida de atividade. De maneira geral, as baixas temperaturas não têm efeito desnaturante, entretanto, a repetição de transições sólido-líquido e congelamento-descongelamento provoca notáveis perdas de atividade (Pereira, 2013).

Desta forma, percebe-se que a temperatura e o pH são alguns dos fatores de extrema importância nas reações catalisadas pelas lipases. Tais condições podem favorecer a velocidade de reação por um determinado tempo (Sharma et al., 2008; Padilha, 2011). A maioria das lipases apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e uma temperatura ótima para uma atividade máxima entre 30 e 40°C, com estabilidade que varia 25 e 70°C, as lipases de origem microbiana são as que possuem maior estabilidade térmica (Castro et al., 2004). No entanto, estas propriedades podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo micro-organismo (Tab. 1). As lipases, geralmente, são glicoproteínas ácidas com massas moleculares entre 20 e 60 kDa (Hiol et al., 1999). O seu ponto isoelétrico pode variar entre 4 e 5 (Ferrer et al., 2000).

Tabela 1. Características bioquímicas de lipases de fungos filamentosos.

Micro-organismo	pH *	pH estabilidade	Temperatura * (°C)	Temperatura estabilidade (°C)	Referências
<i>Rhizopus oryzae</i>	7,5	4,5 – 7,5	35	45	Alberton, 2009.
<i>Rhizopus homothallicus</i>	7,5	-	40	50	Alberton, 2009.
<i>Rhizopus chinensis</i>	8,0- 8,5	5,5- 7,0	40	30 -35	Alberton, 2009.
<i>Aspergillus niger</i>	7,0	4,0- 10,0	37	40- 50	Alberton, 2009;Reinehr et al. 2014; Dantas e Aquino, 2010.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,5-5,0	4,0-7,0	37	-	Martins, 2008.
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	6-7	7	30	-	Colen, 2006.
<i>Geotrichum candidum</i>	6,5	7,4	-	-	Colen, 2006.
<i>Penicillium roqueforti</i>	6,3	-	28	-	Tan, 2004.
Continuação...					

Continuação...

<i>Penicillium melinii</i>	8	-	25	-	Makhsumkhan, 2003.
<i>Phialemonium</i>	4,5-5,0	4,0-7,0	37	-	Martins, 2008.

(*) melhores valores de pH e temperatura para ação de lipase de diferentes micro-organismos.

(-) Não especificado no trabalho.

Sendo as lipases enzimas hidrossolúveis, elas atuam no metabolismo e digestão dos triacilgliceróis (Aloulou et al., 2006), apresentando assim uma baixa atividade ou mesmo serem inativas em substratos solúveis em soluções aquosas. No entanto, apresentam maior atividade quando a concentração do substrato é suficientemente alta para formar agregados micelares ou emulsões, uma vez que têm a capacidade de interagir com a interface dos substratos agregados. Esse aumento de atividade, na presença de micelas ou emulsões, deve-se ao fenômeno conhecido como ativação interfacial (Reis et al., 2008). No caso da ativação de ésteres, a situação é diferente, isto porque as esterases catalisam hidrólise de ésteres solúveis, trabalhando sem interface e obedecendo às equações de cinética enzimática de Michaelis-Menten, que são válidas apenas se as reações catalíticas ocorrerem em fases homogêneas. Dessa forma, a análise das reações catalisadas por lipases ocorre utilizando-se substrato lipídico sob a forma de emulsão.

Este fenômeno, conhecido por ativação interfacial, pode ser facilmente observado quando se avalia o efeito da concentração de substrato na atividade enzimática. A ativação interfacial das lipases foi observada inicialmente por Holwerda et al., (1936) e por Schonheyder; Volquartz (1945). Em ambos os casos, os trabalhos foram realizados com lipases pancreática de porco. Sarda; Desnuelle (1958) purificaram esta lipase e estudaram detalhadamente este fenômeno, observando que a atividade da lipase sobre a triacetina aumentava, notavelmente, uma vez que esta superava o seu limite de solubilidade. Levantaram-se duas hipóteses, denominadas de modelo da enzima e modelo do substrato.

O modelo da enzima foi proposto por Desnuelle et al., (1960), supondo que a ativação interfacial poderia responder a uma mudança conformacional sofrido pelas lipases. Estas reações não se podem descrever mediante uma reação de Michaelis-Menten, uma vez que o processo de hidrólise possui diversas etapas (Verger et al., 1980). No que diz respeito ao modelo do substrato, a ativação é explicada com a modificação do substrato lipídico na interface: o aumento da concentração local do substrato no lugar do centro ativo vai diminuir a orientação

e conformação dos lipídios unidos na interface, relativamente à geometria do centro ativo da enzima ou à diminuição do grau de hidratação do substrato (Smaby et al., 1994).

2.2.3 Características estruturais das lipases

Pleiss et al., (1998) compararam a estrutura dos centros ativos de diversas lipases e esterases e, como principal conclusão, observaram que os centros das lipases são normalmente mais largos e profundos do que os centros presentes nas esterases, o que poderia explicar a capacidade que as lipases têm de reconhecer substratos mais variados e com cadeias mais longas (p.ex.: trioleína).

Quando uma lipase está na fase aquosa, abaixo do seu limite de solubilidade, na ausência de uma emulsão ou em baixa concentração de um substrato lipídico, há, normalmente, uma hélice que cobre o centro ativo, um oligopeptído helicóide denominado por motivo “lid” ou “tampa”, que protege o centro ativo. Essa tampa, anfifílica, é constituída por aminoácidos polares na parte externa e por aminoácidos apolares na parte interna, em contato com o centro ativo (Kamiya et al., 1999). O mecanismo de passagem à conformação fechada para conformação aberta é então designado por ativação interfacial (Fig. 2) (Kuncova et al., 2003).

A determinação da estrutura tridimensional da lipase (obtida por difração de raio-X) fornece uma compreensão para a ativação interfacial. O sítio ativo das lipases é coberto por uma cadeia peptídica denominada tampa, de natureza hidrofóbica. Quando a tampa encontra uma interface lipídeo-água, há interação entre ambas e esta sofre uma alteração conformacional (a tampa se move alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta) expondo o sítio ativo e permitindo a catálise (Messias et al., 2011). A figura 2 representa resíduos de aminoácidos que constituem a tampa representados em vermelho e azul; resíduos hidrofóbicos da cavidade do sítio ativo representados em amarelo; tríade catalítica representada em verde.

O centro ativo fica acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, a lipase expõe uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação à interface (Secundo et al., 2006). Algumas lipases não apresentam o sítio ativo recoberto pela tampa e não precisam da interface para desempenhar sua atividade hidrolítica, como é o caso das cutinases, descritas como as menores lipases de estrutura conhecida, encontradas em diversos micro-organismos como a lipase B de *Candida antarctica* e de fungos fitopatogênicos, como *Fusarium solani* e *Alternaria solani* (Messias et al., 2011; Gupta et al., 2015).

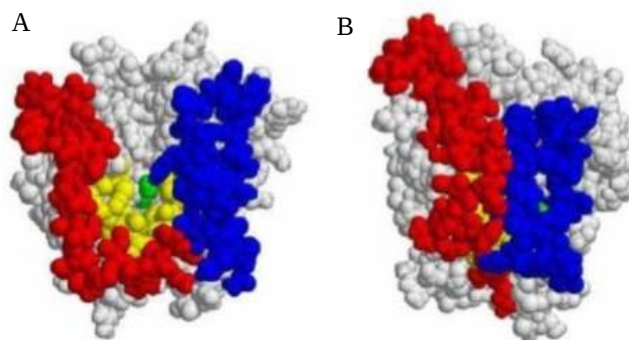


Figura 2. Lipase de *Pseudomonas aeruginosa* nas conformações (A) aberta e (B) fechada. Fonte: Cherukuvada et al., (2005).

As lipases microbianas são glicoproteínas e apresentam em torno de 258 e 544 resíduos de aminoácidos, dos quais a maior parte são hidrofóbicos e responsáveis pela interação entre a enzima e os substratos insolúveis em água, seu sítio ativo é composto por uma folha β pregueada formada por 8 segmentos β ($\beta 1 - \beta 8$), conectadas, interligadas e envolvidas por α -hélices. O sítio ativo é composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato) sendo, portanto, classificadas como serina hidrolases (Fig. 3). O resíduo serina é responsável pela catalise e encontra-se ligado por ligações de hidrogênio ao resíduo histinina, que por sua vez encontra-se ligado a um resíduo carboxilado (aspartato ou glutamato) (Castro et al., 2004; Messia et al., 2011).

Uma característica das lipases associada à presença da tampa que recobre o sítio é a formação de agregados moleculares não covalentes. Nesses agregados, os centros ativos hidrofóbicos dos monômeros, expostos pelo deslocamento da tampa na interface lipase/lipase, entram em contato. A estabilização da forma aberta e ativa dos monômeros em contato formam agregados com novos centros ativos, os quais podem apresentar características catalíticas distintas dos monômeros. O comportamento de agregação pode ser estudado comparando a massa molecular da enzima em condições desnaturantes, como SDS-PAGE, e em condições nativas, como cromatografia de exclusão molecular (Wilson et al., 2006; Lima et al., 2013).

A estrutura molecular atribuída às lipases preenche os requisitos estruturais de uma enzima que é solúvel em meio aquoso, ativa na interface água-óleo e hidrolisa substratos hidrofóbicos (Castro et al., 2004).

A hidrólise do substrato ocorre em duas etapas. Inicia-se com o ataque pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxila do resíduo de serina nucleofílico no carbono carbonílico da ligação éster, ocorrendo a formação de um intermediário tetraédrico. Observa-se em todas essas enzimas a ocorrência da fenda do oxiânion que estabiliza o estado de transição, onde os

intermediários tetraédricos são formados. Na próxima etapa, um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado com a liberação dos ácidos graxos e regeneração da enzima (Reis et al., 2009).

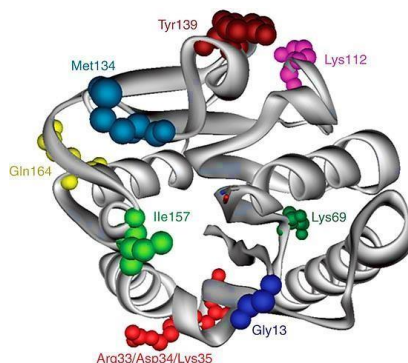


Figura 3. Estrutura tridimensional de uma lipase.
(Fonte: pixshark.com/lipase-enzyme-structure.htm).

2.3 FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES

A utilização de diversos gêneros microbianos para produção de inúmeros compostos bioativos tem aumentado nas últimas décadas devido à grande eficiência que esses organismos apresentam na produção de metabólitos secundários, principalmente as enzimas microbianas (Hanefeld et al., 2013).

Dentre as diversas fontes de enzimas, os micro-organismos compõem um dos maiores recursos genéticos disponíveis. Muitas espécies, inclusive, tem sido alvo para investigação da potencialidade industrial, principalmente como fontes de amilases, celulases, proteases e lipases, que tem especial uso no processamento de alimentos e detergentes (Oyeleke et al., 2011).

Com o avanço no conhecimento das enzimas, os fungos vêm adquirindo um status de destaque para vários tipos de indústrias uma vez que existe a possibilidade de utilizá-las para melhorar vários aspectos do produto final (Soares et al., 2013).

Os fungos filamentosos são micro-organismos que se destacam devido à grande facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio de produção, não sendo necessária, assim, a ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com alto potencial para inúmeras aplicações industriais (Stroparo et al., 2012). Além disso, são facilmente encontrados em ambientes naturais, sendo passíveis de isolamento e testes para produção de uma grande quantidade de enzimas (Almeida et al., 2012).

Para a produção industrial de enzimas, os micro-organismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; produzirem a enzima em velocidade elevada, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação devem ser simples e a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade. O êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos micro-organismos é alcançada quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (Slivinski, 2007).

Dentre os gêneros de fungos filamentosos produtores de lipases de interesse industrial, destacam-se: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (Tab. 2) (Sharma et al., 2001; Mahadik et al., 2002). A produção de lipase varia de acordo com a cepa, meio de cultura e com as condições de cultivo (Cihangir; Sarikaya, 2004).

Tabela 2. Fungos filamentosos relatados como sendo produtores de lipases.

Gênero	Espécie	Referências
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	Reinehra, 2014; Slivinski, 2007
	<i>A. niger</i>	Reinehret al., 2014; Dantas e Aquino, 2010; Mehtra, 2009; Slivinski, 2007; Carvalho, 2005; Mahadik, et al., 2002
	<i>A. japonicus</i>	Satyanarayan and Johri, 1981
	<i>A. awamori</i>	Slivinski 2007
	<i>A. fumigatus</i>	Reinehret al., 2014; Reinehra, 2014; Guimarães, 2008
	<i>A. oryzae</i>	Carvalho, 2005
	<i>A. carneus</i>	Mahadik, et al., 2002; Van Heerdenet al., 2002; Namboodiriet al., 2000; Saxenaet al., 2003
	<i>A.nidulans</i>	Slivinski, 2007; Mayordomoet al., 2000
	<i>A. ustus</i>	Slivinski, 2007
	<i>A. versicolor</i>	Slivinski, 2007
	<i>A. clavatus</i>	Slivinski, 2007
<i>Acremonium</i>	<i>A. strictum</i>	Okeke and Okolo, 1990
<i>Alternaria</i>	<i>A. brassicicola</i>	Bertoet al., 1997
<i>Colletotrichum</i>	<i>C.gloesporioides</i>	Colen, 2006
<i>Fusaium</i>	<i>F.oxyporum</i>	Rapp, 1995
	<i>F.heterosporum</i>	Takahashi et al., 1998
<i>Mucor</i>	<i>Mucor sp</i>	Abbas et al., 2002
	<i>M. javanicus</i>	Ishihara et al., 1975
	<i>M.circinelloides</i>	Balcão et al., 1998
	<i>M. hoemalis</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>M. miehei</i>	Rantakyla et al., 1996; Lacoine et al., 1996;
<i>Penicillium</i>	<i>M. racemosus</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>P. cyclopium</i>	Carvalho, 2005; Chahinianet al., 2000
	<i>P. aurantiogriseum</i>	Lima et al., 2004
	<i>P. candidum</i>	Ruiz et al., 2001
	<i>P. chrysogenum</i>	Ferrer et al., 2000
	<i>P. corylophilum</i>	Baron et al., 2005
	<i>P. restrictum</i>	Castilho et al., 2000; Gama et al., 2000
	<i>P. citrinum</i>	Sztajer and Maliszewska, 1989
	<i>P. roqueforti</i>	Petrovic et al., 1990
Continuação...		

Continuação...		
	<i>P. funiculosum</i>	Hou, 1994
	<i>Penicillium</i> sp.	Helisto and Korpela, 1998
	<i>P. camambertii</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>P. wortmanii</i>	Costa and Peralta, 1999
<i>Phialemonium</i>	<i>Phialemonium</i> sp	Martins, 2008
<i>Rhizomucor</i>	<i>R. miehei</i>	Merek and Bednasski, 1996; Weber et al., 1999; Jaeger and Reetz, 1998; Dellamora-Ortiz et al., 1997
<i>Rhizopus</i>	<i>R. delemar</i>	Carvalho, 2005; Klein et al., 1997; Lacointe, et al., 1996
	<i>R. oryzae</i>	Ghamgui et al., 2004; Hiol et al., 2000; Takahashi et al., 1999
	<i>R. arrhizus</i>	Elibol e Ozer, 2001
	<i>R. nigricans</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>R. nodosus</i>	Nakashima et al., 1988
	<i>R. microsporus</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>R. chinensis</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>R. japonicus</i>	Nakashima et al., 1988
	<i>R. niveus</i>	Kermasha et al., 1998
	<i>R. oligosporus</i>	Dalsenter et al., 2005; Ul-Haq et al., 2002
	<i>Rhizopus</i> sp	Pastore, 2003

2.4 GÊNERO *ASPERGILLUS* MICHELI

Em 1729, o padre-micologista e biólogo chamado de Pier Antonio Micheli descreveu pela primeira vez o gênero *Aspergillus*. Ao observar as estruturas desse gênero ao microscópio, Micheli percebeu a semelhança com a forma de um aspergillum (borrifador/aspergidor de água benta), sendo assim, a espécie foi nomeada de acordo com o objeto (Bennett, 2010).

O gênero *Aspergillus* é um anamórfico pertencente à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes, filo Ascomycota, que compreende 837 espécies (Hawksworth, 2011). Sua reprodução é assexuada e caracteriza-se pela produção de fiálides e conídios em cadeia. O conidióforo de *Aspergillus* é simples, usualmente asseptado e termina numa vesícula, onde estão inseridas as fiálides. Algumas espécies podem produzir células Hülle ou esclerócios (Klich, 2002).

O tamanho, cor e ornamentação da parede dos conídios são importantes características taxonômicas (Bennett, 2010). Outras características morfológicas usadas na identificação de espécies são as cores e diâmetro da colônia, a produção de exudatos e pigmentos solúveis, taxa de crescimento, termotolerância e a presença de esclerócio ou clestotécio. As características morfológicas dos esclerócios, como cor, forma e tamanho, também devem ser consideradas na identificação das espécies (Klich, 2002).

Após a primeira descrição do gênero *Aspergillus* feita Micheli (1729), muitas outras espécies começaram a ser descritas por Thom; Church (1926). Thom; Church (1926), baseados

em caracteres morfológicos, aceitaram 69 espécies de *Aspergillus*, onde foram divididas em 11 grupos. Thom; Raper (1945) estabeleceram 77 espécies para o gênero, com 10 variedades em 14 grupos. Raper; Fennell (1965) descreveram 132 espécies pertencentes ao gênero e as subdividiram em 18 grupos, com base em características culturais e morfológicas. Em 1985, Gams et al. reorganizaram os grupos em seções pertencentes a seis subgêneros: *Aspergillus*, *Circumdati*, *Clavati*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Ornati*.

Em 2000, Pitt et al. publicaram uma lista com os nomes das espécies aceitas e sinônimos na família *Trichocomaceae*. Duzentas e quatro espécies foram aceitas para o gênero *Aspergillus* e teleomorfos associados. Peterson (2000) em um estudo filogenético com o rDNA de 215 *Aspergillus*, sugeriu uma alteração na nomenclatura, onde as espécies estariam em três subgêneros e 16 seções (Tab. 3).

Tabela 3. Subgêneros e seções para o gênero *Aspergillus* segundo Peterson (2002).

Subgênero	Seção
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Candidi</i> , <i>Cervini</i> , <i>Circundati</i> , <i>Cremeri</i> , <i>Flavi</i> , <i>Flavipedis</i> , <i>Nigri</i> , <i>Restricti</i> , <i>Terrei</i> e <i>Wentii</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Clavati</i> e <i>Fumigati</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulans</i> , <i>Ornati</i> e <i>Sparci</i>

O gênero *Aspergillus* representa um anamorfo de ascomiceto pertencente à ordem *Eurotiales*, caracterizado pela produção de esporos assexuais (Klich; Pitt, 1988). A taxonomia clássica do gênero baseia-se nos caracteres morfológicos e fisiológicos, bem como nas características reprodutivas observadas (Raper; Fennell, 1965; Klich, 2002). O gênero é de fácil identificação, porém a identificação em nível de espécie é considerada algumas vezes complexa.

Microscopicamente, o gênero é caracterizado por apresentar a base do conidióforo em forma de “T” ou “L”, onde estão conectados com a hifa vegetativa. Esta forma é comumente denominada de “célula pé” e quando visualizada pelos taxonomistas são logo identificados como pertencente ao gênero *Aspergillus*. O conidióforo é o ramo que se desenvolve a partir da “célula pé”, podendo apresentar diferentes comprimentos. No ápice do conidióforo é formada a vesícula através da expansão do conidióforo. A forma da vesícula (esférica, hemisférica, alongada ou elíptica) constitui uma característica de identificação da respectiva espécie. Quanto

à cor, esta estrutura apresenta-se igual ao conidióforo ou incolor. O conjunto da vesícula, das células conidiogêneas também denominadas por fiálides, e, das cadeias de conídios, é designado por cabeça aspergilar. Esta é suportada por um conidióforo que é em regra perpendicular à célula pé. As fiálides, que formam cadeias basípetas de esporos, designados de fialoconídios, inserem-se na vesícula e podem constituir uma ou mais séries (Mata-Gomez et al., 2009; Carvalho, 2013).

Quanto ao aspeto macroscópico, as colônias apresentam uma superfície de cor branca, na fase inicial de maturação. Dependendo das espécies, a sua cor pode evoluir para verde, amarelo, castanho ou preto. A textura da colônia surge algodoada, tornando-se pulverulenta com a produção de esporos, os quais podem apresentar rugosidade da parede, característica igualmente importante na identificação de espécie (Fig. 4) (Murray et al., 2006).

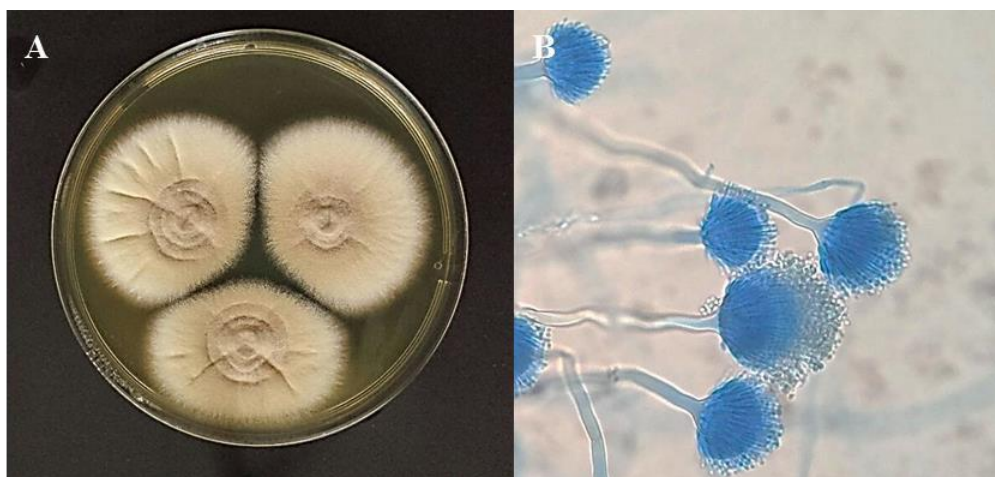


Figura 4. Imagens de *Aspergillus terreus* URM 4199; Macroscopia (A) e microscopia (B).
Foto: Cyndy Mary Farias.

Segundo Samson et al., (2000), a taxonomia de *Aspergillus* é complexa e encontra-se sempre em evolução. A identificação deste gênero tem sido tradicionalmente baseada na caracterização morfológica e cultural (Raper; Fennel, 1965). O perfil bioquímico e os traços ultramicroscópicos, por exemplo, a ornamentação dos esporos passou a suplementar as características para identificação da espécie (Kozakiewicz, 1989). No entanto, em várias seções, a variação morfológica deste gênero ocorre, resultando em esquemas taxonômicos discutíveis (Samson et al., 2004; Hong et al., 2005).

Neste sentido, a taxonomia de *Aspergillus* e seus teleomorfos recentemente têm sido reinvestigada, utilizando-se uma abordagem polifásica interagindo características bioquímicas, ecológicas, genéticas e moleculares, a fim de examinar a variabilidade dentro da espécie e adicionar ou reclassificar as espécies dentro do gênero (Silva et al., 2015).

A região do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) é considerada padrão ouro para a identificação de fungos (Rodrigues, 2010), mas, para alguns gêneros principalmente *Aspergillus* e *Fusarium*, esta região não tem discriminado as espécies. Sendo assim, outras regiões conservadas como os genes codificadores da calmodulina e da tubulina têm sido utilizadas para obter um resultado mais eficiente, baseado nos estudos filogenéticos. Portanto, as espécies que possuem poucas diferenças de nucleotídeos são consideradas mais próximas, quando comparadas com aquelas que apresentam significativa diferença molecular (Samson, Vargas, 2012).

Recentemente, a identificação e a caracterização dos fungos têm sido realizada utilizando-se a abordagem polifásica, que consiste na aplicação de diferentes técnicas, que associam metodologias tradicionais como macro e micromorfologia, os dados fenotípicos, bioquímicos e metodologias modernas, como a biologia molecular e a análise espectral de massa (Santos et al., 2010; Carolis et al., 2012).

Simões et al., (2013), mostra que em uma abordagem polifásica, a primeira técnica utilizada é a morfologia, seguida da bioquímica, análise espectral e, por último, a biologia molecular. Esta ordem foi estabelecida de acordo com os custos e o tempo de resposta das determinadas técnicas. Todos os dados obtidos pela abordagem polifásica são analisados e posteriormente comparados uns com os outros, até chegar a uma correta identificação.

2.4.1 *Aspergillus* seção *Terrei*

A utilização de técnicas de identificação molecular vem revelando um número crescente de novas espécies de *Aspergillus* na seção *Terrei*, através da análise das sequências de partes amplificadas do β -tubulina e calmodulina e dos genes da região espaçadora transcrita interna (ITS), além da observação da macro e micromorfologia das culturas (Samson et al., 2011). *Aspergillus terreus* foi a única espécie atribuída ao grupo de espécies da seção *Terrei* por Raper & Fennell (1965). Estudos têm indicado uma vez que esta seção deve ser ampliada para incluir um número de outras espécies. Além *A. terreus* e suas variedades, a seção *Terrei* também inclui *A. niveus*, *A. carneus*, *A. niveus* var. *indicus*, *A. allahabadii*, *A. ambiguus* e *A. microcysticus* (Peterson 2008, Varga et al., 2005). No trabalho de Samson et al., (2011), mostra que as primeiras três espécies foram anteriormente colocados na seção *Flavipedes* e a última três espécies foram colocadas na seção *Versicolores*.

2.5 FERMENTAÇÃO

Fungos do gênero *Aspergillus* são muito utilizados na biotecnologia. Espécies como *A. oryzae* é grande produtor de α -amilases, α -galactosidase e enzimas pectinolíticas (Shankar, Mulimani, 2007). O *A. niger* é importante na produção comercial das enzimas β -galactosidase, amiloglucosidase e pectinases (Liu et al., 2006). Botella et al., (2007) avaliaram a produção de xilanases e pectinases por *A. awamori*. Farias et al., (2015), relataram o isolamento de *A. candidus* como um novo produtor de lipases. Segundo Hamdy; Tahon (2012), *Aspergillus terreus* var. *africanus* vem se destacando como espécie produtora de lipases termoestáveis. O crescimento dos fungos para produção desses metabólitos está relacionado aos tipos de processos fermentativos bem como à disponibilidade de substâncias que os satisfaçam nutricionalmente e de condições favoráveis como concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, pH do cultivo, temperatura de crescimento e concentração de oxigênio dissolvido. Muitos estudos têm tratado da otimização de meios de cultura, em processos fermentativos, para a produção de determinada substância de interesse (Açikel et al., 2010; Rigo et al., 2010).

A produção de lipases pode ser realizada por dois tipos de processos; a fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) (Martins, 2001; Farias et al, 2015). A FS consiste no crescimento do microrganismo sobre um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, sendo este o processo mais utilizado para a produção de lipases (Romero et al., 2012).

2.5.1 Fermentação Submersa (FS)

As enzimas de interesse industrial, em especial as lipases, têm sido produzidas principalmente por culturas líquidas submersas. As fermentações submersas (FS) apresentam grande homogeneidade e, conseqüentemente, eficiente transferência de nutrientes, principalmente quando o substrato utilizado é um triglicerídeo (Ribeiro et al., 2011).

O cultivo submerso utiliza um meio fermentativo, onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis ou suspensas em pequenas partículas no líquido, normalmente água ou solução de sais e o desenvolvimento do se dá em presença de água livre (Feitosa, 2009; Orlandelli et al., 2012). Esta é a técnica mais utilizada nos países ocidentais para a produção de enzimas devido à facilidade de crescimento dos micro-organismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (Orlandelli et al., 2012).

Segundo Mitchell (2006), na fermentação submersa, o micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas. O conteúdo de

água nesse processo é superior a 95%, nos processos de fermentação em escala industrial são utilizados fermentadores com grande capacidade de volume. Já em escala laboratorial, frascos e agitadores de bancada são utilizados.

Sant'anna Júnior (2001), afirma que tanto na fermentação submersa quanto na sólida, é necessária constante verificação da possível ocorrência de contaminação, infecção por bacteriófagos e proliferação de micro-organismos mutantes de menor eficiência para a produção enzimática. Neste sentido, Alonso (2001) destaca que o cultivo submerso apresenta maiores riscos de contaminação devido à grande quantidade de água livre no meio. Apesar dos maiores riscos com contaminações, os processos de fermentação submersa permitem maior controle das condições de cultivo em relação aos processos de fermentação em estado sólido, que por sua vez, apresenta como vantagem a redução dos custos da produção enzimática, já que não necessita de um meio de cultivo especial, sendo normalmente constituído pela matriz sólida que é umedecida com água (Castro et al., 2004).

De acordo com Alonso (2001), os meios de cultivo a serem utilizados nos processos fermentativos podem ser formulados a partir de matérias-primas naturais, como por exemplo, resíduos agroindustriais, ou a partir de meios sintéticos onde os compostos são quimicamente conhecidos, sendo que para facilitar o desenvolvimento microbiano e garantir uma maior produção enzimática, os meios de cultivo devem conter fontes de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento e micronutrientes.

2.6 SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES

2.6.1 Óleo de oliva

Trabalhos têm sido realizados utilizando-se azeite de oliva como fonte de carbono para produção de lipases, sendo este um óleo padrão para produção desta enzima (Ribeiro et al., 2011).

A oliveira (*Olea europea* L.) pertence à família Oleaceae. É uma das árvores frutíferas mais importantes em países mediterrânicos, onde cobrem 8 milhões de hectares, o que representa quase 98% da safra mundial. As árvores de oliva foram cultivadas pela primeira vez há mais de 5.000 anos na Síria, Líbano e Israel. No entanto foram os gregos os primeiros a exportar o óleo de oliva. Naquela época o óleo era utilizado como medicamento, unguento ou bálsamo, perfume, combustível para iluminação e impermeabilizante de tecidos. Isto demonstra a importância econômica e social da cultura e os possíveis benefícios a serem extraídos da utilização de qualquer um dos seus derivados (Oliveira, 2001; Pereira et al., 2007).

Atualmente, existem vários produtores de óleo de oliva (Azeite) (Fig. 5-C) em todo mundo, dentre os quais se destacam: Argentina, Argélia, Espanha, Itália, Líbia, Marrocos, Portugal, Tunísia, Turquia, França e Grécia. O azeite de oliva é o único extraído de uma fruta, os demais azeites são extraídos de um grão, uma semente ou noz (Pio et al., 2005). Esta planta foi tradicionalmente cultivada sob condições de chuva, mas a demanda para seus produtos fez necessário a implantação do método de irrigação em muitas áreas. A oliveira (Fig. 5-A) no entanto é uma árvore muito tolerante à seca (Moriani et al., 2002).

Olea europaea L. é amplamente estudada pelo seu uso alimentar. O fruto (Fig. 5-B) possui um alto teor de gorduras monoinsaturadas, sendo esta fruta constituída de água (50%), óleo (22%), açúcar (19%), celulose (5,8%) e proteínas (1,6%). As folhas são importantes pelos seus metabolitos secundários. O fruto e o óleo são componentes essenciais na dieta diária de uma grande parte da população do mundo (Pereira et al., 2007).

O óleo de oliva (também chamado de azeite de oliva) (Fig. 5-C) é extraído a partir do fruto devido ao óleo (15 a 35%) estar localizado nas células do mesocarpo das azeitonas, pelo método de pressão, centrifugação, sistemas de filtragem (Awan et al., 2003). O azeite recém produzido tem uma aparência opaca, devido à presença de partículas sólidas da vegetação e a micro-gotas de água dos frutos. Estudos microbiológicos recentes tem mostrado que uma micro-flora rica está presente na fração de suspensão do óleo de oliva produzindo lipases, capaz de melhorar a qualidade do óleo, através da hidrólise dos triglicerídeos (Ciafardini et al., 2006).



Figura 5. Aspectos gerais da oliveira: (A) planta, (B) fruto e (C) óleo de oliva. Fonte: www.scienze-naturali.com.

2.6.2 Resíduo de pescado

A aquicultura brasileira encontra-se em um momento de expansão atribuído, principalmente, ao surgimento de políticas públicas de incentivo à produção e ao consumo de

organismos aquáticos. Segundo os dados do Boletim Estatístico do então Ministério da Pesca e Aquicultura (2011), houve um acréscimo de 31,2% na produção total aquícola brasileira no triênio 2008 - 2010, partindo de 365.367 t para 479.399 t, respectivamente. Este cenário produtivo está associado, principalmente, à presença de ambientes interiores e costeiros favoráveis à prática da pesca e aquicultura brasileira e às condições climáticas propícias para o crescimento de diversos organismos aquáticos que inclui algumas espécies nativas com excelente potencial para cultivo e comercialização. Assim, recentemente, a consolidação de políticas públicas para o setor, convergindo suas ações para a melhoria das condições de trabalho dos pescadores, liberação e recuperação de áreas destinadas ao cultivo de peixes e incentivo ao comércio e consumo do pescado, contribuiu para a melhoria no cenário produtivo (Brasil, 2012; Lima, 2013).

Nas diferentes etapas da cadeia produtiva da piscicultura, desde a produção até a comercialização no varejo, é gerada uma quantidade significativa de resíduos orgânicos. Devido à heterogeneidade de crescimento dos peixes durante a produção, pode ocorrer o descarte desses animais durante as classificações e despescas, quando eles não atingem o tamanho comercial, sendo possível a sua utilização como resíduo da produção (Silva et al., 2014).

A Tilápia, *Oreochromis niloticus* L. (Fig. 6), é a segunda espécie de peixe de água doce mais cultivada em todo mundo possui rendimento médio em filé de 30- 40% aproximadamente, e os outros 60 -70% do corpo é transformado em resíduos, que incluem: cabeça, carcaça, vísceras, pele e escamas (Silva et al., 2014). As vísceras são excelentes fontes de enzimas digestivas, dentre elas as proteases, com propriedades interessantes para processos biotecnológicos como, por exemplo, na degradação de subprodutos ricos em proteínas, enquanto a carcaça é um material rico em proteína e gordura (Boscolo et al., 2007). O aproveitamento desses resíduos é ecologicamente recomendável, em razão da alta carga de matéria orgânica que seria descartada no ambiente, se esses resíduos não fossem aproveitados. Existem várias utilidades nesse tipo de aproveitamento: extração de colágeno (escamas e peles) para a indústria farmacêutica e alimentícia; curtimento de pele para a indústria mobiliária, vestuário, artesanato e diferentes objetos; produção de polpa para fabricação de empanados; cozinha institucional (da merenda escolar, restaurantes universitários, restaurantes de empresas, hospitais, presídios, etc.); farinha e silagem de peixe (Vidotti; Gonçalves, 2006).



Figura 6. Tilápia (*Oreochromis niloticus* L.). Fonte: <http://pixshark.com>.

Os resíduos da indústria de peixe são ricos em compostos orgânicos e inorgânicos, o que gera preocupação relativa aos potenciais impactos ambientais negativos decorrentes da disposição deste material diretamente no ambiente ou oferecido in natura aos peixes cultivados (Feltres et al., 2010). De forma geral, os resíduos são partes excedentes das atividades agroindustriais, sendo classificados como componentes gasosos, líquidos ou sólidos e que, quando lançados no meio ambiente sem o devido tratamento, poderão ocasionar sérias alterações nas características do ar, da água e do solo, tornando-se prejudiciais para toda a vida aquática e terrestre. Transformar os materiais descartáveis e poluentes em coprodutos com valor agregado é a base para o desenvolvimento sustentável do mundo moderno. Logo, reduzir o uso inconsciente de matéria-prima para evitar desperdícios e promover a reciclagem dos resíduos são condições essenciais para a garantia de processos mais econômicos e de menor impacto ambiental (Almeida et al., 2013; Lima, 2013).

Martins (2011) também relata em seu trabalho que a obtenção de filés caracteriza o menor grau de aproveitamento do pescado, resultando, conseqüentemente, em uma maior geração de resíduos. O processo de beneficiamento do pescado que normalmente ocorre nas peixarias está representado no fluxograma (Fig. 7), em que estão indicados os resíduos gerados durante cada etapa.

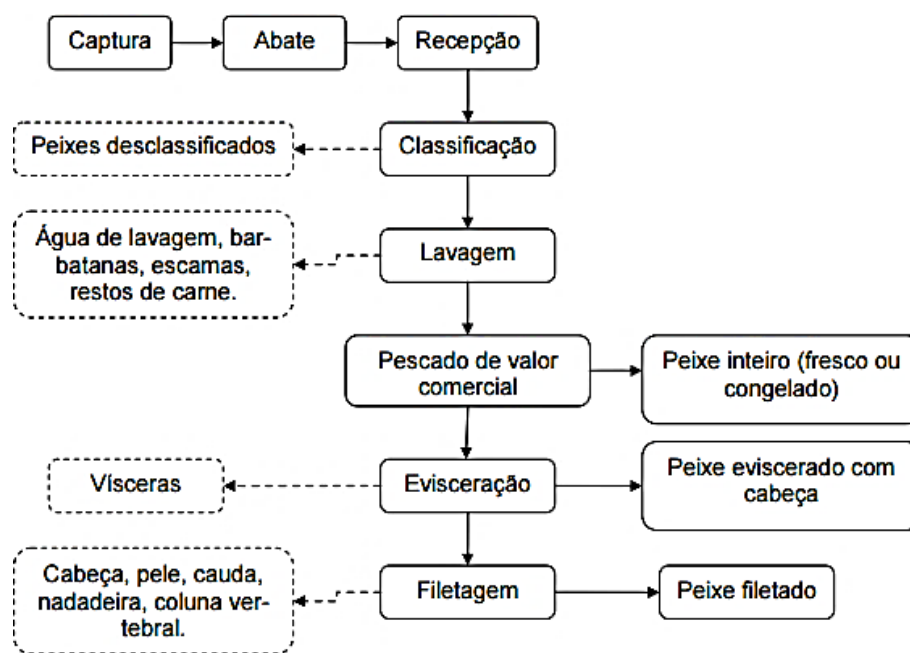


Figura 7. Fluxograma geral do processo de beneficiamento de pescados, com a indicação do processamento (setas contínuas) e dos resíduos gerados (setas pontilhadas). Adaptado de Feltes et al., (2010).

O destino correto dos resíduos permite que uma receita adicional seja gerada para as unidades processadoras com a inserção de novos produtos no mercado, evitando desperdícios e o impacto no meio ambiente. Assim, a busca por alternativas viáveis para o aproveitamento dos resíduos gerados não só em grande escala, mas também para pequenas produções faz-se necessária. Nesse contexto, surgem do resíduo, o hidrolisado e o óleo de peixe como alternativa de substrato para produção de lipases.

2.6.2.1 Hidrolisado de Proteico de Peixe (HPP)

Hidrolisado proteico de peixe (HPP) é um produto constituído por aminoácidos livres e peptídeos que apresentam uma vasta gama de massas moleculares resultantes do maior ou menor grau de hidrólise das proteínas do pescado (Gonçalves, 2011). Os hidrolisados podem ser obtidos por hidrólise química (ácida ou alcalina) e por hidrólise enzimática (enzimas endógenas e exógenas) (Martone et al., 2005).

A hidrólise enzimática de pescado é um método que objetiva a recuperação de proteínas de espécies subtilizadas ou de resíduos de processamento que seriam desperdiçados através do emprego de enzimas proteolíticas extraídas do trato digestório do próprio peixe ou através de enzimas comerciais, para solubilização da proteína do pescado, resultando em duas frações:

solúvel e insolúvel. A fração insolúvel é desprezada e a fração solúvel, que contém a proteína hidrolisada, pode se constituir em ingrediente a ser incorporado aos alimentos elaborados e destinados ao consumo humano e animal (Silva et al., 2014).

O fluxograma para obtenção do hidrolisado proteico de pescado por hidrólise enzimática pode ser visto na Figura 8.

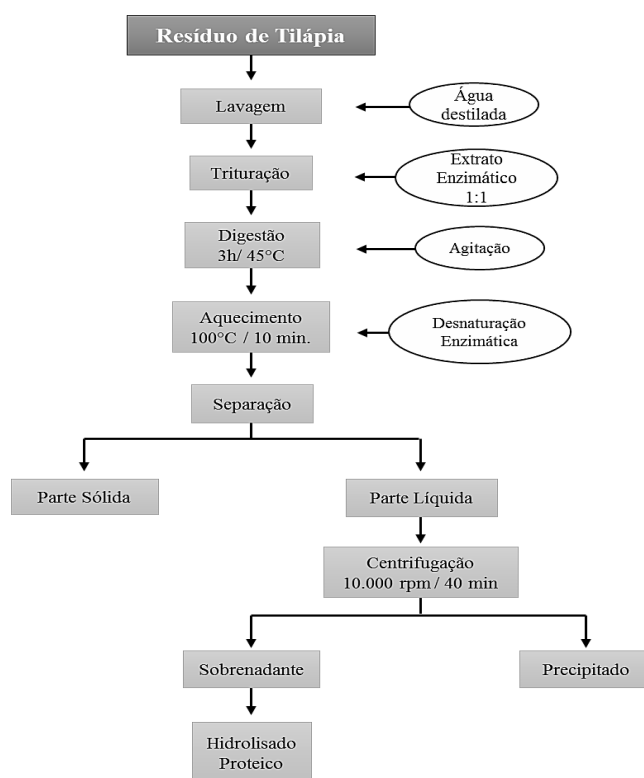


Figura 8. Procedimento para a obtenção do hidrolisado proteico de peixe (*Colosso macropomun*). Fonte: Bezerra (2000).

A maioria das pesquisas realizadas tem demonstrado tratar-se de uma excelente fonte de proteína, com bom valor nutritivo, podendo ser adicionado na elaboração de rações para alimentação de organismos aquáticos (Bezerra, 2006; Silva et al., 2014; Valle et al., 2015) bem como adicionado em rações para o consumo animal, empregado, por exemplo, como substituto do leite no desmame de bezerros e leitões (Berge; Storebakken, 1996). No entanto, ainda não existe relato sobre sua utilização como substrato para produção enzimática.

2.6.2.2 Óleo de Peixe

A industrialização de peixe gera uma quantidade expressiva de resíduos ricos em proteínas e em ácidos graxos de cadeia longa. Os resíduos sólidos do beneficiamento de peixe são destinados principalmente à alimentação animal, mas também podem ser aproveitados para a produção de cosméticos, detergentes, tintas, vernizes e biodiesel (Feiden; Boscolo, 2007). Em geral, o óleo de peixe é composto de uma variedade de ácidos graxos (saturados, mono e poli-insaturados) e alto teor de vitaminas, em especial a vitamina A (Feldes et al., 2010), tratando-se de um importante subproduto obtido juntamente com a farinha de pescado (Lima, 2013).

A obtenção do óleo de pescado provém das etapas de cozimento e prensagem. Todo o *liquor* removido da massa de pescado é misturado e depois centrifugado a uma temperatura de 80 °C para a obtenção de um óleo primário, também denominado óleo bruto. Posteriormente, esse óleo é armazenado e pode ser comercializado sob forma de aditivo para a formulação de ração animal ou receber um processamento específico e refino para a obtenção de um óleo clarificado, inodoro, insípido e com estabilidade oxidativa máxima para a utilização na alimentação humana (Fig. 9).

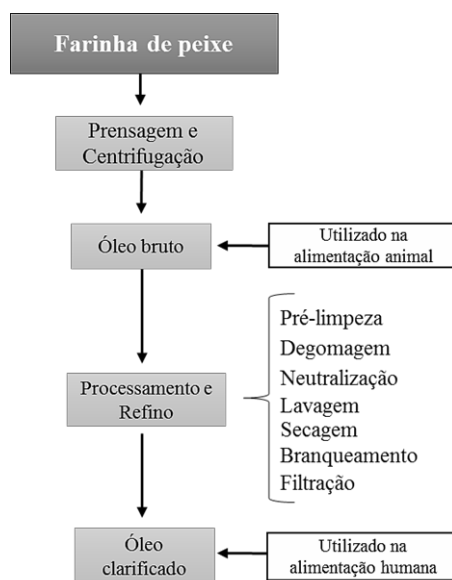


Figura 9. Fluxograma do procedimento para a obtenção do óleo de pescado. Fonte: adaptado de Moraes et al., (2001).

A característica final do óleo pode depender muito da composição lipídica da matéria-prima utilizada no processo (Tab. 4). Peixes produzidos em sistemas de criação intensiva, por exemplo, possuem uma deposição de gordura maior comparada com os de captura, em razão da alimentação e do peso de abate. Resíduos de peixes abatidos com peso abaixo de 800 gramas

produzem, em média, 85% de farinha e 15% de óleo, enquanto que os resíduos de peixes abatidos com peso acima de 800 gramas podem gerar um porcentual de até 70% de farinha e 30% de óleo (Vidotti; Gonçalves, 2006).

Tabela 4. Composição em ácidos graxos do óleo de hidrolisado de peixe Tilápia. Fonte: Bastos (2013).

Ácidos graxos	%(m/m)
ácido mirístico (C14:0)	2,6
ácido palmítico (C16:0)	3,4
ácido linoleico (C18:2)	31,9
ácido oleico (C18:2)	32,4
ácido esteárico (C18:0)	22,2
ácido (C20:0)	7,5

%(m/m): percentagem em massa

A qualidade do óleo produzido pode, também, sofrer variações dependendo do controle de qualidade no processamento, das formas de proteção contra a oxidação de gorduras e das condições de armazenamento (Vidotti; Gonçalves, 2006). Além disso, o Brasil, com toda a sua potencialidade pesqueira, carece de processos tecnológicos adequados de refino do óleo de pescado para o uso, por exemplo, em alimentação humana. Segundo Lima (2003) Os suplementos alimentares à base de óleo de peixe contendo alto teor de ácidos graxos ômega-3, por exemplo, apresentam grande demanda de mercado, porém são processados no exterior e importados apenas para serem encapsulados pelas indústrias brasileiras.

Arruda (2004) comenta que as vísceras de peixe geralmente têm uma grande quantidade de lipídeos e o óleo extraído dessas partes pode fornecer uma abundante e econômica fonte de matéria prima para produção de ésteres com alto valor agregado, pois sua composição inclui os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) das series ômega 3 e ômega 6. Segundo Rubio-Rodriguez et al., (2010) o óleo de Tilápia pode fornecer cerca de 61% de AGI, o que pode incluir as series ômega-3 e ômega-6. No entanto, ainda não existe relato na literatura da extração do óleo de peixe a partir do hidrolisado proteico, produto originado da hidrolise enzimática e mecânica da carcaça de Tilápia.

A obtenção desse óleo se dá inicialmente com a passagem do hidrolisado proteico em uma desnatadeira, a qual o separará em duas porções, uma porção proteica e outra porção

oleosa. Posteriormente, a porção oleosa é submetida a uma centrifugação de 12.000 rpm por 15 min a 4 °C, sendo recolhido o sobrenadante após a finalização do processo (Fig. 10).



Figura 10. Processo de extração do óleo a partir do hidrolisado proteico de peixe Tilápia. (A) porção oleosa após a separação na desnatadeira da porção proteica; (B) óleo após o processo de centrifugação junto com as cinzas; (C) óleo coletado como sobrenadante e estocado em tubos Falcon. Foto: Cyndy Mary Farias.

O óleo de peixe Kilka é um subproduto de fábricas Kilka de farinha de peixe, o qual já é usado em indústrias de couro, alimentação de peixes de viveiro e de comida de aves. Ghasemi et al. (2014) relatam a utilização do óleo de peixe Kilka como substrato para produção de lipases por *Aspergillus niger*. Mesmo sendo um óleo já utilizado em diversos setores industriais, ainda não existe relato da produção de lipases microbianas utilizando óleo de Tilápia como substrato.

2.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES

2.7.1 Planejamento estatístico

Um experimento é executado com o intuito de se determinar as variáveis experimentais e as interações entre elas que possuem influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse (Lundstedt et al., 1998). Segundo Rodrigues e Iemma (2009), o planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, e indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas.

A produção e otimização dos parâmetros que influenciam a síntese enzimática devem ser sempre investigada porque as condições ideais variam entre os diferentes organismos e diferentes enzimas, sejam elas extracelulares ou intracelulares (Ribeiro et al., 2011). Em muitos casos, a interação dos parâmetros que influenciam o processo de fermentação pode ser avaliada com um reduzido número de testes usando um desenho experimental. Vários modelos de desenho experimental poderiam ser usados para reduzir o número de experiências em diferentes condições. Entre eles estão o Plackett - Burman, Doehlert, Planejamento Composto Central e Box- Behnken (Li et al., 2007).

Os métodos tradicionais de otimização são caros por requer um grande número de variáveis e consomem muito tempo para a sua conclusão. A otimização através do Planejamento Plackett-Burman (PB) e superfície de resposta, podem limitar as variáveis e com isso reduzir o tempo do experimento.

Segundo Kong et al., (2012), o Planejamento Plackett-Burman (PB) é um método valioso para a seleção dos componentes significativas do meio de cultivo que influenciam a produção de lipases a partir de um grande número de variáveis componentes, obtendo-se um conjunto menor de variáveis. Um número total de experiências deve ser efectuada de acordo com planejamento Plackett-Burman design, por exemplo $n + 1$, em que n é o número de variáveis. Cada variável é representado em dois níveis, alto e baixo denotado por (+) e (-), respectivamente. Cada coluna deve conter igual número de sinais positivos e negativos.

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma ferramenta complementar que pode ser utilizada para potencializar a otimização após o uso de outros planejamentos estatísticos, para conhecermos o nível ótimo das variáveis selecionadas e estudar as suas interações. A RSM é um processo que envolve três passos importantes: realizar as experiências concebidas estatisticamente, estimando o coeficientes em um modelo matemático prevendo a resposta e verificando a adequação do modelo (Kong et al., 2012).

Bensalah et al., (2010) comenta que o planejamento Doehlert possui uma série de vantagens, tais como: (1) o seu domínio experimental com esférica uma uniformidade em espaço de enchimento, (2) a sua capacidade para explorar todo o domínio, e (3) o seu potencial para sequencialmente, onde os experimentos podem ser reutilizados quando as fronteiras não foram bem escolhidas no primeiro. Kiran et al., (2010) explica que o Planejamento Doehlert é facilmente aplicado a variáveis otimizadas e oferecem vantagens sobre o planejamento de Composto Central (CCD) e planejamento Box- Behnken, utilizados na análise de superfície de resposta, precisando de menos experimentos, que são mais eficientes e pode mover-se através do domínio experimental. Outra vantagem do Doehlert, segundo Sautour et al., (2001) sobre o

planejamento CCD é a possibilidade de adicionar um outro fator ou deslocar o planejamento para um novo domínio experimental.

Box-Behnken (1960) desenvolveu uma família de planejamentos de 3 níveis eficientes para modelar superfície de resposta de ordem 2. Os planejamentos de Box-Behnken diferem dos planejamentos de composição central de duas maneiras. Em primeiro lugar, apenas 3 níveis para cada fator são empregados. Em segundo lugar, os planejamentos Box-Behnken não têm pontos de vértices, sendo assim, algumas vezes, preferidos ao invés de planejamentos de composição central, pois quando há restrições físicas ou econômicas, eles impedem a utilização de pontos de vértices, ou seja, quando todos os níveis dos fatores estão em um extremo. Em alguns experimentos de superfície de resposta, é necessário utilizar fatores com 3 níveis (baixo, médio e alto), neste caso os experimentos de Box-Behnken são uma boa alternativa para o experimento de composição central. Além disto, existe informação suficiente para realizarmos um teste de falta de ajuste (*lack of fit*). Uma outra característica interessante neste tipo de experimento é a simetria da disposição dos pontos no cubo.

Basicamente, este processo de otimização envolve três grandes etapas: realização dos experimentos projetados estatisticamente, estimar os coeficientes de um modelo matemático e prever a resposta e verificar a adequação do modelo. Vários pesquisadores têm aplicado estas técnicas para otimizar diferentes parâmetros do processo (Imandi et al., 2007).

O planejamento estatístico pode vir a ajudar na escolha das variáveis que influenciam na produção de lipases. Diversos fatores como fontes de carbono e nitrogênio, presença de lipídeos, de indutores ou inibidores, concentrações de sais inorgânicos, disponibilidade de oxigênio, temperatura e pH, podem ser verificados como variáveis de um planejamento.

2.7.2 Efeito das fontes de carbono

As fontes de carbono comumente mencionadas em trabalhos de produção de lipases microbianas são azeites de oliva, de palma, Tween 20 e 40, trioleína e tripalmitina, frutose, óleos de soja, girassol, algodão e milho. De acordo com Sharma et al., (2001), as fontes lipídicas de carbono parecem essenciais para a obtenção de elevados rendimentos, todavia, alguns autores têm produzido lipases na ausência de óleos e graxas com bons rendimentos. Dalmau et al. (2000) reportaram que a produção de lipases por espécies de *Candida* é inibida na presença de açúcares simples.

Azeite de oliva foi utilizado para a produção de lipases por células livres e imobilizadas de *Aspergillus niger* no estudo realizado por Ellaiah et al. (2004). Foram testadas concentrações

de 0 (zero) a 1,25% de azeite de oliva, sendo as maiores atividades enzimáticas (U mL^{-1}) obtidas na concentração de 1% da fonte de carbono, tanto pelas células livres como pelas imobilizadas. Já D'Annibale et al. (2006) estudaram a utilização de efluentes do processo de extração de azeite de oliva como substratos para a produção de lipases. Foram testados vários microrganismos, dentre os quais *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citinum*, *Rhizopus arrhizus* e *R. oryzae*. O microrganismo que apresentou os melhores resultados foi *C.cylindracea* NRRL Y-17506, o qual foi estudado como modelo. A produção de lipases foi afetada pela adição de fontes de carbono suplementares como o azeite de oliva e os óleos de soja e milho, na concentração de $3,0 \text{ g L}^{-1}$. A adição do azeite de oliva aumentou a atividade enzimática de 1,24 para $9,0 \text{ U mL}^{-1}$, enquanto que a adição dos óleos de milho e soja resultou em atividades de 6,42 e $6,34 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente.

As fontes de carbono simples como glicose, galactose, frutose, xilose, sacarose, glicerol, sorbitol e manitol foram utilizadas por Lin et al., (2006) para a produção lipases por *Antrodia cinnamomea*, um basidiomiceto, em processos submersos. Os melhores resultados foram atingidos com os álcoois, de $26,69 \text{ U mL}^{-1}$ para o glicerol, $10,70 \text{ U mL}^{-1}$ para o sorbitol e $8,25 \text{ U mL}^{-1}$ para o manitol.

O óleo de gergelim foi utilizado na concentração de 0,5% como fonte de carbono para a produção de lipases pelo microrganismo *Fusarium solani* em bioprocessos submersos, tendo apresentado o melhor resultado de atividade enzimática ($0,88$ ou $0,45 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína) dentre os óleos testados (trioleína, coco, milho, palma e oliva). O óleo de gergelim, embora tenha levado aos melhores resultados em atividade enzimática, apresentou as menores quantidades de proteína extracelular (o que indica maior atividade por unidade de proteína) e as menores concentrações de biomassa, o que seria uma vantagem comercial da produção (Sharma et al., 2001).

2.7.3 Efeito das fontes de nitrogênio

As fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas podem ser utilizadas para a produção de lipases. As fontes orgânicas podem ser a peptona, água de maceração de milho, farinha de soja, aminoácidos, triptona, extrato de levedura e ureia. As fontes inorgânicas como os sais de amônio (sulfatos, fosfatos, cloretos), nitratos e nitritos podem ser utilizados, embora os melhores rendimentos em lipases tenham sido obtidos através de fontes orgânicas de nitrogênio, tais como peptona, extrato de levedura e torta de soja. O sulfato de amônio apresentou

resultados negativos em alguns trabalhos. Entretanto, a produção de lipases foi incrementada quando o sulfato de amônio foi associado a fontes de nitrogênio orgânicas (Sharma et al., 2001).

Fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas foram utilizadas para a produção de lipases em bioprocessos submersos por um basidiomiceto. As fontes comparadas foram adicionadas ao meio na concentração de 0,5%, sendo elas: triptona, peptona, caseína, glicina, prolina, glutamina, asparagina, cloreto de amônio, sulfato de amônio, oxalato de amônio, acetato de amônio, nitratos de sódio e potássio e nitrito de sódio. Os melhores resultados foram obtidos com os aminoácidos asparagina (6,41 UmL⁻¹), glicina (5,36 UmL⁻¹) e glutamina (4,74 UmL⁻¹) e com a triptona (4,77 UmL⁻¹) (Lin et al., 2006).

Há casos em que a fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultivo influencia os níveis de adição da fonte de carbono, o que foi demonstrado por Falony et al. (2006), os quais otimizaram um meio de cultivo para a produção de lipases via fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus niger*. O farelo de trigo foi utilizado como suporte para o crescimento do fungo, a glicose como fonte de carbono, o azeite de oliva como indutor da produção de lipase e como fontes de nitrogênio o sulfato de amônio e a ureia. A fim de otimizar o meio de cultivo para a síntese enzimática foram realizados três Planejamentos Experimentais do tipo Box-Behnken, sendo as variáveis experimentais a concentração de glicose, a umidade do meio de cultivo e a concentração de azeite de oliva.

2.7.4 Efeito das condições ambientais

Entre os parâmetros físico-químicos, o pH e a temperatura desempenham importantes papéis no processo de produção e otimização enzimática. A estabilidade frente a diferentes faixas de pH, normalmente é realizada em torno da neutralidade, mas também em valores de pH fortemente ácidos (pH 2,0) a fortemente alcalinos (pH 12,0). O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa (Lima et al., 2004). Muitas lipases são reportadas como termoestáveis e específicas a vários substratos, características importantes no desenvolvimento de processos em especial que objetivam reutilizar as enzimas. Estas apresentam consequentemente consideráveis estabilidade da atividade. Diaz et al., (2006), afirma que fungos termofílicos e termotolerantes podem ser fonte potencial para produzir enzimas com altos níveis de estabilidade térmica e atividade a temperaturas mesofílicas.

O pH do meio de crescimento desempenha uma função importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada

durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio. Em processos com fungos, a capacidade de controle do pH (Gupta et al., 2004). Temperaturas mais elevadas levam à desnaturação da enzima, causando a perda da estrutura nativa das enzimas por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. A desnaturação é causada pelo rompimento das ligações de hidrogênio, que são bastante termolábeis, desencadeando uma cascata de alterações estruturais. Para os micro-organismos mesófilos, a temperatura que provoca a desnaturação naturalmente varia para a cadeia proteica, mas, geralmente, está acima da sua temperatura ótima (Borzani et al., 2001). Entretanto, as enzimas psicrófilas são inativas a temperaturas maiores do que a temperatura ótima para a catálise (Feller; Gerday, 2003).

Ul-Haq et al. (2002) estudaram temperaturas de cultivo de 25 a 45°C para a produção de lipases pelo microrganismo *Rhizopus oligosporous* por bioprocesso em estado sólido. Os melhores resultados foram obtidos a 30°C. Em altas e baixas temperaturas a energia requerida para a manutenção do microrganismo aumenta, diminuindo a formação de produtos. O pH inicial ótimo dos cultivos foi de 6,0. Os pHs iniciais de 5,5, 8,0 e 7,0 foram reportados como ótimos para os cultivos de *Aspergillus cinnamomea*, *Rhizopus glutinis* e *Candida rugosa*, respectivamente (Lin, et al., 2006). As temperaturas na faixa de 26,5°C a 32 °C foram utilizadas em inúmeros trabalhos de pesquisa de produção de lipases, sendo 30°C a utilizada com maior frequência. Quanto ao pH, foram utilizados pH de 6,0 a 7,0 na maioria dos trabalhos revisados (Falony et al., 2006; Lin et al., 2006).

2.8 PRÉ-TRATAMENTO DE LIPASES

A etapa de purificação é importante para a obtenção de enzimas com alto grau de pureza e com maiores níveis de atividade enzimática. O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. Após a fermentação, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que não são de interesse (Maldonado, 2006).

A precipitação normalmente é utilizada como etapa inicial de isolamento, sendo o fracionamento com o sulfato de amônio o método mais empregado. Esta metodologia consiste em uma das técnicas de concentração de proteínas, para separação das mesmas dos outros compostos do meio. O sulfato de amônio é bem reportado para precipitação de lipases sendo que as concentrações utilizadas variam de acordo com os estudos: 80% de saturação foi utilizado na precipitação de lipases produzidas por diversos micro-organismos (Martins, 2001; Menoncin et al., 2008).

A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas proteicas se agregam e precipitam. O sal é adicionado ao sobrenadante até uma porcentagem de saturação em que a enzima de interesse é precipitada e separada por centrifugação. A composição do extrato, sua concentração e temperatura podem influenciar a precipitação, no caso das enzimas a temperatura deve ser mantida baixa (4 °C). A adição do sal deve ser lenta e sob agitação para favorecer a homogeneidade. Após a centrifugação, o precipitado deve ser redissolvido em tampão adequado (Borzani et al., 2001).

Para remoção do sal utilizado na etapa de concentração da amostra de proteína pode-se utilizar a diálise, em condições que preservem a atividade da enzima. A lipase de *Bacillus coagulans* BTS-3 foi purificada através de uma série de etapas, iniciando com a concentração com sulfato de amônio seguida de diálise (Kumar et al., 2005). Da mesma forma, os procedimentos de diafiltração com membranas podem ser aplicados para remoção de compostos utilizados no processo, que devem ser retirados de forma a evitar alterações. Para eliminação destes compostos, são adicionados volumes complementares de soluções que possibilitam a lavagem e eliminação de solutos indesejáveis (Wang, 2001).

A diálise, trata-se de uma técnica simples e amplamente empregada como etapa de purificação de proteínas. Baseia-se na separação de moléculas em solução pelo tamanho, ocorrendo a difusão seletiva através de uma membrana semipermeável (Evans et al., 2009). A solução contendo a proteína de interesse é colocada em uma membrana de material poroso como celulose, cujos poros de tamanho específico atuam como barreira, permitindo a passagem de moléculas de diâmetros menores em ambas as direções enquanto retém moléculas grandes tais como proteínas.

Conforme ilustrado na Figura 11, o sistema contendo o extrato de proteína é colocado em contato com solução tampão ou água ultrapurificada, cujo volume é muito superior ao volume de solução enzimática. O gradiente de concentração do tampão através da membrana promove a difusão do soluto (moléculas pequenas e íons) de regiões mais concentradas para as menos concentradas (Berg et al., 2010; Nelson et al., 2011).

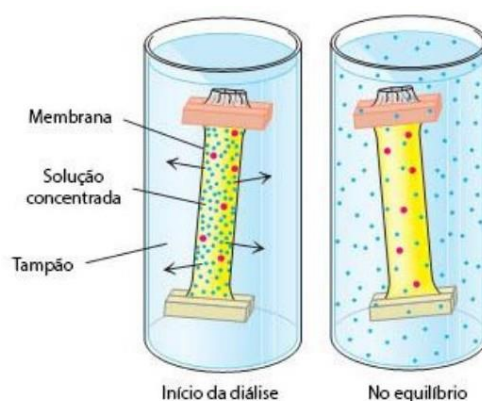


Figura 11. Esquema do processo de diálise. As proteínas (vermelho) ficam retidas no interior da membrana, enquanto moléculas pequenas (azul) atravessam a membrana. Fonte: Adaptado de Berg et al., (2010).

A diálise constitui uma técnica útil para a remoção de sais, carboidratos, oligossacarídeos, oligopeptídeos e pequenas proteínas contaminantes. Porém, é ineficaz na distinção das proteínas que compõem o extrato enzimático (Evans et al., 2009).

2.9 APLICAÇÃO DAS LIPASES

Lipases fúngicas constituem um importante grupo de enzimas biotecnologicamente importantes devido a versatilidade de suas propriedades e facilidade de produção em massa. São enzimas versáteis em suas propriedades enzimáticas e pela especificidade de substrato, o que torna muito atraente para aplicações industriais. Elas também podem ser produzidas através da tecnologia de DNA recombinante (Juntachai et al., 2011; Colla et al., 2012).

A versatilidade das lipases em catalisar a hidrólise de ésteres e reações de esterificação, transesterificação e interesterificação, amplia consideravelmente as aplicações comerciais e tecnológicas destas enzimas. Por isso, podem ser aplicadas na indústria de alimentos, óleo, farmacêutica, química fina, cosméticos, polpa e papel, de couro, biossensores e no tratamento de efluentes ricos em óleos e gorduras (Pandey et al., 2004).

Na tabela 5 é relatada algumas aplicações industriais das lipases, a reação química realizada pela enzima e o produto ou aplicação gerado.

Tabela 5. Aplicações industriais das lipases microbianas. Fonte: Colla et al., (2012).

Indústria	Ação	Produto ou Aplicação
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de óleos
Derivados de laticínios	Hidrólise da gordura do leite, maturação de queijos, modificações de manteigas	Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite, queijos e manteiga
Panificação	Melhorador de flavors	Prolongar a vida de prateleira
Carnes e peixes	Desenvolvimento de flavors	Remoção de gordura, produtos de carnes e peixes
“Health foods”	Transesterificação	Produção de alimentos com apelo nutricional
Bebidas	Aromas	Bebidas
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, umidificantes
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gorduras
Couro	Hidrólise	Produtos de couro
Papel	Hidrólise	Melhoria da qualidade de papel
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lipídios específicos, digestivos
Química	Enantiosseletividade, síntese	Construção de blocos quirais
Gorduras e óleos	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarinas, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídios

2.9.1 Indústria de detergente

Um dos campos de maior aplicação industrial das lipases é a indústria de detergentes. O poder de limpeza dos detergentes é aumentado pela adição de enzimas em sua composição, como amilases, proteases, celulasas e lipases (Colla et al., 2012). Segundo Grbavčić et al., (2011) e Hughes et al., (2012), os principais requisitos para a aplicação da lipase nas indústrias de detergentes incluem: alta especificidade do substrato, atividade e estabilidade a pH alcalino uma vez que precisam atuar em condições de lavagem (pH 10-11 e 30 a 60 °C) e temperaturas acima de 40 °C, habilidade para hidrolisar gorduras de várias composições e a compatibilidade com diferentes componentes em um detergente, incluindo íons metálicos, surfactantes, oxidantes e proteases.

As lipase podem reduzir a quantidade de detergente liberada no ambiente além de poupar energia, permitindo uma menor temperatura de lavagem. O marco na utilização de lipase em detergentes ocorreu com o produto Lipolase® (lipase de *Humicola lanuginosa*) da empresa Novo Nordisk, em 1994. Em 1995, foi lançada a Lipolase Ultra® que apresentava maior capacidade de remoção de gorduras. A versão LipoPrime®, lançada dez anos após a Lipolase®, garantia remoção, em um único ciclo de lavagem, de manchas gordurosas. Diversos fungos como *Aspergillus oryzae*, *Candida* sp., *Rhizopus oryzae* e *Humicola lanuginosa* são conhecidos por produzir lipases em condições adequadas para aplicações em detergentes. Lipases fúngicas funcionam dissolvendo as manchas gordurosas e removendo nódos dos tecidos, sendo componentes importantes de misturas de detergentes (Hasan et al., 2006; Nunes et al., 2012).

2.9.2 Tratamento de efluente

As principais fontes de geração de lipídeos são indústrias de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, curtumes, matadouros e os efluentes domésticos e de restaurantes, principalmente de “fast food” (HWU et al., 2008; ALVES et al., 2013). Os valores de concentração de lipídeos, nesses efluentes, são mostrados na Tabela 6.

Nas estações de tratamento desses efluentes, a elevada concentração de triacilgliceróis necessita inicialmente ser hidrolisada para, em seguida, ser transformada em fonte de carbono para as bactérias e, posteriormente, ser convertido em biomassa (lodo ativado) (Dueholm et al., 2012).

Tabela 6. Fontes de lipídeos e suas concentrações em águas residuárias.

Tipos de Efluente	Concentração de Lipídios (mg/L)	Referências
Domésticos	40 – 100	Henze, 2012
Matadouros e Avícolas	Acima de 500	Petry; Lettinga, 1997
Laticínios	4.680	Mendes et al., 2006
Continuação...		
Continuação...		
Restaurantes	98	Dharmisthiti; Kuhasuntisook, 1998
Azeite de oliva	16.000	De Felice et al., 1997
Sorvetes	845	Hawkes et al., 1995

Em geral, esses resíduos possuem elevados teores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (Tab. 7), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Com o aumento da atividade industrial no Brasil, também ocorreu um aumento na quantidade de efluentes gerados, os quais, na sua maioria, não são tratados ou não recebem o tratamento adequado, aumentando o impacto ambiental, tornando-se um preocupante problema ambiental. Para controlar essa situação, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), pelo artigo 34 da resolução nº 357 de 17 de março de 2005, estabeleceu as seguintes condições de lançamento para efluentes em corpos hídricos: pH entre 5,0 a 9,0; temperatura inferior a 40 °C, sendo que a temperatura do corpo hídrico receptor não deverá exceder a 3 °C na zona de mistura; concentração de óleo mineral até 20 mg/L e para óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L (CONAMA, 2005). Com essas condições da resolução CONAMA, os efluentes das indústrias com elevados teores de lipídios enfrentam um desafio. Os teores de O&G dos efluentes variam de acordo com o tipo de atividade da indústria: 200 a 2000 mg/L para as indústrias de laticínios; 500 mg/L a 16000 mg/L para as indústrias de extração de óleos vegetais, (Mendes et al., 2005). Comparando-se esses valores com os valores estabelecidos percebe-se a necessidade de tratamentos para esses efluentes.

Tabela 7. Valores de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) para diferentes tipos de águas residuárias. Fonte: Harper (2014).

Águas residuárias	DBO (mg/L)
Esgotos sanitários	200-600
Efluente de alimentos – enlatados	500-2.000
Efluente de cervejaria	500-2.000
Efluente de processamento de óleo comestível	15.000-20.000
Efluente de destilaria de álcool (vinhaça)	15.000-20.000
Percolado de aterros sanitários (chorume)	15.000-20.000
Efluente de matadouro	30.000
Efluente de laticínios	40-48.000

As indústrias de laticínios são consideradas, dentre as indústrias alimentícias, as mais poluentes, devido ao seu elevado consumo de água e geração de efluentes líquidos, que por sua vez, constituem a principal fonte de poluição dessa tipologia de indústria (Vourch et al., 2008). Esses efluentes se caracterizam por apresentar elevada carga orgânica e de nutrientes, e, quando descartados de maneira incorreta, podem causar grandes problemas ambientais (Fig. 12).

Os efluentes líquidos gerados pelas indústrias de laticínios são compostos por leite e derivados diluídos, material sólido, principalmente substâncias graxas, detergentes e desinfetantes usados nas operações de limpeza, lubrificantes de máquinas e esgoto doméstico, se caracterizando pelos altos teores de matéria orgânica, óleos e graxas e sólidos suspensos e pelo odor originado pela decomposição da caseína (Machado et al., 2002). As operações de lavagem e limpeza consistem no enxágue e desinfecção de latões de leite, tanques diversos e tubulações, com fins de remoção de resíduos de leite e outras impurezas, e na lavagem de pisos. Os efluentes gerados nas etapas de lavagem correspondem a 50 a 95% do volume total de efluentes gerados (Omil et al., 2003).

O tratamento enzimático de efluentes é interessante, pois ajuda a melhorar a eficiência dos tratamentos convencionais. Além disso, as enzimas atuam em poluentes específicos e, com os avanços da biotecnologia, algumas enzimas podem ser produzidas de forma econômica. Dentro deste contexto, diversos trabalhos relatam a utilização de preparados enzimáticos obtidos por fermentação uma alternativa de baixo custo para o tratamento de efluentes com elevados teores de gordura gerados na indústria de um modo geral (Hughes et al., 2012).

A utilização de lipases produzidas por fermentação microbiana vem se mostrando como uma alternativa para o pré-tratamento desses efluentes, pois através da hidrólise das gorduras são liberados ácidos graxos de baixa massa molar, que são facilmente assimilados pelo consórcio microbiano presente nos sistemas biológicos tais como lodos ativados e reatores anaeróbios (Jung et al., 2002). A hidrólise enzimática também apresenta como vantagem o fato de não gerar lodo com alto teor de gordura, como ocorre nos pré-tratamentos convencionais, cuja disposição pode ser problemática (Cammarota; Freire, 2006).

Essas enzimas, podem ser utilizadas diretamente na forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas para promover um pré-tratamento do efluente antes da degradação anaeróbia. Entretanto, estudos têm sido realizados para verificar a possibilidade de cultivo de microrganismos produtores de lipases em associação com a degradação de efluentes ricos em gorduras (Colla, 2012). Essas enzimas clivam triacilgliceróis específicos, entretanto, podem não ser totalmente específicas e catalisar as reações de hidrólise de triacilglicerídeos que contêm, em sua composição, diferentes ácidos graxos, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura (Saxena et al., 2003).

Neste contexto, processos alternativos que visam à recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de interesses industriais. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases pode reduzir o teor de lipídios, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização, sendo

então considerado um processo viável na busca de ações para minimizar o impacto ao meio ambiente (Colla, 2012).



Figura 12. Indústria alimentícia produtora de laticínios, situada na cidade de Garanhuns-PE. (A) Entrada da indústria; (B) Tanques de coleta do efluente; (C) Imagem do efluente no tanque. Foto: Cyndy Mary Farias.

3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* A PARTIR DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE PEIXE COMO SUBSTRATO E SUA APLICAÇÃO EM DETERGENTE LÍQUIDO*

Cyndy Mary de Mello Farias¹, Minelli Albuquerque Sousa², Maria Luiza Marinho Oliveira ², Juliett de Fátima Xavier da Silva⁴, Keila Aparecida Moreira³, Cristina Maria de Souza-Motta², Ranilson de Souza Bezerra¹.

¹Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

²Micoteca, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

³Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 5292-270, Garanhuns-PE, Brasil.

⁴Universidade Federal de Alagoas, 57200-000, Penedo-AL, Brasil.

Autor para correspondência

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

Tel., +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

E-mail: ransoub@uol.com.br

* Trabalho a ser submetido como Farias, C.M., Sousa, M.A., Oliveira, M.L.M., Silva, J.F.X., Moreira, K.A., Souza-Motta, C.M., Bezerra, R.S. Evaluation of lipase production by different *Aspergillus* species from waste from fish processing and its use in liquid detergent.

Resumo

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em glicerídeos e ácidos graxos e vêm sendo utilizadas em diversos setores industriais como o alimentício, farmacêutico e na indústria química e podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Porém apenas as lipases microbianas são comercialmente utilizadas. Assim, os objetivos deste estudo foram caracterizar lipases produzidas por espécies de *Aspergillus* utilizando óleo de resíduo de tilápia (*Oreochromis niloticus*) como substrato através de fermentação submersa e aplicar em formulações de detergente líquido. Foram utilizadas 18 culturas de *Aspergillus*, preservadas em óleo. A produção de lipases foi feita pelo método de fermentação submersa utilizando óleo de resíduo de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Foram testadas a compatibilidade e estabilidade da lipase em detergentes comerciais (Ipê®; Limpol®; Brilux®) em diferentes concentrações (0,5 a 5,0 µl/mL). O fungo que apresentou melhor atividade lipolítica foi o URM 6647 (*Aspergillus versicolor*), onde sua lipase mostrou-se estável em todos os detergentes testados, restando mais de 90% de atividade, com melhor estabilidade no detergente Limpol®, demonstrando mais de 370% de atividade residual na concentração de 4,5 mL de detergente/mL por 30 minutos. A enzima desta cepa apresentou uma temperatura ótima a 40° C, manteve-se estável durante 120 min entre 30 a 60 °C, e um pH ótimo de 10,0 com estabilidade numa faixa de 3,0 a 10,0 durante 180 min, sugerindo alto potencial para aplicação nas indústrias de detergentes.

Palavras-chave: *Aspergillus*, atividade lipásica, óleo de peixe, detergentes.

Introdução

Lipases (E.C. 3.1.1.3), são enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Hasan et al., 2006; Colla et al., 2012). São classificadas como serina hidrolases, pois possuem uma tríade catalítica constituída por Ser-Asp / Glu-His em torno do sítio ativo, que por sua vez é composto por uma folha com dobra α / β -hidrolase (Gupta et al., 2004, Mala et al., 2007; Sharma, 2011; Ghasemi et al., 2014).

Nos últimos anos tem existido uma grande demanda por enzimas termoestáveis em diferentes campos industriais (Lokre; Kadam, 2015). A tendência crescente para aplicação comercial da lipase é devido a sua capacidade de manter atividade catalítica em soluções orgânicas e conversão de gorduras e óleos em outros produtos de alto valor comercial (Gupta, 2004; Kumar, Kanwarm, 2012). Esse grupo de enzimas possui diversas aplicações industriais, através de sua utilização na produção de alimentos, cosméticos (remoção de lipídeos), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas). Também são utilizadas como biocatalisadores ideais em química orgânica, química fina (síntese de ésteres), indústria farmacêutica, na produção de aditivos alimentares (intensificação de aromas) e detergentes (hidrólise de gorduras) (Treichel et al., 2010; Basheer et al., 2011; Sharma; Kanwar, 2014).

A demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características tem estimulado a procura de novos micro-organismos lipolíticos, principalmente de fungos filamentosos, ou a procura de novas fontes de carbono com o interesse em otimizar a produção de lipases. Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* se destacam como excelentes produtores de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental, pois apresentam uma elevada taxa de crescimento e uma grande termotolerância, o que favorece estudos de seleção e produção de bioprodutos de alto valor agregado (Berka et al., 1992; Singh; Mukhopadhyay, 2012; Maldonato et al., 2014).

Os substratos naturais utilizados na composição de meios de produção de lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, como por exemplo os óleos vegetais, já citados como bons indutores da lipase. No entanto, óleo de origem animal, como o óleo de peixe, é pouco citado em literatura como substrato para produção de lipases, no entanto existem diversos trabalhos citando sua importância nutricional e na formulação de biocombustíveis, tornando-se uma alternativa para estudo do processo de produção de lipases (Colen et al., 2006; Nandini, Rastogi, 2009; Treichel et al., 2010).

Detergentes a base de enzimas são agora preferidos sobre os detergentes modernos devido ao melhor desempenho de lavagem e à sua alta eficácia (Sharma et al., 2001; Hamed et al., 2010). As lipases microbianas são principalmente utilizadas como aditivos de detergentes, uma vez que, existe uma procura contínua de lipases para melhorar a atuação dos detergentes, com propriedades desejadas, como suportar outros ingredientes dos detergentes e deve digerir varias manchas lipídicas. Pesquisas intensivas ainda são necessárias para obter fontes de lipases que possam substituir parcial ou totalmente os tensoativos e outros ingredientes de detergentes tóxicos (Niyonzima, More, 2015).

Assim, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar quanto a produção de lipases espécies de *Aspergillus* em fermentação submersa, utilizando como um novo relato de substrato, o óleo de resíduo de Tilápia (*Oreochromis niloticus*), caracterizar parcialmente a enzima e aplicar em formulações de detergentes lava-louças.

Metodologia

Microrganismos

Os fungos utilizados foram do gênero *Aspergillus*, 18 cepas isoladas de torta de mamona, cedidas pela Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Tab. 1). Foram inoculadas em Agar Extrato de Malte (MEA: malte 20 g/L, glicose 20 g/L, peptona 1 g/L, ágar 20 g/L) e incubadas durante 7 dias a 25°C.

Padronização de inóculo

Placas de Petri com 6 cm de diâmetro, contendo 7 mL de meio MEA esterilizado, foram inoculadas com cada linhagem e incubadas durante 7 dias no escuro a 25°C. Em seguida, 5 discos de 6 mm foram cortados, com furador de cortiça estéril, da área periférica das colônias para suspender os esporos dos discos em 30 mL de uma solução de Tween 80 (0,02%). A concentração de esporos foi ajustada para 5×10^5 esporos/mL.

Tabela 1. Espécies de *Aspergillus* avaliadas quanto à capacidade de produzir lipases.

Nº URM*	Espécie	Nº URM	Espécie
6613	<i>Aspergillus avenaceus</i> G. Sm.	5829	<i>A. ochraceus</i> Wilhelm
5606	<i>A. carbonarius</i> (Bainier) Thom	5620	<i>A. parasiticus</i> Speare
6616	<i>A. carneus</i> Blochwitz	5787	<i>A. sclerotiorum</i> J.N. Rai
6628	<i>A. clavatus</i> Desm.	4508	<i>A. stromatoides</i> Raper & Fennell
5609	<i>A. flavus</i> Link	5614	<i>A. tamarii</i> Kita
5838	<i>A. japonicus</i> Saito	6647	<i>A. terreus</i> Thom
6610	<i>A. melleus</i> Yukawa	5792	<i>A. ustus</i> (Bainier) Thom. & Church
5794	<i>A. niger</i> Tiegh.	5591	<i>A. varicolor</i> Thom & Raper
5827	<i>A. niveus</i> Blochwitz	6706	<i>A. versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi

*URM= número de registro

Obtenção dos exemplares

Matéria Prima para a produção do óleo de tilápia

Resíduos (carcaças e vísceras) de *Oreochromis niloticus* foram doados pela indústria Netuno Pescados localizada no Estado de Pernambuco, Brasil. Os mesmos foram acondicionados em gelo e transportados para o Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco. As carcaças (sem vísceras) foram armazenadas em freezer a -20 °C.

Preparação do hidrolisado proteico

Hidrolisados proteicos de peixe foram produzidos por hidrólise enzimática de acordo com Silva et al., (2014). As carcaças (1000 g, sem vísceras) foram lavadas com água destilada e trituradas junto com 0,5% de enzima comercial (Alcalase, Produto Código P4860, fornecido pela Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A mistura (proporção de 1:1, 1000 g de carcaça e 1000 mL de solução com Alcalase) foi digerida em banho maria durante 4 horas a 45°C. Posteriormente, a temperatura foi elevada para desativar a reação. No final do processo ocorreu separação por filtração das partes sólida e líquida (HPP) através de uma peneira com malha de 1mm². O hidrolisado HPP foi acondicionado em recipientes e congelados a -20° C para posteriores processos.

Os resíduos (carcaça com exceção das vísceras) foram descongelados em temperatura ambiente, lavados com água filtrada e posteriormente foram triturados em liquidificador industrial junto com alcalase Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) a 0,5% e água destilada na proporção de 1:1. A mistura foi colocada em um becker de vidro em banho-maria, com temperatura de 45 °C onde permaneceu por 4 horas submetida a uma pequena agitação contínua para melhorar o contato enzima/substrato. Posteriormente o hidrolisado foi fervido a 100°C, durante 10 minutos, para desativação enzimática. No final do processo ocorreu separação das partes sólida e líquida através de uma peneira com malha de 1mm². O Hidrolisado Proteico de Peixe (HPP) foi acondicionado em recipientes para posteriores processos (Silva et al., 2014).

Extração do óleo de Tilápia

O óleo obtido foi derivado do HPP a partir de um processo de separação mecânica (Fig. 1) que dividiu o produto em concentrado proteico e em uma porção oleosa. A parte oleosa foi submetida a centrifugação de 12.000 rpm por 15 min a 4 °C, onde o sobrenadante (óleo) foi separado e utilizado como substrato para a produção de lipases por fermentação submersa.

O HPP foi colocado em uma desnatadeira a qual o separou por densidade o HPP em duas porções, uma porção proteica e outra porção oleosa. Posteriormente, a porção oleosa foi submetida a uma centrifugação de 12.000 rpm por 15 min a 4 °C, sendo recolhido o sobrenadante após a finalização do processo (Fig. 1). O óleo recuperado após este processo foi utilizado como substrato para a produção de lipases por fermentação submersa.

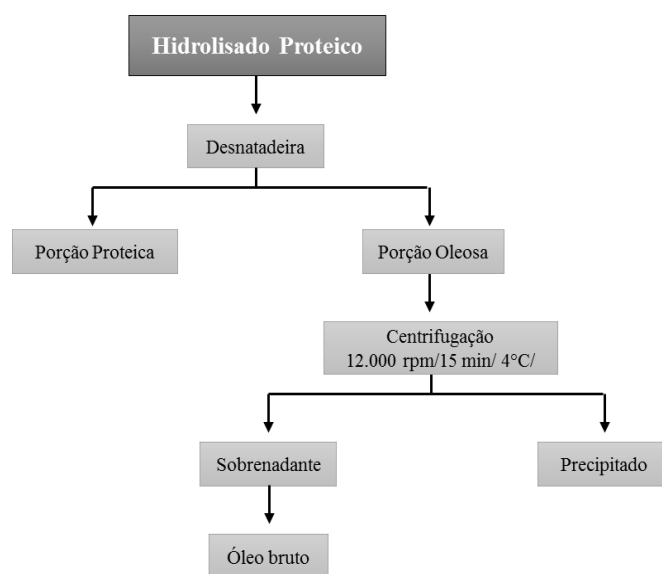


Figura 1 - Fluxograma do procedimento para a obtenção do óleo de peixe a partir do hidrolisado proteico.

Fermentação submersa

A fermentação submersa, segundo adaptação de Pinheiro (2006), foi realizada nas seguintes condições: 1% (v/v) do óleo de resíduo de Tilápia (*Oreochromis niloticus*); 0,5% (p/v) extrato de levedura e pH inicial 6,5 contidos em frascos do tipo Erlenmeyers de 250 ml, inoculados com uma suspensão de esporos das culturas de *Aspergillus* sp. testadas, numa concentração de 5×10^8 esporos/ml. Os frascos foram incubados a 28°C, 120 rpm por 96 horas, após este período, as amostras foram filtradas e o sobrenadante utilizado para dosagem da atividade enzimática.

Ensaio enzimáticos

Foi utilizado o método espectrofotométrico para determinar a atividade da lipase de acordo com Pimentel et al. (1994), com base na hidrólise de *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP) em *p*-nitrofenol (PNP) e palmitato. A atividade consiste na mistura de 1 mL de extrato bruto e 9 ml da solução substrato (0,018 g *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP) dissolvido em 6 ml de isopropanol, em 450 ml de tampão fosfato 50 mM pH 8,0 contendo 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica). A liberação de *p*NP a 37 °C, em 30 minutos de incubação, foi detectada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a clivagem de 1 µmol/min *p*NPP, pH 8,0 (0,05 M de fosfato tampão fosfato), 37 °C. O coeficiente de absorção molar de *p*NPP ($1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi utilizado para calcular a atividade enzimática.

O teor de proteína foi determinada espectrofotometricamente utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, a uma absorbância de 595 nm (Bradford, 1976).

Efeito e estabilidade ao pH e temperatura

Para estudar o pH ótimo para a atividade da lipase, o extrato bruto foi analisado na faixa de pH 3,0 - 10,0 usando os seguintes tampões (100 mM): citrato (pH 3,0 – 6,0), fosfato (pH 6,0 – 8,0), Tris-HCL (pH 8,0) e carbonato (pH 9,0 – 10,0). Para determinar a estabilidade do pH, o extrato bruto foi pré-incubado nos tampões a diferentes valores de pH (3,0 - 10,0) a 37 ° C por até 4 h. Atividade residual foi então analisada. A temperatura ótima para atividade da enzima também foi estudada. O extrato bruto foi testado em diferentes temperaturas entre 30 e 90 °C. A termoestabilidade da enzima foi avaliada pela incubação da enzima em diferentes temperaturas (entre 30 e 90 °C) por até 2 h, após a análise enzimática foi realizada. A atividade enzimática residual foi expressa em porcentagem da atividade no tempo zero (100%) (Dantas; Aquino, 2010).

Compatibilidade e estabilidade da lipase em detergentes lava-louças

Para confirmar o potencial da lipase como um aditivo de detergente, foi testada a sua compatibilidade e estabilidade em diferentes concentrações (0,5 a 5,0 µl/ml) de alguns detergentes comerciais disponíveis no mercado (Ypê®; Limpol®; Brilux®). Foram examinados em soluções aquosas de detergentes, aquecidas a 100 °C durante 60 minutos para desnaturar a atividade das proteases nativas caso presentes, e isto foi confirmado pelo ensaio de protease. Em seguida, o detergente e a enzima pré-purificada, foram misturados numa proporção de 1:1 (v/v), incubados a 37 °C durante 30 min, 1 h e 2 h, seguido por medição da atividade pelo processo de ensaio padrão e comparado com o controle (extrato bruto diluído a 1:1 em água destilada sem detergente). A atividade relativa foi expressa em atividade percentual, considerando a atividade de controle 100% (Moreira et al., 2002).

Resultados e discussão

Produção de lipases por culturas de Aspergillus

Todas as espécies avaliadas foram produtoras de lipases. *Aspergillus versicolor* URM 6647 com maior atividade de lipase 7,27 U/ml seguido de *A. terreus* URM 5606 e *A. clavatus* URM 6610 com produção de 5,69 e 3,40 U/ml, respectivamente, após 96 horas de fermentação a 120 rpm e 28 °C (Fig. 2).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são muito utilizados na produção de lipases, esta enzima tem sido amplamente relatada, principalmente pelo fato de ser normalmente extracelular. O triacilglicerol hidrolase, comumente conhecida como lipase, é uma enzima catalítica com função de hidrolisar ésteres em triglicerídeos para produzir diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol (Sharma et al., 2008). Essas reações apresentam vantagens como: estabilidade em solventes orgânicos, não requerimento de cofatores e ampla especificidade, o que torna as lipases importantes para aplicações biotecnológicas (Azeredo et al., 2007).

Utilizando azeite de oliva como substrato em diferentes concentrações para produção de lipases, Damaso et al., (2005) estudaram a produção desta enzima por *Aspergillus niger*, tendo a função de fonte de carbono e indutor da síntese de lipases, e obteve como melhor resultado 2% de azeite de oliva (10,7 U/ml). Carvalho et al., (2005), estudando esta mesma espécie e com mesmo substrato, obtiveram 18,2 U/ml de atividade enzimática. Pinheiro et al., (2008) avaliaram a produção de lipases por *Penicillium verrucosum* utilizando meio convencional (peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva) e industrial (água de maceração de milho, Prodex Lac (hidrolisado de levedura), NaCl e óleo de oliva) e as atividades enzimáticas mais elevadas foram

3,15 e 2,22 U/ml para o meio convencional e meio industrial, respectivamente. Wolski et al., (2009) estudaram o fungo *Penicillium* sp. cultivado em fermentação submersa (FSM) utilizando azeite de oliva como substrato, a atividade de lipase encontrada foi 11,3 U/ml.

No presente trabalho *Aspergillus versicolor* URM 6647 está sendo relatado pela primeira vez como produtor de lipases assim como o óleo de Tilápia utilizado como indutor para a síntese da enzima, e mesmo apresentando resultados inferiores aos trabalhos citados mostrou-se eficaz na produção da lipase (7,27 U/ml), pois com estudos de otimização de produção pode-se alcançar valores mais elevados de atividade lipolítica, o que torna esta cepa e substrato promissores para trabalhos posteriores e aplicação em processos biotecnológicos industriais.

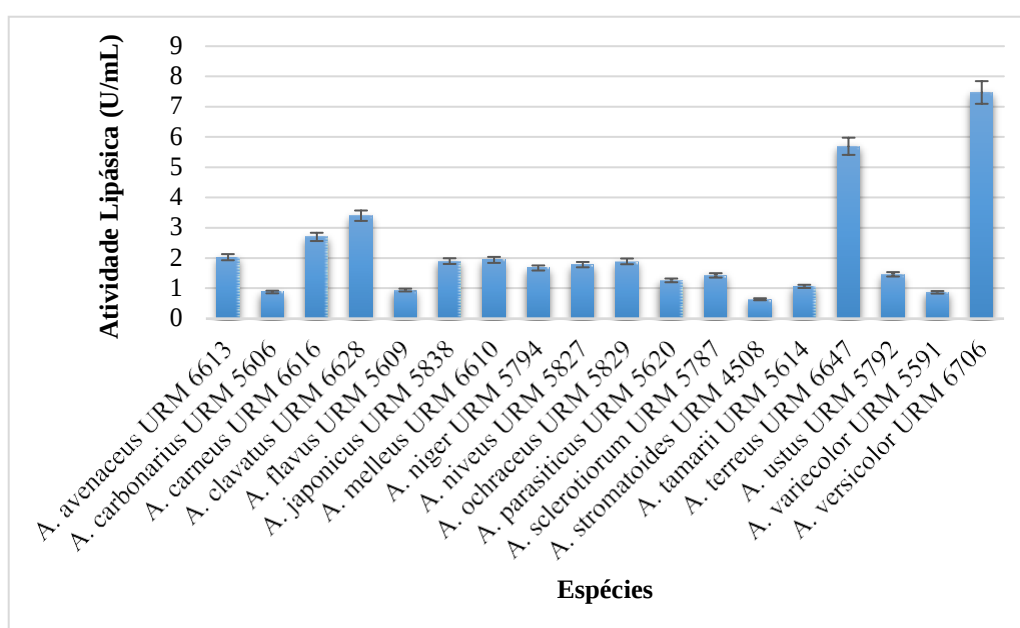


Figura 2. Atividade lipolítica das culturas de *Aspergillus* com 96 horas de fermentação.

Efeito e estabilidade ao pH e temperatura

Para a caracterização enzimática da lipase foi usado extrato enzimático bruto obtido a partir de *Aspergillus versicolor* URM 6647 que mostrou a maior atividade de lipase.

A maior atividade foi obtida em pH 10,0 (10,34 U/ml) (Fig. 3). A lipase de *Aspergillus versicolor* URM 6647 foi estável na faixa de pH 3,0-10,0 com valores de atividade acima de 63,73% nas 4 horas de incubação. A atividade residual máxima detectada ocorreu com 3 horas de incubação em pH 5 (229,38%). Porém com 4 horas observou-se um decréscimo da atividade residual da enzima para todos os valores de pH testados. Estes resultados mostram que a lipase é estável em uma ampla faixa de pH (Fig. 4).

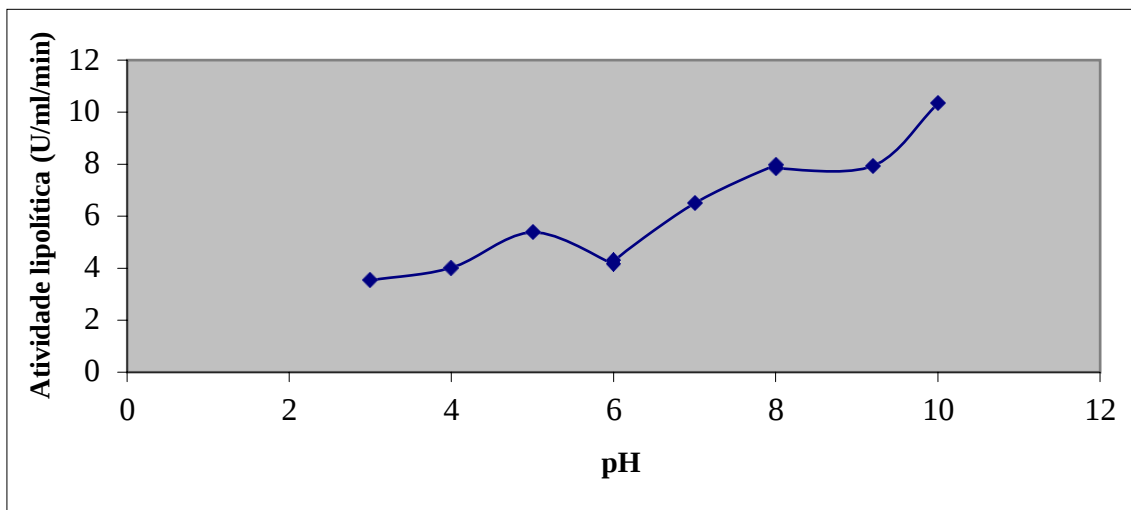


Figura 3. Efeito do pH sobre a atividade lipásica de *Aspergillus versicolor* URM 6647.

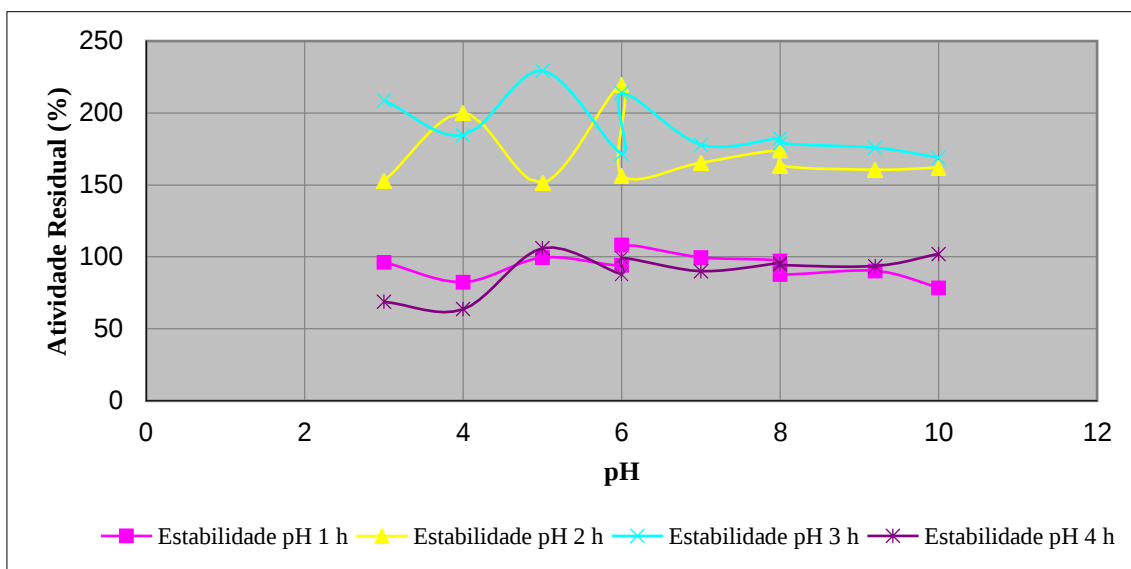


Figura 4. Estabilidade ao pH da atividade lipásica de *Aspergillus versicolor* URM 6647, por até 4 horas de incubação.

O efeito da temperatura sobre a atividade da lipase demonstrou que a atividade relativa máxima foi obtida a 40 °C (10,46 U/ml) (Fig. 5). A enzima mostrou-se estável em temperaturas de 30 a 60 °C, com valores de atividade acima de 50% nas 2 horas de incubação. Na atividade residual máxima detectada com 1 hora de incubação a 30 °C (97,09%), com 2 horas observou-se um leve decréscimo da atividade residual da enzima para todas as temperaturas. Estes resultados mostram que a lipase de *Aspergillus versicolor* URM 6647 é estável em uma ampla faixa de temperatura (Fig. 6).

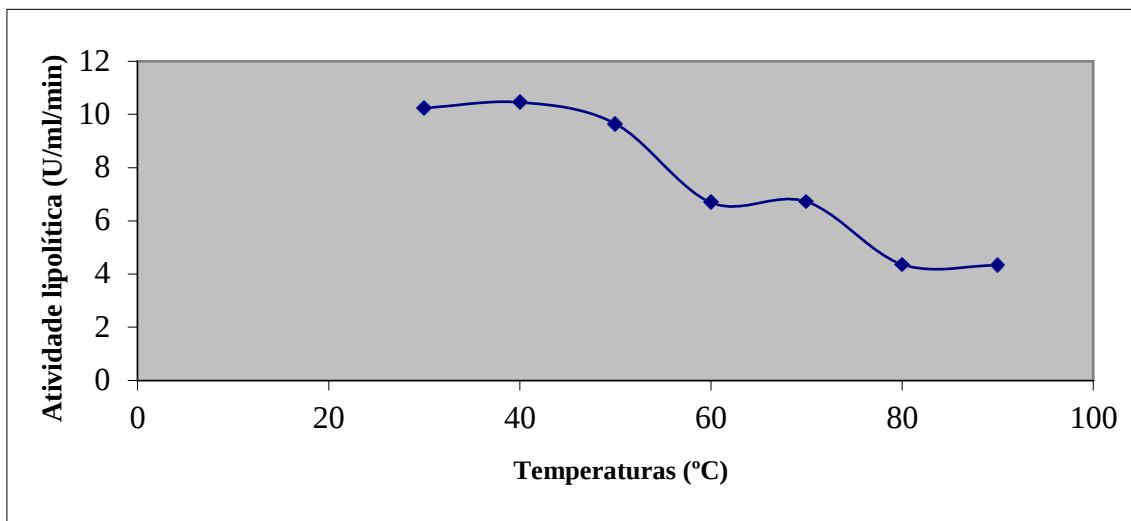


Figura 5. Efeito da temperatura sobre a atividade lipásica de *Aspergillus versicolor* URM 6647.

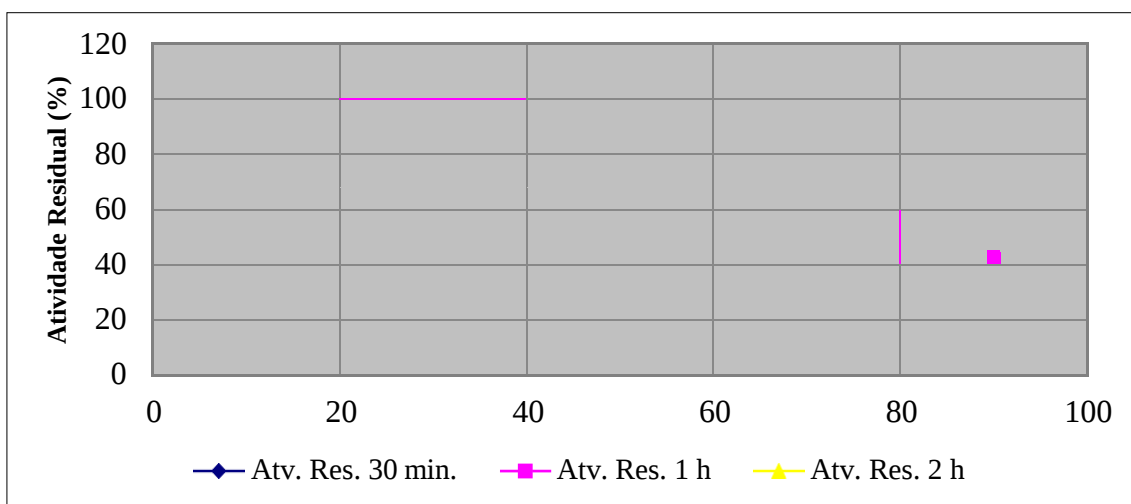


Figura 6. Estabilidade a temperatura da atividade lipásica de *Aspergillus versicolor* URM 6647, por até 2 horas de incubação.

Ao analisar a estabilidade da lipase ao pH e temperatura é importante saber que as condições do ensaio, tempo de incubação, pH, temperatura, metodologia e o substrato utilizado, podem interferir diretamente nas propriedades cinéticas e de estabilidade das enzimas, além de um mesmo organismo poder apresentar isoformas (Carvalho et al., 2005). Além disso, a temperatura e o pH são alguns dos fatores de extrema importância nas reações catalisadas pelas lipases. Tais condições podem favorecer a velocidade de reação por um determinado tempo (Sharma et al., 2002; Padilha, 2011).

As melhores condições de estabilidade térmica e pH encontradas para as lipases são as seguintes: pH ótimo entre 2,5- 8,5 e estabilidade entre pH 2,0- 10,0; temperatura ótima entre 25

e 40 °C e termoestabilidade entre 25 e 50 °C (Mahadik et al., 2002; Falony et al., 2006). Os mesmos autores relataram que as lipases produzidas por isolados de *Aspergillus niger* tiveram atividade máxima no pH 2,5 e estabilidade numa faixa de pH 2,0-10,0. No entanto, Pera et al., (2006), relatam que o pH ótimo de atividade de *A. niger* está em torno de 6,0, corroborando com Sathi et al., (2013), o qual relatou lipases produzidas por *A. terreus* com melhor atividade em pH 6, e estabilidade em ampla faixa de pH 3,0- 10,0. Dantas e Aquino (2010) e Reinehr et al., (2014), encontraram como pH e temperatura ótimos para *A. niger* 7,0 e 37 °C, respectivamente, e estabilidade entre pH 4,0- 10,0 e 40- 50 °C.

Saxena et al., (2003), relatam que a temperatura ótima da lipase de *Aspergillus carneus* é 37 °C. Pastore et al., (2003) verificaram uma atividade ótima da lipase de *Rhizopus* próxima a 40 °C. Martins (2008), encontrou para *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium* sp. pH ótimo entre 4,5-5,0 e estabilidade entre 4,0- 7,0 e temperatura ótima a 37 °C. Lipases termoestáveis têm sido isoladas de muitas fontes, incluindo *Mucor pusillus*, *Rhizopus homothallicus* e *Aspergillus terreus* (Singh; Mukhopadhyay, 2012). Uma das lipases mais estáveis isolada tem um máximo de atividade a 60 °C e mantém pelo menos 90% da atividade após 15 minutos a 60 °C (Said; Pietro, 2004).

Os trabalhos citados, de uma forma geral, corroboram com os resultados obtidos nesse estudo com *Aspergillus versicolor* URM 6647 que apresentou estabilidade ao pH entre 3,0-10,0, temperatura ótima a 40 °C e termoestabilidade entre 30 a 60 °C, no entanto, difere quanto ao pH ótimo apresentado por esta cepa que foi pH 10,0, extremamente alcalino, enquanto os trabalhos citados apresentam ótimo de pH entre 2,5- 7,0, ou seja, na faixa de extremamente ácido a neutro. Estes dados evidenciam que as características de enzimas microbianas variam com a enzima em estudo, estirpe produtora, bem como as condições de fermentação (Kumari et al., 2012).

Compatibilidade e estabilidade da lipase em detergentes lava-louças

A lipase de *A. versicolor* URM 6647 mostrou-se estável em todos os detergentes testados, restando mais de 90% de atividade, contudo foi mais estável com o detergente da marca Limpol® com mais de 150% de atividade residual até 2 horas de incubação nas concentrações testadas, com máximo de 370% na concentração de 4,5 ml de detergente/ml por 30 minutos a 37 °C (Fig. 7).

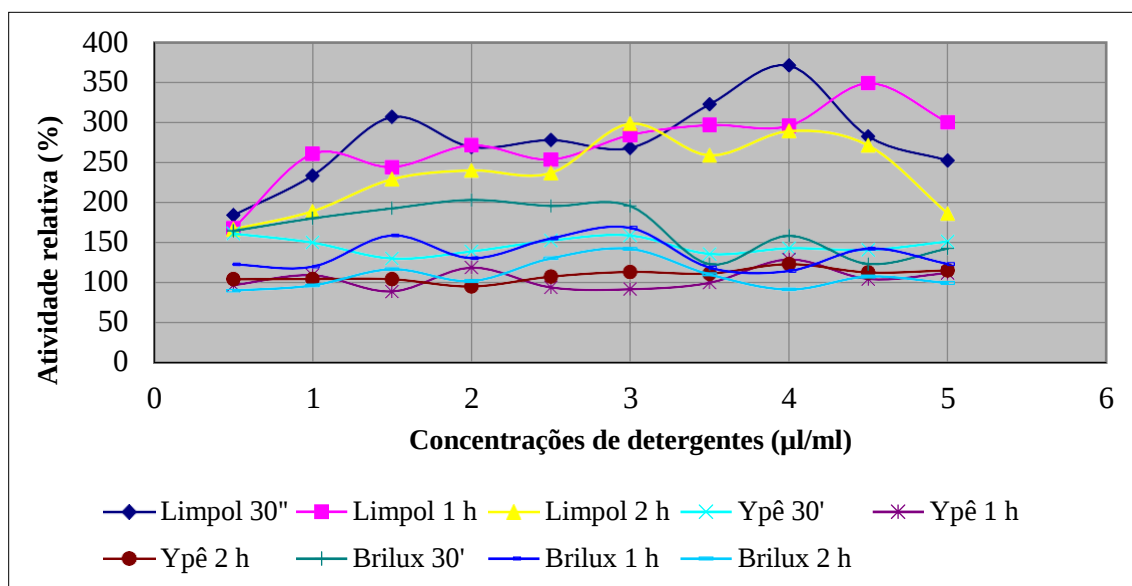


Figura 7. Compatibilidade e estabilidade da lipase de *Aspergillus versicolor* URM 6647 em detergentes lava-louças

Li et al., (2014) testaram quarenta e cinco cepas quanto a estabilidade e compatibilidade com detergentes comerciais. Destas, as lipases testadas de oito cepas apresentaram desempenho superior. Das oito amostras, cinco cepas produtoras de lipases que apresentam alto desempenho de lavagem foram utilizadas para um segundo teste, que revelou que o isolado PS59 secreta uma lipase extracelular com elevada eficácia de lavagem a baixa temperatura e condições de alta alcalinidade. Segundo Grbavčić et al., (2011) e Anobom et al., (2014) os principais requisitos para a aplicação da lipase nas indústrias de detergentes incluem: alta especificidade do substrato, atividade e estabilidade a pH alcalino e temperaturas acima 40 °C, e a compatibilidade com diferentes componentes em um detergente, incluindo íons metálicos, surfactantes, oxidantes e proteases. Assim, a lipase de *A. versicolor* URM 6647 que se mostrou estável em todos os detergentes testados e apresentou altas atividades e estabilidade em pH alcalino (8,0-10,0) e temperaturas altas (40- 60 °C) como mostrado anteriormente, sugere que esta cepa apresenta alto potencial para aplicação nas indústrias de detergentes.

Conclusões

Aspergillus versicolor URM 6647 foi relatado pela primeira vez como produtor de lipases utilizando como substrato óleo de HPP, indutor para a síntese da enzima em cultivo líquido submerso em 96 horas de incubação. Esta lipase atuou de forma eficiente dentro dos parâmetros de estabilidade recomendados de pH (8,0-10,0) e temperatura (40-60 °C), para as enzimas como aditivos de detergente líquido, sendo o pH ótimo na faixa de 10 e temperatura ótima a 40 °C. Além disso, a lipase manteve-se estável em várias concentrações na presença de vários detergentes comerciais, com destaque de atividade residual de 370% na concentração de 4,5 mL do detergente Limpol/mL por 30 minutos a 37 °C.

Agradecimentos

A Micoteca URM do Departamento de Micologia e ao Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, a Indústria Netuno Pescado e aos colegas envolvidos nessa pesquisa.

4 SELEÇÃO E AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA POR ABORDAGEM POLIFÁSICA DE CULTURAS DE *ASPERGILLUS* SEÇÃO *TERREI* PRESERVADAS NA MICOTECA URM QUANTO À PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO RESÍDUO PESQUEIRO COMO SUBSTRATO

Cyndy Mary de Mello Farias¹, Joenny Maria Lima², Jullyanna Cordovile², Roberta Cruz²,
Amanda Reges de Sena³, Keila Aparecida Moreira⁴, Cristina Maria de Souza-Motta²,
Ranilson de Souza Bezerra^{1*}.

¹Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

²Micoteca, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

³Laboratório de Microbiologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, 55560-000, Barreiros-PE, Brasil

⁴Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 5292-270, Garanhuns-PE, Brasil.

*Autor para correspondência

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

Tel., +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

E-mail: ransoube@uol.com.br

Trabalho a ser submetido como Farias, C.M., Lima, J.M., Cordovile, J., Cruz, R., Reges, A., Moreira, K.A., Souza-Motta, C.M., Bezerra, R.S. Selection and authentication by polyphasic taxonomic approach of *Aspergillus* cultures section *Terrei* preserved in the URM Culture Collection for the production of lipase using fishing residue as substrate.

Resumo

A grande demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características, tem estimulado a busca de novas cepas de micro-organismos lipolíticos, principalmente de fungos, e a procura de novas fontes de substratos com o interesse em otimizar a produção de lipases. Espécies como *Aspergillus terreus* vem sendo objeto de estudos devido a sua capacidade de produzir lipases extracelulares. A Micoteca URM possui em seu acervo cerca de 80 culturas pertencentes à seção *Terrei*, porém, algumas culturas necessitam de uma revisão taxonômica devido à complexidade na identificação de algumas espécies. Assim, características morfológicas precisam ser combinadas com outros caracteres como o sequenciamento de DNA para se assegurar resultados seguros e satisfatórios na classificação dos microrganismos. O objetivo deste trabalho foi identificar espécies da seção *Terrei* através da taxonomia clássica e molecular, selecionar o melhor produtor e melhores condições através dos planejamentos Plakett-Burman (PB) e Doehlert para produção de lipases utilizando como substrato resíduo pesqueiro. Vinte e oito de *Aspergillus* pertencentes a seção *Terrei* mantidas na Coleção de Culturas Micoteca URM, sob o método de óleo mineral, foram reativadas, inoculando os isolados em três temperaturas distintas no CYA e MEA, e em seguida extraído DNA, amplificadas as regiões ITS 1 e ITS 2 e parcial do gene β -tubulina, o que nos certifica de que os estudos com a biologia molecular e taxonômica devem ser feitos em conjunto para uma melhor compreensão e resultados precisos. O estudo de produção foi conduzido utilizando Planejamento Estatístico do tipo Plackett-Burman (PB), avaliando 10 variáveis. Dois componentes nutricionais, a concentração do hidrolisado e de extrato de levedura, foram identificados como variáveis que influenciam a produção de lipases. Os valores ótimos dessas três variáveis foram otimizados utilizando o delineamento experimental Doehlert. Utilizando o design de Metodologia por superfície de resposta foi verificado a interação entre o hidrolisado e extrato de levedura nas seguintes concentrações ótimas para produção de lipases: hidrolisado (10% v/v), extrato de levedura (0,2% p/v), tempo de fermentação (120h), Rotação (150 rpm), pH 7,5 a 30 °C. Mostrando um melhor resultado para produção máxima de lipase de 35,04 U/mL por *A. terreus* URM 6614.

Palavras-chave: *Aspergillus terreus*, biologia molecular, planejamento experimental, lipases.

Introdução

Aspergillus estão entre os organismos mais abundantes e amplamente distribuídos na Terra. Adaptam-se à ampla variedade de nichos aquáticos e terrestres, além de produzirem uma enorme variedade de metabolitos. Atualmente existem cerca de 837 espécies descritas, sendo muitas dessas espécies consideradas raras, porém algumas estão entre os fungos mais comuns na Terra (Klich, 2002; Samson; Varga, 2009; Hawksworth, 2011).

Segundo Alexopoulos et al., (1996), *Aspergillus* trata-se de um gênero de fungos anamórficos, cuja reprodução ocorre através da produção de conídios (esporos de origem assexuada). A principal característica deste gênero é a produção de conidióforos distintos. Compondo o gênero, há várias seções que abrigam espécies com características morfológicas similares, bem como filogeneticamente próximas, como a seção *Terrei* (Samson; Varga, 2009).

Espécies de *Aspergillus* seção *Terrei*, descrita por Gamset al., (1985), são economicamente importantes, destacando-se a espécie *A. terreus*, excelente produtora de ácidos e enzimas com aplicações biotecnológicas (Raper e Fennell, 1965). Atualmente, a seção *Terrei* abriga nove espécies, incluindo *Aspergillus terreus* e suas variedades, *A. niveus*, *A. carneus*, *A. niveus* var. *indicus*, *A. allahabadii*, *A. ambiguuse* *A. microcysticus* (Varga et al., 2005; Peterson, 2008; Samson, et al., 2011). Pelo fato da similaridade de algumas culturas, muitas vezes é necessária uma revisão taxonômica devido à complexidade de se identificar algumas espécies. Desse modo, características morfológicas precisam ser combinadas com outros caracteres que incluem sequenciamento de DNA. Nos estudos moleculares, tem sido sugerido o sequenciamento da região ITS do rDNA para auxiliar na identificação de espécies estreitamente relacionadas, assim outros loci variáveis, como β -tubulina e calmodulina (Samson et al., 2011).

Dentre a ampla variedade de enzimas produzidas por esse gênero, destaca-se a lipase (Triacilglicerol éster hidrolases E.C 3.1.1.3), a qual naturalmente catalisa a hidrólise de ligações éster presentes em triglicerídeos/acilgliceróis, liberando ácidos graxos, glicerol e água. As lipases microbianas são consideradas versáteis, pois apresentam uma série de vantagens em relação às lipases produzidas por células animais e vegetais (Seth et al., 2014). Possuem um elevado rendimento de conversão do substrato em produto, alto nível de adaptação às condições ambientais e apresentam grande capacidade de realizar reações de catálise em condições extremas de temperatura e pH e solventes orgânicos com enantiosseletividade (Nigam, 2013; Sharma; Kanwar, 2014). A estrutura química e as características cinéticas das lipases microbianas produzidas variam dependendo do micro-organismo, gênero, espécie e da composição do meio de produção utilizado (Tavares et al., 2011; Fickers; Nicaud, 2013). A

seleção adequada dos nutrientes presentes na elaboração dos meios de produção de lipase, envolve uma série de estudos prévios para introdução de novas fontes de substratos, como aqueles originados a partir do aproveitamento de resíduos de origem vegetal ou mesmo animal, afim de permitir uma maior produção da enzima com custos reduzidos (Berglund, 2007; Ray, 2012).

O setor pesqueiro é uma atividade de grande importância econômica em diversas localidades do Brasil. A industrialização de peixe gera uma quantidade expressiva de resíduos ricos em proteínas e em ácidos graxos de cadeia longa. As gorduras animais são geralmente mais baratas do que óleos vegetais, porque, em vez de um produto primário, representam um subproduto da agroindústria animal; também a demanda por este produto é menor do que a maioria dos óleos vegetais mais comuns. Entre as gorduras animais, destacam-se os óleos de peixe, que representam um grande potencial de oferta, pois um terço da captura mundial de pescado não é empregado para o consumo direto na alimentação humana, seguindo para elaboração de rações ou desperdiçada como resíduo (Cavalcante et al., 2005; Lima, 2013).

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* se destacam como excelentes produtores de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental, pois apresentam uma elevada taxa de crescimento e uma grande termotolerância, o que favorece estudos de seleção e produção de bioprodutos de alto valor agregado (Singh; Mukhopadhyay, 2012; Gopinath et al., 2013; Maldonato et al., 2014). Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram reativar, autenticar taxonomicamente através de taxonomia clássica e molecular culturas de *Aspergillus* pertencentes a seção *Terrei*, selecionar melhor produtor e estabelecer melhores condições de produção de lipases, utilizando resíduo pesqueiro como substrato.

Metodologia

Micro-organismos

Vinte e oito linhagens de *Aspergillus* seção *Terrei* (Tab. 3) obtidas a partir da coleção de culturas Micoteca URM foram inoculadas em Agar Extrato de Malte (MEA: malte 20 g/L, glicose 20 g/L, peptona 1 g/L, ágar 20 g/L) e incubadas durante 7 dias a 28 °C ($\pm$ 2 °C).

Reativação das Culturas

Todas as linhagens de *Aspergillus* seção *Terrei* foram inoculadas sobre Caldo Glicosado contido em tubos de ensaio (Lacaz et al., 2002) e então, incubadas por 7 dias a 28 °C ($\pm$ 2 °C).

Após o crescimento, as culturas foram transferidas para tubos de ensaio contendo o meio Ágar Extrato de Malte e incubadas até o crescimento, ou por até 7 dias a 28 °C (± 2 °C).

Autenticação das culturas através de taxonomia clássica

A autenticação taxonômica clássica foi procedida de acordo com Raper; Fennell, 1965 e Samson et al., (2007; 2010). Os esporos de cada cultura de *Aspergillus* foram suspensos em 1,0 mL de uma solução contendo 0,2 % de ágar e 0,05 % de Tween 80. Desta suspensão, 2,0 μ L foram utilizados para inoculação em três pontos das placas de Petri contendo 25 mL dos meios de cultura Ágar Czapek Levedura (CYA), Ágar Extrato de Malte (MEA); 25% Ágar Glicerol (G25N), Ágar Creatinina (CREA) e Ágar Aveia (OA). A incubação ocorreu a 5 °C, 25 °C e 37 °C para CYA e a 25 °C para MEA, CREA, OA e G25N. Para a identificação das espécies foram observadas características macroscópicas e microscópicas.

*Identificação das espécies *Aspergillus* seção *Terrei* através de biologia molecular*

Obtenção de micélio para extração do DNA das amostras

Esporos das espécies crescidos em meio ágar malte à 28 °C por 7 dias foram suspensos em 100 mL do mesmo meio, porém em estado líquido, contidos em frascos de Erlenmeyers de 250mL. Os frascos foram mantidos sob agitação a 27 rpm por 120 horas à 28 °C. Posteriormente, o micélio foi coletado por filtração a vácuo, lavado com água destilada esterilizada, e estocado a 20°C, até o momento de uso para extração de DNA (O'Donnell, 1979).

Extração do DNA genômico e amplificação da Região ITS do rDNA

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com Kuramae-Izioka et al., (1997). A massa micelial foi triturada na presença de nitrogênio líquido e o micélio colocado em tubos de Eppendorf de 1,5 mL. Foram adicionados 700 μ L do tampão de extração (tris-HCl 1M; pH 8,0; NaCl 5M; EDTA 0,5 mM; pH 8,0; dodecil sulfato de sódio 10%) previamente aquecido a 65 °C. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C, por 30 minutos, e agitadas, levemente, a cada 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de acetato de potássio (5M), procedendo-se a homogeneização, incubação no gelo por 30 minutos e centrifugação a 14500g por 10 minutos. Retirado o sobrenadante, um volume da solução clorofil (clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1), foi adicionado, seguido de centrifugação a 14500g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos tubos, aos quais foi adicionado um volume de isopropanol absoluto resfriado a 4

°C. Após inversão dos tubos por várias vezes, os mesmos foram centrifugados para precipitação do DNA, descartando-se o sobrenadante em seguida. O “pellet” foi lavado com etanol 75%, e as amostras submetidas à centrifugação a 14500g por 10 minutos. Após secagem em temperatura ambiente, o DNA foi ressuspenso em 70 µL de tampão TE (Tris-HCl 1M e EDTA 0,5M; pH 8,0), e a suspensão de DNA foi armazenada a -20°C até o momento do uso.

Produção Enzimática

Padronização de inóculo

Placas de Petri com 6,0 cm de diâmetro, contendo 7,0 mL de meio MEA esterilizado, foram inoculadas com cada linhagem e incubadas durante 7 dias no escuro a 25 °C. Em seguida, 5 discos de 6,0 mm foram cortados, com furador de cortiça estéril, da área periférica das colônias para suspender os esporos dos discos em 30 mL de uma solução de Tween 80 (0,02%). A concentração de esporos foi ajustada para 5×10^5 esporos/mL.

Fermentação submersa

O experimento foi realizado, segundo adaptação de Pinheiro (2006), em duplicata utilizando Erlenmeyers de 250 mL contendo meio I composto por 1% (v/v) do óleo de resíduo de Tilápia (*Oreochromis niloticus*), 0,5% (p/v) extrato de levedura e pH inicial 6,5; meio II contendo 1% (v/v) do hidrolisado de Tilápia, 0,5% (p/v) extrato de levedura e pH inicial 6,5; meio III contendo 1% (v/v) do hidrolisado de camarão (*Macrobrachium rosenbergii*); 0,5% (p/v) extrato de levedura e pH inicial 6,5 contidos em frascos do tipo Erlenmeyers de 250 mL. Os frascos foram incubados a 28 °C, 120 rpm por 96 horas, após este período, as amostras foram filtradas e o sobrenadante utilizado para dosagem da atividade enzimática.

Ensaio enzimáticos

Foi utilizado o método espectrofotométrico para determinar a atividade da lipase de acordo com Pimentel et al., (1994), com base na hidrólise de *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP) em *p*-nitrofenol (PNP) e palmitato. A atividade consiste na mistura de 1 mL de extrato bruto e 9 mL da solução substrato (0,018 g *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP) dissolvido em 6 mL de isopropanol, em 450 mL de tampão fosfato 50 mM pH 8,0 contendo 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica). A liberação de pNP a 37 °C, em 30 minutos de incubação, foi detectada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a clivagem de 1 µmol/min *p*NPP, pH 8,0 (0,05 M de

fosfato tampão fosfato), 37 °C. O coeficiente de absorção molar de pNPP ($1,32 \times 10^4 M^{-1}.cm^{-1}$) foi utilizado para calcular a atividade enzimática.

O teor de proteína foi determinado espectrofotometricamente utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, a uma absorbância de 595 nm (Bradford, 1976).

Efeito ao pH e temperatura

Para estudar o pH ótimo para a atividade da lipase, o extrato bruto foi analisado na faixa de pH 3,0 - 10,0 usando os seguintes tampões (100 mM): citrato (pH 3,0 – 6,0), fosfato (pH 6,0 – 8,0), Tris-HCL (pH 8,0) e carbonato (pH 9,0 – 10,0). A temperatura ótima para atividade da enzima também foi estudada. O extrato bruto foi testado em diferentes temperaturas entre 30 e 90 °C (Dantas; Aquino, 2010).

Otimização do meio de produção de lipases por estatística de aproximação meio de fermentação

O meio de produção de lipases foi preparado utilizando hidrolisado de Tilápia como meio basal, que continha diferentes concentrações de nutrientes testados de acordo com os experimentos do planejamento estatístico. O meio de cultivo teve o pH inicial ajustado de acordo com o planejamento e esterilizado a 121 °C durante 15 min. Suspensões do isolado selecionado foram adicionados a cada 50 mL de meio em Erlenmeyer de 250 mL de acordo com a concepção da matriz. Os frascos foram incubados por até seis dias em diferentes temperaturas, sob agitação orbital em diferentes rotações. Para a identificação e seleção das variáveis significativas para a produção de lipases foi utilizado o planejamento saturado de Plackett-Burman (PB)

Identificação e seleção das variáveis significativas para a produção de lipases usando planejamento Plackett-Burman (PB)

O delineamento experimental Plackett-Burman (Plackett eBurman, 1946) com e base no modelo de primeira ordem:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i$$

foi utilizado para rastrear as variáveis importantes que influenciam produção de lipases. O número total de ensaios de acordo com o Plackett-Burman é $k + 1$, onde k é número de variáveis (componentes do meio). Cada variável foi representada em dois níveis, inferior e superior, que são indicado por (-1) e (+1), respectivamente (Tab. 1).

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento Plackette-Burman (PB)

Variáveis	Inferior (-1)	Superior (+1)
1 - Concentração do hidrolisado %	1	2
2 – pH	6,5	7,5
3 – Temperatura °C	30	35
4 – Tempo de fermentação	120	144
5 - Rotação	150	160
6 – Concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄ %	0,01	0,025
7 – Concentração de extrato de levedura %	3	4
8 - Concentração de CaCl ₂ %	0,01	0,025
9 - Concentração de NaCl %	0,01	0,025
10 – Concentração de KH ₂ PO ₄ %	0,01	0,025

Otimização das variáveis significativas para a produção de lipases usando planejamento Doehlert

O planejamento Doehlert (Doehlert, 1970) foi empregado para gerar superfícies de resposta com uma boa estimativa dos parâmetros do modelo matemático quadrática permitindo o estudo de três variáveis independentes em diferentes níveis. Todo o domínio experimental é explorado com um número mínimo de experiências de acordo com uma abordagem sequencial, estudando em primeiro lugar apenas dois fatores, em seguida, três fatores, e assim por diante. De acordo com o Doehlert design, o número total de combinações experimentais é $K^2 + K + n_0$, onde k é o número de variáveis independentes e n_0 é o número de repetições das experiências no ponto central. O domínio experimental foi concebido por seu centro e pelas variações de cada fator em todo o centro.

Tabela 2. Variáveis significativas utilizadas no planejamento Doehlert

Experimento	Extrato de levedura (%)	Concentração de hidrolisado (%)
1	1,5	4,0
2	1,5	6,0
3	1,0	3,0
4	1,0	5,0
5	1,0	5,0
6	1,0	5,0
7	1,0	7,0
8	0,5	4,0
9	0,5	6,0

Análise estatística

Para a comparação de médias, da produção enzimática entre os fungos, foi utilizado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011). Todos os ensaios foram realizados aleatoriamente. Após obtenção dos resultados nos planejamentos experimentais, os mesmos foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) através do programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA), para indicar as variáveis com efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,1$) e o ajuste do modelo aos dados experimentais.

Validação

Após a obtenção da condição predita como ótima foi realizado um experimento em triplicata para a validação.

Resultados e Discussões

*Identificação das espécies *Aspergillus* seção *Terrei* através da taxonomia clássica e molecular*

Espécies pertencentes à seção *Terrei* apresentam como características comuns a cabeça conidial colunar em tons de marrom. A espécie tipo da seção é *Aspergillus terreus* Thom (Gams et al., 1985). Trata-se de um fungo comum em solos, mas facilmente encontrado em outros ambientes (Samsom et al., 2011). Linhagens desta espécie cosmopolita são frequentemente isolados de deserto e pradarias e pilhas de compostagem, e como contaminantes de produtos vegetais armazenados como milho, cevada e amendoim (Kozakiewicz, 1989). Recentemente, no Brasil, *A. terreus* Thom foi isolada a partir de solos de área de Caatinga, demonstrando sua capacidade de adaptação à baixa disponibilidade de água (Cruz et al., 2014).

Devido à aproximação morfológica apresentada pelas espécies do gênero *Aspergillus* que compõem a seção *Terrei*, tornou-se necessária a revisão de algumas destas culturas preservadas na Coleção de Culturas Micoteca URM. Tais culturas são frequentemente fornecidas tanto para pesquisas científicas, quanto para a utilização industrial. Diante da excelência e rigor da qualidade dos serviços prestados pela Micoteca URM, tais culturas precisam ter sua taxonomia autenticada através de uma abordagem polifásica na qual a biologia molecular tem sido aplicada em complemento à taxonomia clássica, tornando o processo taxonômico mais refinado.

Todas as 28 culturas preservadas sob óleo mineral apresentam-se viáveis e suas características morfológicas e fisiológicas preservadas (Tab. 3). O tempo de preservação variou

de três (URM 6681) a 28 anos (URM 2803). Para autenticação taxonômica, todas as culturas tiveram suas características macroscópicas e microscópicas avaliadas e sua identificação clássica confirmada (Fig. 1-3).

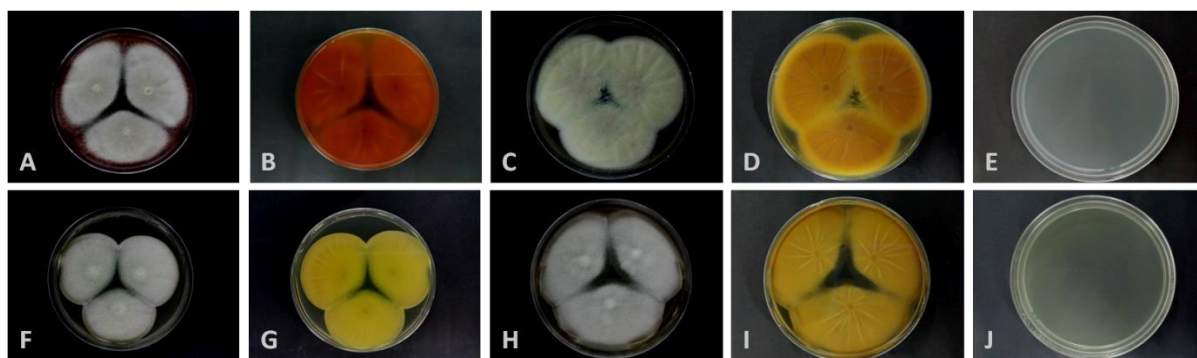


Figura 1. URM 4318 (2) Culturas incubadas durante 7 dias A/B – 37 °C em CYA; C/D – 25 °C; E – 5 °C em CYA; F/G – 37 °C em MEA; H/I – 25 °C em MEA; J – 5 °C em MEA.

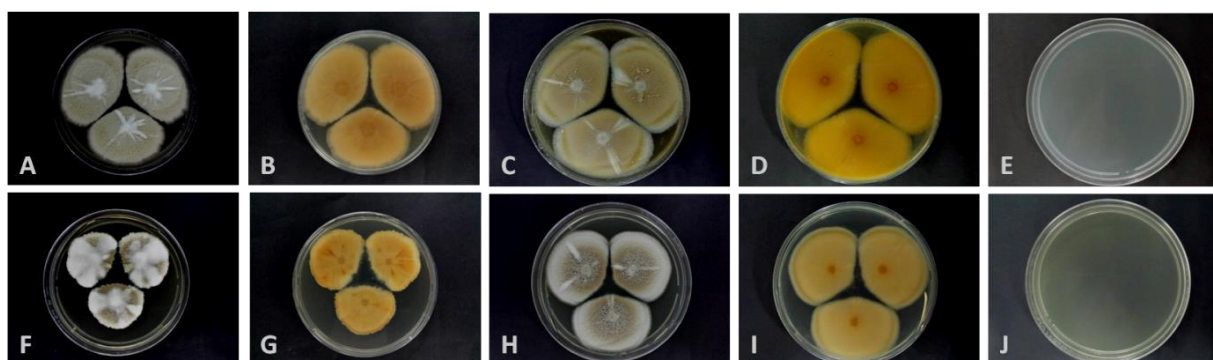


Figura 2. URM 4658 (10) Culturas incubadas durante 7 dias A/B – 37 °C em CYA; C/D – 25 °C; E – 5 °C em CYA; F/G – 37 °C em MEA; H/I – 25 °C em MEA; J – 5 °C em MEA.

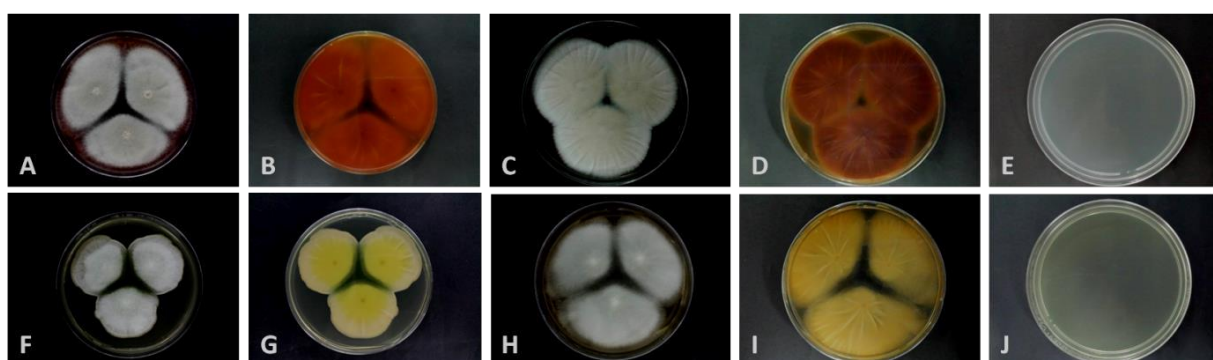


Figura 3. URM 5245 (22) Culturas incubadas durante 7 dias A/B – 37 °C em CYA; C/D – 25 °C; E – 5 °C em CYA; F/G – 37 °C em MEA; H/I – 25 °C em MEA; J – 5 °C em MEA.

Os alinhamentos de sequências foram realizados por MEGA v 6.0 e melhorados manualmente. Foi estimado MrModelTest utilizando MEGA v 6.0 e o melhor modelo de ajuste para cada partição de dados foi T92+G para ITS e K2+G para Beta. Além disso, 18 sequências de estirpes para β - tubulina e 10 para ITS foram obtidos a partir de GenBank e incluído nas análises filogenéticas. Análises Neighbor-joining foram aplicados e a robustez das árvores obtido foi avaliada por 5 000 replicações de bootstrap (Hillis, Bull 1993). *Fennellia flavipes* foi escolhido como grupo externo nestas análises, com base em estudos anteriores (Peterson, 2008).

Para 26 linhagens foram analisadas a região ITS do rDNA e realizado o sequenciamento parcial do gene para β -tubulina. Para duas linhagens (URM 1867 e URM 4362) a qualidade de DNA obtida não sou suficiente para realizar as análises, sendo necessária a repetição do processo de extração. Pela região ITS do rDNA, cinco linhagens, antes identificadas como *Aspergillus carneus*, foram identificadas como *A. terreus* (URM 4318, URM 5262, URM 5577, URM 6605, URM 6628). Todas as 15 linhagens previamente identificadas como *A. terreus*, foram confirmadas pela análise da região ITS do rDNA. Das seis culturas previamente identificadas como *A. niveus*, apenas uma foi confirmada (URM 5667). As cinco restantes foram identificadas como *A. terreus* (Tab.3; Fig.4). Através do sequenciamento parcial do gene para β -tubulina, das 26 linhagens analisadas, apenas 21 apresentaram resultados satisfatórios, sendo todas identificadas como *Aspergillus terreus*. Para cinco linhagens (URM 5577, URM 6681, URM 5667, URM 5851, URM 6604), não foram obtidas sequências viáveis (Tab.3, Fig.5). Como as espécies pertencentes à secção *Terrei* apresentam características morfológicas muito próximas, a taxonomia molecular apresenta-se como importante ferramenta para elevar a robustez da identificação. Tal fato foi observado no presente estudo, no qual foi realizada a identificação polifásica, elevando a confiabilidade dos resultados.



Figura 4. Reconstrução filogenética das culturas de *Aspergillus* da Micoteca URM a partir do alinhamento de nucleotídeos. Árvore NJ obtida com dados de sequência de ITS.

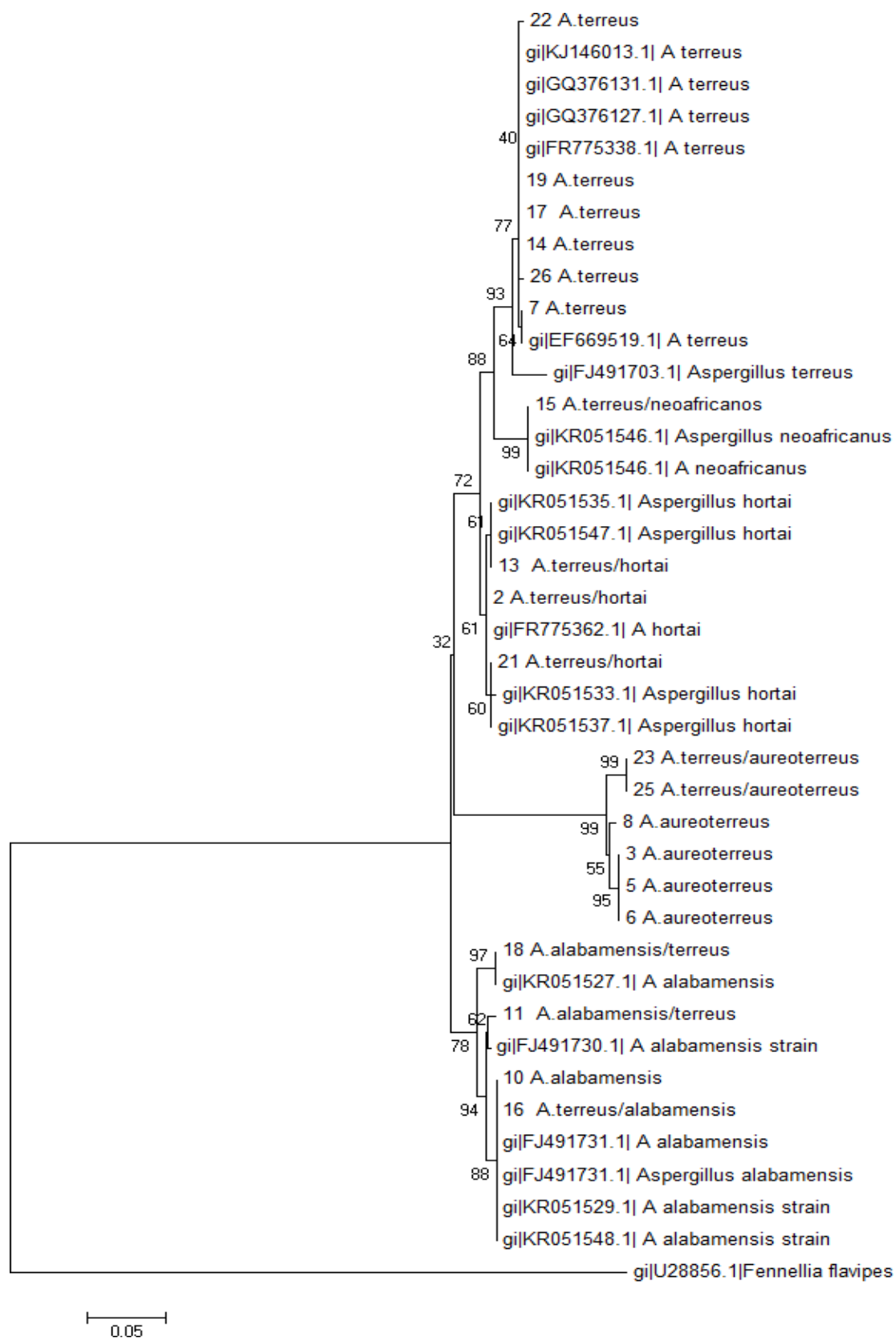


Figura 5. Reconstrução filogenética das culturas de *Aspergillus* da Micoteca URM a partir do alinhamento de nucleotídeos. Árvore NJ obtida com dados de sequência de β - tubulina.

Nº	Registro URM	Autenticação Taxonômica Clássica (Espécie)	Identificação Molecular	
			ITS	β -tubulina
1	1867	<i>Aspergillus carneus</i> (Van Tiegh) Blockwitz	-	-
2	4318	<i>Aspergillus carneus</i> (Van Tiegh) Blockwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/hortai</i>
3	5262	<i>Aspergillus carneus</i> (Van Tiegh) Blockwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/aureoterreus</i>
4	5577	<i>Aspergillus carneus</i> (Van Tiegh) Blockwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	-
5	6605	<i>Aspergillus carneus</i> (Van Tiegh) Blockwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/aureoterreus</i>
6	6628	<i>Aspergillus carneus</i> (Van Tiegh) Blockwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/aureoterreus</i>
7	3420	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
8	4199	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/aureoterreus</i>
9	4362	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	-	-
10	4658	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/alabamensis</i>
11	5222	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus alabamensis/terreus</i>
12	5281	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/hortai</i>
13	5468	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/hortai</i>
14	5514	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
15	5579	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/neoafricanos</i>
16	5650	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/alabamensis</i>
17	5864	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
18	5896	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus alabamensis/terreus</i>
19	6614	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
20	6681	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	-
21	2803	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/hortai</i>
22	5245	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
23	5461	<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/aureoterreus</i>
24	5667	<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz	<i>Aspergillus niveus/allahabadii</i>	-
25	5870	<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus/aureoterreus</i>
26	5930	<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
27	5851	<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	-
28	6604	<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz	<i>Aspergillus terreus</i>	-

Tabela 3. Autenticação taxonômica clássica e molecular dos isolados da seção *Terrei* preservados na Coleção de Culturas Micoteca – URM, da UFP

Seleção do melhor produtor e melhor substrato para produção enzimática

A seleção do melhor produtor é frequentemente o primeiro passo para se obter os micro-organismos com características destinadas a aplicações industriais, permitindo a caracterização e a escolha de linhagens de fungo com a produção ótima de enzimas. Além disso, a informação obtida adiciona valores a esses recursos microbianos conservados em coleções de culturas.

Todas as 28 culturas testadas foram capazes de produzir lipases através de fermentação submersa, utilizando dois diferentes substratos: óleos de oliva (*Olea europaea* L.), e óleo de peixe Tilápia (*Oreochromis niloticus* L.). Testando o substrato óleo de oliva, as atividades variaram entre 0,35 U/mL, *Aspergillus niveus* URM 5851 e 18,47 U/mL por *Aspergillus terreus* URM 6614. O substrato testado, óleo de peixe, apresentou máxima produção de lipase também pelo isolado *Aspergillus terreus* URM 6614 com 22,30 U/mL, e a menor produção por *Aspergillus carneus* URM 4318, com 1,41 U/mL (Fig. 6).

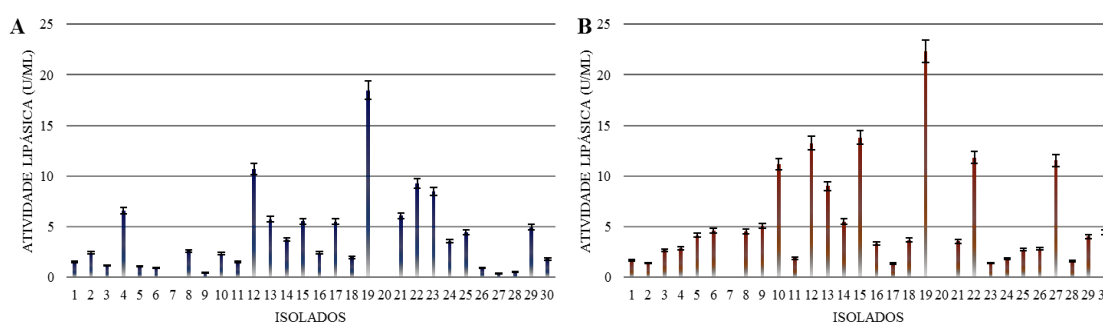


Figura 6. Atividades lipásicas das 28 linhagens de *Aspergillus* em 96 horas, utilizando óleo de oliva (A) e óleo de peixe de Tilápia (B) como substratos.

Com o melhor isolado produtor, foram testados outros dois substratos, o Hidrolisado Proteico de Peixe (HPP) de Tilápia e o hidrolisado de cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* B.). A escolha deste substrato teve como objetivo a diminuição do custo final do processo, uma vez que, a extração do óleo requer outras etapas que podem influenciar o preço final do produto. Ao testar o hidrolisado de camarão, a atividade lipásica foi de 14,74 U/mL, no entanto, com o hidrolisado de peixe, produto da etapa anterior da extração do óleo de peixe de Tilápia, a atividade foi semelhante a inicialmente obtida, 22,46, no entanto, esse substrato, foi o escolhido devido a sua facilidade de obtenção e diminuição de custos (Fig. 7).

Os lipídios são indutores essenciais para produção de lipases (Messias et al., 2011) e o óleo de peixe, assim como outros óleos, pode ser considerado uma fonte de carbono comumente utilizadas para esse processo (Damaso et al., 2008).

Aspergillus terreus URM 6614 foi selecionado para estudos de otimização da produção enzimática, utilizando hidrolisado de peixe de Tilápia como substrato apresentou maior atividade lipolítica (22,46 U/mL) dentre todos os substratos e micro-organismos testados. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Reinehr et al., (2016).

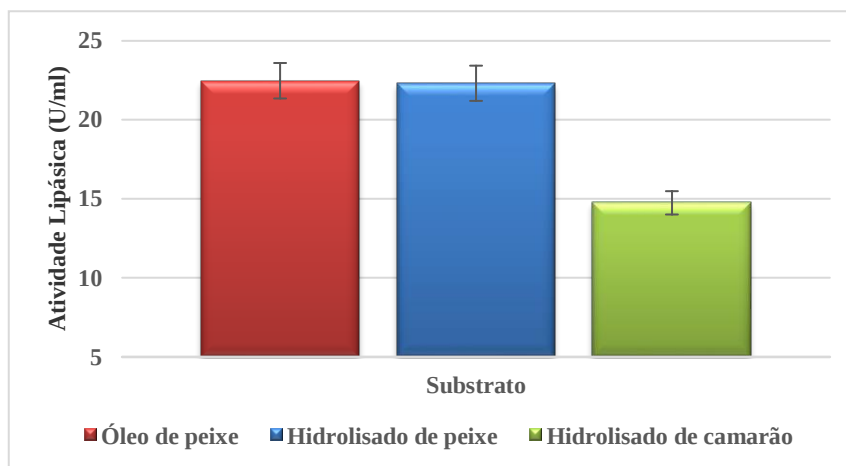


Figura 7. Atividades lipásica dos substratos testados para melhor produção de lipases.

Efeito ao pH e temperatura

As avaliações dos efeitos de pH, temperatura e outras variáveis sobre a atividade enzimática são fundamentais para uma futura transposição de escala industrial em biotecnologia. O efeito do pH na atividade lipolítica apresentou ótima atividade em pH 7,0 (Fig. 8a). Este resultado vai de acordo com Kamini et al., (1998) que reportaram que a lipase obtida por *A. niger* exibio máxima atividade em pH 7,0.

Os valores de pH estudados para a definição do pH ótimo, estão de acordo com os dados obtidos na literatura numa faixa de 2,0 a 10,0 (Mahadik et al., 2002; Pastore et al., 2003). Lipases que são estáveis e possuem atividade ótima em condições neutra a alcalina são consideradas as candidatas promissoras para remoção de manchas de gordura na formulação de detergentes (Emtenani et al., 2013) e no tratamento e resíduos de indústrias (Lotraku; Dharmsthiti, 1997).

Pôde-se verificar que o efeito da temperatura na atividade de lipases de *Aspergillus terreus* URM 6614 é maior a 40 °C (Fig. 8b). Bakir; Metin (2016) estudando a atividade lipolitica de *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 reportaram atividade máxima obtida a 50 °C utilizando trioleína como substrato, mostrando que a fonte microbiana influencia diretamente na escolha da faixa de temperatura ótima para a atividade lipolítica.

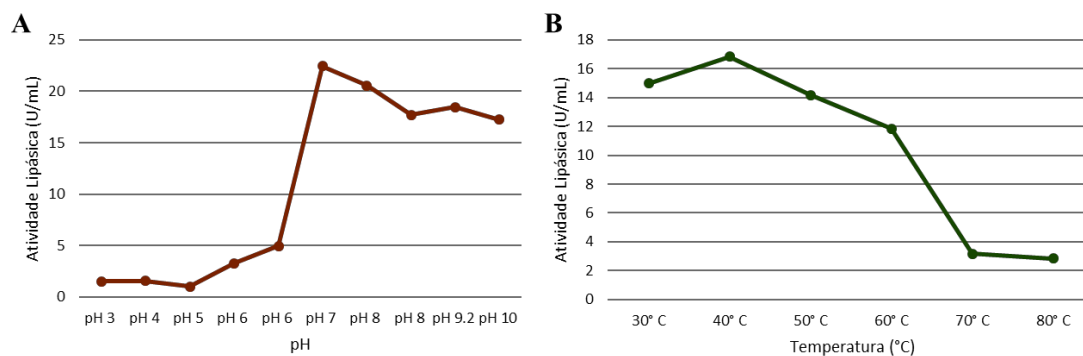


Figura 8. Efeitos de pH (A) e temperatura (B) sobre a atividade lipásica.

Estes resultados indicam que a enzima pode ser utilizada em vários processos industriais, como na indústria de detergentes, cosméticos, têxtil e na indústria de alimentos (Hasan et al., 2006).

Otimização da produção de lipases por Aspergillus terreus URM 6614

Análise estatística dos componentes do meio para a produção de lipases no planejamento Design Plackett-Burman (PB)

O uso de modelos estatísticos para otimizar o meio, os componentes do meio de cultura e outras condições de cultivo, aumentou a biotecnologia moderna devido à sua importância e relevância. No presente estudo, os componentes de cultura necessários para a produção de lipases foram selecionados usando o projeto PB.

Os ensaios 2 e 6 obtiveram as maiores atividades, 26,51 U/mL e 26,93 U/mL, respectivamente, no entanto, o ensaio 2 foi o escolhido por ter melhores condições de produção, com 2 mL da concentração do hidrolisado, pH 7,5, 120 dias de incubação, 150 rpm, 0,01 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g de extrato de levedura, 0,025 g de CaCl_2 , 0,025 g de NaCl , 0,01 g de KH_2PO_4 , a 30 °C. Temperatura e tempo de fermentação são variáveis muito importantes do ponto de vista industrial, uma vez que podem diminuir o custo com todo o processo de produção da enzima.

Após obtenção dos resultados de atividade enzimática e utilizando o pacote de software estatístico, foi possível a identificação e seleção das variáveis mais significativas. A Figura 9 apresenta os efeitos individuais para a produção das lipases, e os dados evidenciam que das 10 variáveis utilizadas para a fermentação, as variáveis tempo de incubação, pH, cloreto de sódio, sulfato de amônio, cloreto de cálcio e fosfato de potássio não foram estatisticamente

significativas para a produção das lipases, no entanto, as variáveis estatisticamente significativas foram concentração do hidrolisado e do extrato de levedura ($p < 0,10$).

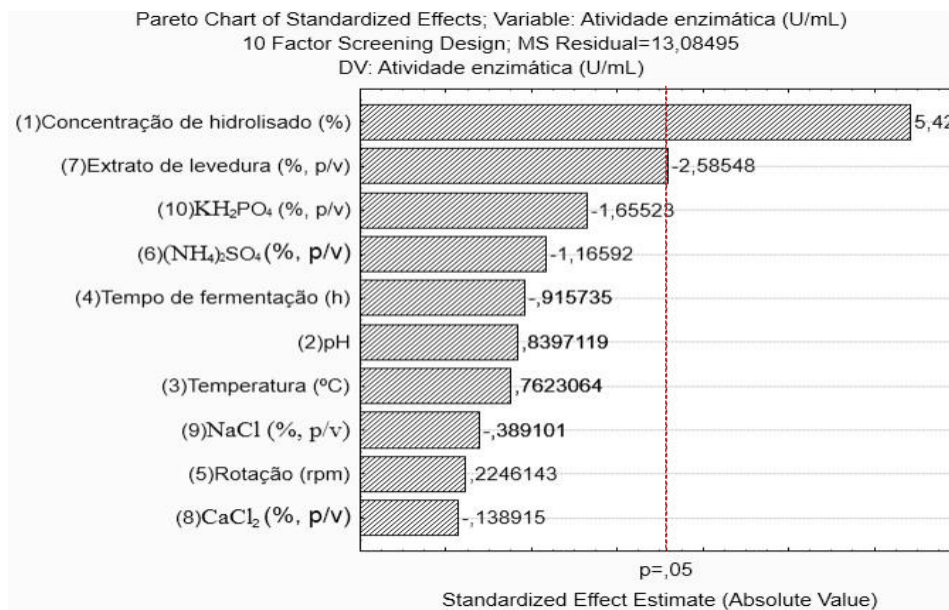


Figura 9. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis para a produção das lipases baseados nos resultados experimentais Plackett-Burman (PB).

Durante todas as análises foi observado um padrão similar dos efeitos das variáveis, mesmo em tempos de fermentação diferentes. Observou-se na Figura 9 que a concentração do hidrolisado foi o parâmetro mais significativo para a produção de lipases por *A. terreus* URM 6614. O efeito da concentração do extrato de levedura foi significativo e negativo, ou seja, uma menor concentração do indutor (3%), já a concentração do hidrolisado foi significativo e positivo, favorecendo a produção de lipases pelo micro-organismo em estudo. A adição de sais, tempo de fermentação, pH, temperatura e rotação não foram variáveis significativa para a produção enzimática por *A. terreus* URM 6614. Portanto, em caso de produção industrial utilizando o campo experimental estudado, quanto mais simples o meio menores serão os custos da produção.

Visando otimizar ainda mais a produção de lipases por *Aspergillus terreus* URM 6614, as condições aplicadas no ensaio 2 do planejamento PB foram selecionadas para serem utilizadas no planejamento Doehlert.

Otimização das variáveis significantes usando planejamento Doehlert como metodologia de superfície de resposta

Os experimentos realizados sob diferentes condições permitem fornecer informações importantes relacionadas com a atividade lipolítica, bem como o estabelecimento de ótimas condições para a atividade enzimática. Técnicas de análise multivariadas são importantes porque eles são capazes de estudar diversas variáveis e suas interações. Eles permitem a otimização simultânea de variáveis e, portanto, são mais econômicas e eficazes.

A metodologia de superfície de resposta pelo planejamento Doehlert foi adotada através da seleção das variáveis significativas: concentrações do hidrolisado e extrato de levedura. Na Tabela 4 estão descritos os valores da atividade lipásica (U/mL) obtidos no experimento Doehlert, evidenciando que as melhores condições para a produção da lipase por fermentação submersa por *A. terreus* URM 6614 encontra-se no ensaio 9 composto: hidrolisado (10% v/v), extrato de levedura (0,2% p/v), tempo de fermentação (120h), Rotação (150 rpm), pH 7,5 a 30°C. Neste ensaio a atividade de lipase experimental foi de 35,04 U/mL.

Tabela 4. Desenho experimental e resultados do Planejamento Doehlert.

Ensaio	Extrato de levedura (%)	Concentração de hidrolisado (%)	Atividade lipásica (U/mL)	
			Experimental	Esperada
1	0,6	6,0	27,90	27,90
2	0,6	10,0	32,82	32,81
3	0,4	4,0	22,66	22,65
4	0,4	8,0	31,28	31,42
5	0,4	8,0	31,59	31,42
6	0,4	8,0	31,40	31,42
7	0,4	12,0	33,83	33,83
8	0,2	6,0	28,75	28,75
9	0,2	10,0	35,05	35,04

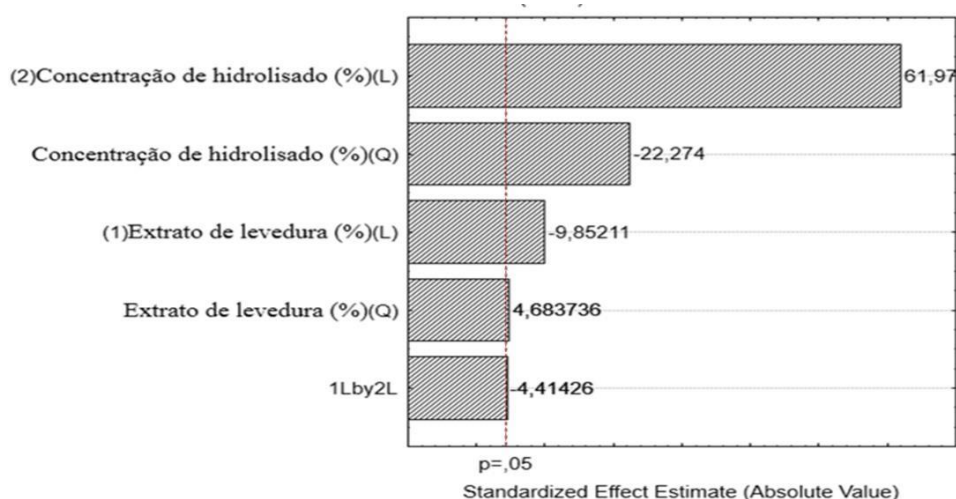
A análise de regressão múltipla foi realizada por meio do método mínimos quadrados através do software STATISTICA 7.0 (StatSoft, EUA). Na maioria dos estudos a ANOVA geralmente mostra um resultado significativo originando um modelo experimental quadrático (Gopinath et al., 2003; Singh; Satyanarayana, 2008; Salihu et al., 2011). A ANOVA para a produção da lipase neste estudo, mostrou que o modelo matemático quadrático foi significativo ($F_{cal} > F_{tab}$), obtendo uma equação polinomial de segunda ordem (Tab. 5).

Tabela 5. Análise de variância da ANOVA da produção de lipases por *A. terreus* utilizando hidrolisado de peixe como fonte de carbono.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Fcal	Ftab (90%)
Regressão	110,95	5	22,19	1386,88	5,31*
Resíduo	0,049	3	0,016		
Falta de ajuste	0,00040	1	0,00040	0,018	8,53
Puro erro	0,049	2	0,025		
Total	111,00				

*Estatisticamente significativo.

O gráfico de Pareto mostrou que todos os fatores em seus termos lineares e quadráticos, assim como a interação foi significativa ao nível de significância estudado, $p < 0,10$) (Fig.10).

**Figura 10.** Gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis e suas interações para a produção das lipases baseados nos resultados experimental Doehlert.

As Figuras 11 e 12, apresentam gráficos de projeção da superfície de resposta e de contorno em função dos fatores experimentais: concentração do hidrolisado e concentração de extrato de levedura. Pode-se verificar que as melhores condições para a produção das lipases em fermentação submersa por *Aspergillus terreus* URM 6614 apresentaram-se quando á o aumento da concentração do hidrolisado e a diminuição da concentração do extrato de levedura.

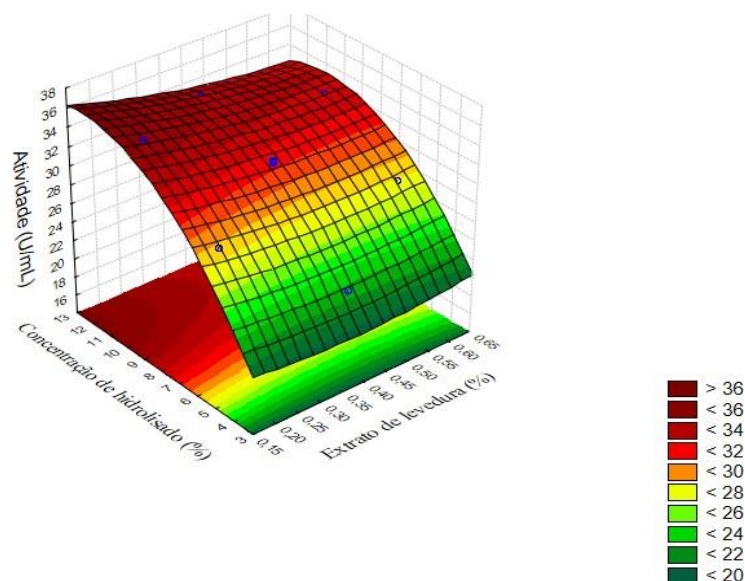


Figura 11. Gráfico de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais para a produção de lipases por *A. terreus* URM 6614.

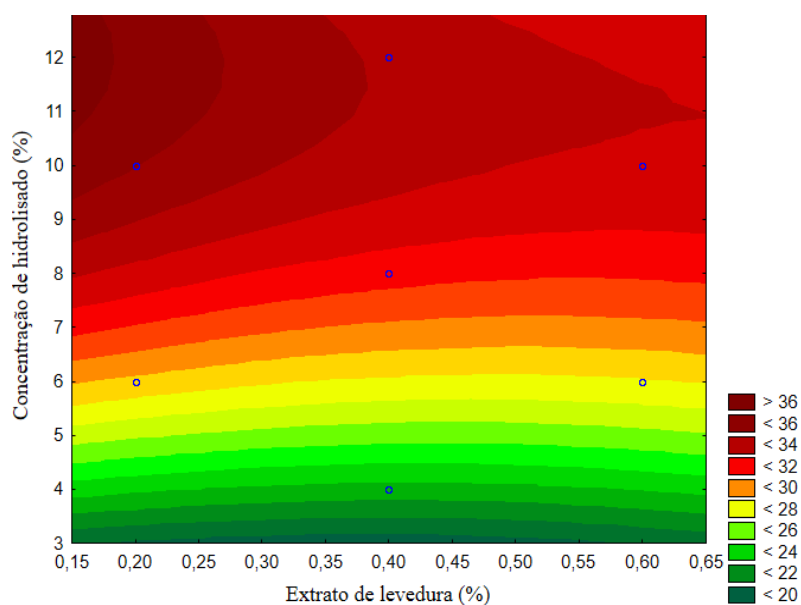


Figura 12. Superfície de contorno mostrando os efeitos das variáveis significativas para a produção lipásica baseados nos resultados experimentais de Doehlert.

Conclusão

Espécies de *Aspergillus* pertencentes à secção *Terrei* apresentam alta similaridade morfológica, sendo necessária para a sua taxonomia uma abordagem polifásica. A amplificação da região ITS do rDNA, bem como a amplificação parcial do gene para a β -tubulina, são importantes ferramentas para compor uma abordagem polifásica no processo de identificação.

Aspergillus terreus URM 6614, trata-se de um novo relato de produção de lipases por uma linhagem desta espécie, sendo a utilização de hidrolisado de peixe Tilápia (*Oreochromis niloticus* L.) o primeiro relato como substrato para a produção dessa enzima. Este micro-organismo torna-se bastante promissor para a produção de lipases, por produzir níveis significativos destas enzimas, em temperatura moderada, utilizando substrato de baixo custo, um meio de cultura simples para a produção, minimizando assim os custos da produção

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, a Micoteca URM do Departamento de Micologia e ao Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, a Indústria Netuno Pescado bem como aos colegas envolvidos nessa pesquisa.

5 APLICAÇÃO DE LIPASES PRODUZIDAS POR *ASPERGILLUS TERREUS* URM 6614 NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE LATICÍNIOS

Cyndy Mary Farias^{1, 2}, Minelli Albuquerque de Sousa², Keila Moreira³, Cristina Souza-Motta², Ranilson de Souza Bezerra^{1*}

¹Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

²Micoteca, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

³Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural Pernambuco, 55292-270, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

*Autor para correspondência

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

Tel., +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

E-mail: ransoub@uol.com.br

Resumo

Efluente com elevados teores de gordura e proteínas, como os gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústria de alimentos em geral, apresentam demanda química e biológica de oxigênio elevada. A aplicação de lipases na degradação biológica e remoção de carga lipolítica desses efluentes pode ser considerada como uma tecnologia altamente promissora no contexto atual, uma vez que é capaz de reduzir o tempo destes efluentes na digestão anaeróbia com consequente redução dos impactos ambientais. Objetivou-se neste trabalho, verificar a atuação de um tratamento enzimático para a redução de gorduras dos resíduos gerados por indústria de produtos lácteos. O enfoque foi baseado no uso de lipases produzidas por *Aspergillus terreus* URM 6614 por fermentação submersa, utilizando resíduo de peixe como substrato, em forma de extrato bruto e pré-tratado, afim de verificar a viabilidade do processo em custos reduzidos. A lipase demonstrou ser estável em uma ampla faixa de pH, íons metálicos, solventes orgânicos e na maioria dos inibidores, sendo desnaturada na presença do surfactante PMSF. O tratamento enzimático do efluente com a aplicação do extrato enzimático bruto foi superior ao apresentado com o extrato enzimático pré-tratado, verificando a eficiência do processo de degradação da matéria orgânica, de modo a permitir estudo futuros para uma aplicação em larga escala.

Palavras-chave: *Aspergillus*, Fermentação Submersa, resíduo pesqueiro, Lipases, efluente.

Introdução

Lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas encontradas na natureza, a partir de tecidos animais, vegetais e em micro-organismos. Atuam sobre as ligações ésteres presentes em triacilglicéreis, liberando diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol, constituem uma classe especial de esterases por agir na interface entre a fase aquosa e não-aquosa o que as distingue das esterases, que são enzimas que agem em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lipídeos (Darvishi et al., 2009; Barros et al., 2010; Rigo et al., 2010).

Essas enzimas podem ser obtidas de plantas, animais e microrganismos. As lipases microbianas têm sido amplamente pesquisadas e empregadas na indústria, dentre estas as produzidas por fungos são especialmente valorizadas por serem extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de cultivo (Carvalho et al., 2003), além de possuírem características importantes tais como baixo custo de produção, atividade catalítica diversificada e estabilidade em solventes orgânicos (Shu et al., 2010).

As enzimas industriais são produzidas principalmente através de bioprocessos como cultivos submersos usando fungos filamentosos, sendo os gêneros mais citados para a produção de lipases os *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (D'anniballe et al., 2006; Colla, et al., 2012).

Os fatores que podem afetar a produtividade destes bioprocessos são principalmente os tipos e concentrações de nutrientes, o pH, a agitação e a presença e concentração de indutores. A realização de pesquisas que utilizem micro-organismos isolados de novos ambientes, bem como a utilização de novas fontes de substratos é necessária, a fim de obterem-se elevadas produtividades a custos menores (Colla et al., 2012).

Os resíduos do beneficiamento de peixe podem ser valorizados mediante a hidrólise da biomassa para a obtenção de silagem de peixe, não só devido à sua composição lipídica, rica em ácidos graxos de cadeia longa, mas também por se tratar de uma matéria-prima abundante no Brasil, a partir de peixe inteiro (de baixo valor comercial), como de carnes de carcaça e sobras do processo de filetagem como, por exemplo, de carpa ou de tilápia (Sebben et al., 2002; Oliveira et al., 2006; Arruda et al., 2006). A bioconversão do material residual, com consequente aproveitamento deste, trará vantagens econômicas para a indústria processadora de pescado, além de sanar o grande problema de eliminação de resíduos, matéria poluente e de difícil descarte (Seibel; Soares, 2003; Oliveira et al., 2004; Feltes et al., 2010).

A escolha de uma configuração apropriada junto com as condições operacionais são aspectos importantes que permitem que processos enzimáticos resultem em alta produtividade

(Sapongic et al., 2010). Objetivando a viabilização de sua aplicação industrial, é de extrema importância interrelacionar estratégias e procedimentos adequados para a otimização de fatores envolvendo etapas de produção até aplicação final da enzima, com intuito de reduzir custos no processo e melhorar a qualidade final do produto (Santos, 2014).

A aplicação de lipases na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos e abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral, pode ser considerada como uma tecnologia altamente promissora no contexto atual, devido à maior exigência legal que instituiu a cobrança de taxa de água. Pelo fato da água exercer papel fundamental nessas indústrias, o que resulta na geração de volumes significativos de efluentes, existe a necessidade de efetuar sua recuperação e esse desafio não pode ser ignorado (Purwanto et al., 2015). Portanto, a gestão financeira das empresas deverá interpretar as novas tecnologias para o tratamento e reuso de efluentes como componente do custo final da produção e nunca posteriormente como encargo suplementar, ou seja, o tratamento enzimático tende a se tornar parte integrante do processo produtivo (Leal et al., 2002; Santos et al., 2014).

Atualmente, o tratamento de efluentes industriais e a proteção social são duas das principais preocupações industriais, da forma mais adequada e eficaz em termos de custos, para evitar riscos e custos potenciais. Resíduos de laticínios apresentam altos níveis de gorduras e proteínas, o que pode acarretar a poluição da terra e da água. Existem diferentes métodos para o tratamento deste efluente, mas é sempre necessário reduzir a gordura, óleo e proteínas (Cammarota; Freire, 2006). As indústrias pagam multas severas devido a descarga desapropriada desses efluentes em sistemas de esgotos, devido a sua elevada taxa de Demanda Química de Oxigênio (DQO), resultando em uma perda de lucro (Contesini et al., 2010).

Os setores acadêmicos e industriais têm se dedicado arduamente à obtenção de melhores biocatalisadores como alta enantiosseletividade e estabilidade frente a diferentes condições reacionais, quer seja a aplicação, pequena ou em larga escala (Hartmann; Jung, 2010). Desta forma, torna-se interessante a exploração da biodiversidade buscando micro-organismos hábeis a produzir lipases, considerando que estas são enzimas que podem ser secretadas por uma grande quantidade de micro-organismos, principalmente por fungos, indicando assim, perspectiva promissora na área científica e comercial.

Metodologia

Micro-organismo

A espécie de *Aspergillus terreus* URM 6614 previamente testado como bom produtor de lipases, foi utilizado neste estudo. O isolado foi inoculado em Ágar Extrato de Malte (MEA), contido em tubo de ensaio e incubado a 30 °C. Após o crescimento, as culturas foram mantidas a 4 °C, para utilização a curto prazo. Em seguida, esporos de cada cultura foram transferidos para tubo de ensaio contendo 10 ml de água destilada estéril com 0,1% de Tween-80. A suspensão de esporos, assim obtida, foi utilizada como inoculo. Os esporos viáveis foram determinados pela técnica de contagem em placa (Sabu et al., 2005).

Lipases de Aspergillus terreus URM 6614

O extrato testado foi produzido por fermentação submersa (FS) utilizando resíduo de peixe tilápia como substrato para produção enzimática, o qual foi selecionado após testes de melhores condições de cultivo, em trabalho anteriormente realizado (dados não apresentado).

Métodos Analíticos

Foi utilizado o método espectrofotométrico para determinar a atividade da lipase de acordo com Pimentel et al., (1994), com base na hidrólise de *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP) em *p*-nitrofenol (PNP) e palmitato. A atividade consiste na mistura de 1 ml de extrato bruto e 9 ml da solução substrato (0,018 g *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP) dissolvido em 6 ml de isopropanol, em 450 ml de tampão fosfato 50 mM pH 8,0 contendo 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica). A liberação de pNP a 37 °C, em 30 minutos de incubação, foi detectada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a clivagem de 1 µmol/min *p*NPP, pH 7,0 (0,05 M de fosfato tampão fosfato), 37 °C. O coeficiente de absorção molar de *p*NPP ($1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi utilizado para calcular a atividade enzimática.

O teor de proteína foi determinado de acordo com Bradford (1976) a 595 nm, utilizando Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão. Para cada amostra, as determinações foram realizadas em triplicata.

Caracterização Enzimática

Efeito e estabilidade ao pH e a temperatura

Para estudar o efeito e a estabilidade ao pH ótimo para a atividade da lipase, o extrato bruto foi analisado na faixa de pH 3,0 - 10,0 usando os seguintes tampões (100 mM): citrato (pH 3,0 – 6,0), fosfato (pH 6,0 – 8,0), Tris-HCL (pH 8,0) e carbonato (pH 9,0 – 10,0). As atividades residuais foram então analisadas. Para estudar o efeito e a estabilidade à temperatura a atividade da lipase, o extrato bruto enzimático foi testado em diferentes temperaturas entre 30 e 90 °C. A atividade enzimática residual foi expressa em porcentagem da atividade no tempo zero (100%) (Dantas; Aquino, 2010).

Efeito a íons, detergentes e solventes orgânicos

Para avaliação dos efeitos de íons, detergente e de solventes orgânicos, o extrato bruto foi incubado com os inibidores (1:1) a 37 °C por 30 min. Após esse período acrescentou-se a solução substrato e foi realizada a leitura em espectrofotometro. As atividades enzimáticas residuais foram expressas em porcentagem da atividade no tempo zero (100%) (Dantas; Aquino, 2010).

Pré-tratamento do Extrato Bruto

Precipitação com sulfato de amônio (H_2SO_4)

Para determinar a melhor condição de aplicação do extrato enzimático, foram realizados testes de clarificação do extrato em diferentes faixas de fracionamento, compreendendo: de 0 a 20, de 20 a 40, de 40 a 60 e de 60 a 80% de saturação (Carvalho et al., 2005). Para isso, 150 mL deste extrato enzimático bruto foi colocado em béqueres de 500 mL e acrescentou-se sulfato de amônio até a saturação desejada. Esta etapa foi realizada em agitador magnético em banho de gelo a 4° C, com controle de pH (7,0), até completa dissolução do sal. O extrato foi então colocado em tubos de centrífuga e permanecia pelo tempo determinado no planejamento a -10 ° C para cada precipitação da amostra. Decorrido este tempo de precipitação, as amostras eram então centrifugadas a 4 ° C, 8.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante era descartado e o precipitado removido com quantidade mínima de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Shu et al., 2006; Menoncin et al., 2010).

Diálise

Após a concentração da amostra, foi realizada a diálise das mesmas em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7 por 24 horas, utilizando membranas de diálise 33 x 21 mm, previamente preparadas. Decorrido esse tempo, as amostras foram congeladas a -80 e posteriormente

lioofilizadas e, então, era medida a atividade lipásica, conforme metodologia descrita anteriormente.

Aplicação da Lipase em Efluentes de Laticínios

Origem e caracterização físico-química do efluente

Amostra do efluente laticínios, utilizado em todos os experimentos foi coletado na indústria de laticínios Bom Leite, que fica localizada na cidade de Garanhuns no Estado de Pernambuco (Brasil). As amostras foram coletadas do ponto de descarte do efluente, sem qualquer tratamento prévio durante o funcionamento normal da fábrica. A temperatura e pH do efluente foram monitorados no momento da coleta 35 °C e 6,8 , respectivamente. As amostras foram transferidas para um recipiente refrigerado (4 °C) durante a coleta. O conteúdo do recipiente foi homogeneizado e armazenado a 4 °C, uma amostra do efluente foi caracterizada em termos de demanda química de oxigênio (DQO) e óleos e gorduras (O e G).

Otimização do tratamento enzimático por delineamento fatorial

Ensaio enzimáticos com o efluente

Neste trabalho utilizou-se o extrato enzimático bruto e pré-tratado, que foi mantido a -10 °C. Uma amostra do efluente de laticínios com 10 g / L O & L foi transferida para um Erlenmeyer de 100 mL. A normalização do teor de óleo e graxa foi realizada misturando do teor de óleo e graxa conhecida. Cada reação foi realizada durante 24 horas e a cinética de hidrólise foi seguida por detecção de ácidos graxos livres (AGL) formados durante a reação. Realizou-se um ensaio experimental sem a adição da enzima para utilização como controle. As amostras (2 mL) do meio reacional foram recolhidas e adicionadas a 20 mL de uma solução de acetona: etanol (1: 1) para parar a reação e extrair os AGL. Como controle, uma corrida experimental foi realizada sem a adição da enzima. As amostras do meio de reação foram recolhidas nos tempos de 16, 20 e 24h de reação para posterior análise da atividade enzimática por espectrofotometria.

A avaliação do efeito dos fatores sobre a hidrólise de óleos e graxas do efluente foi realizada por planejamentos experimentais que permitiu a obtenção de resultados com um número reduzido de 12 ensaios. As variáveis estudadas foram: quantidade de enzima (*E*) 1% (m/v), 2,5%(m/v), 5% (m/v); temperatura 30 °C, 35 °C e 40 °C; pH 6,5, pH 8,5, pH 10,5 e agitação 0 rpm, 100 rpm e 200 rpm (Rigo et al, 2010). A matriz do planejamento fatorial encontra-se apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^4) Plackett-Burman (PB) para a aplicação de lipases por *Aspergillus terreus* URM 6614 com o extrato bruto e pré-tratado.

Ensaio	T (°C)	Agitação (rpm)	pH	E (% m/v)*
1	30 (-1)	0 (-1)	6.5 (-1)	1 (-1)
2	40 (+1)	0 (-1)	6.5 (-1)	5 (+1)
3	30 (-1)	200 (+1)	6.5 (-1)	5 (+1)
4	40 (+1)	200 (+1)	6.5 (-1)	1 (-1)
5	30 (-1)	0 (-1)	10.5 (+1)	5 (+1)
6	40 (+1)	0 (-1)	10.5 (+1)	1 (-1)
7	30 (-1)	200 (+1)	10.5 (+1)	1 (-1)
8	40 (+1)	200 (+1)	10.5 (+1)	5 (+1)
9	35 (0)	100 (0)	8.5 (0)	2.5 (0)
10	35 (0)	100 (0)	8.5 (0)	2.5 (0)
11	35 (0)	100 (0)	8.5 (0)	2.5 (0)
12	35 (0)	100 (0)	8.5 (0)	2.5 (0)

*Concentração de extrato bruto e pré-tratado

Resultados e Discussão

Caracterização do Extrato Bruto.

Determinação do efeito e estabilidade da enzima frente ao pH e temperaturas

O pH e a temperatura têm grande influência na atividade enzimática, sendo importante definir estes parâmetros para a caracterização das enzimas obtidas. O pH ótimo foi de 7 fosfato, sendo que a enzima manteve mais de 70 % da atividade relativa entre os pH 8,0 e 10. A temperatura ótima foi de 40 °C, com mais de 50% de atividades relativas até 60 °C.

O pH e temperatura ótimos encontrados neste estudo para a atividade de lipases fúngicas são semelhantes aos resultados relatados na literatura acadêmica, nos quais as atividades lipase máxima foram obtidas em torno de 30 °C e 40 °C e pH 6,0 a 8,0 (FU et al., 2009).

Maldonado (2006) obtiveram atividades lipolíticas máximas a pH 7,0 e 37 °C para lipase bruta e purificada de *Geotrichum candidum*. Baron et al. (2005) verificaram que existe um intervalo de pH (6,0 e 8,0) onde a atividade enzimática é máxima e que a atividade não depende apenas do pH do meio, mas também do tipo de tampão utilizado. Freire et al. (1997) relataram que o pH e temperatura ótimos para as lipases produzidas por *Penicillium* sp. são de 7.0 e 37 °C. Benjamin e Pandey (2001) relataram que as lipases produzidas por *Candida rugosa* apresentaram ótima atividade a pH 7,0 e a temperatura de 40 °C. Pastore et al. (2003) caracterizou as lipases produzidas por *Rhizopus* sp. e encontrou atividade máxima a pH 6,0 e

6,5 e 40 °C. No entanto, Diaz et al. (2006) caracterizaram as lipases do fungo *Rhizopus homothallicus* obtidas por fermentação submersa, obtendo-se máxima atividade a pH 7,5 e 30 a 40 °C, respectivamente.

Após a etapa de efeito ao pH e a temperatura, experiências foram conduzidas para avaliar a estabilidade da enzima obtida, com a manutenção do extrato enzimáticos a temperaturas que variaram de 30 °C até 80 °C pelo período de tempo total de 4h (Fig. 1). As atividades enzimáticas foram avaliadas no pH e temperaturas otimizadas no passo anterior.

As enzimas foram estáveis entre 30 °C e 40 °C, com atividade residual superior a 80% durante as 4 horas. Observou-se uma inativação inicial das enzimas entre 40 °C e 50 °C, a partir da primeira hora de incubação.

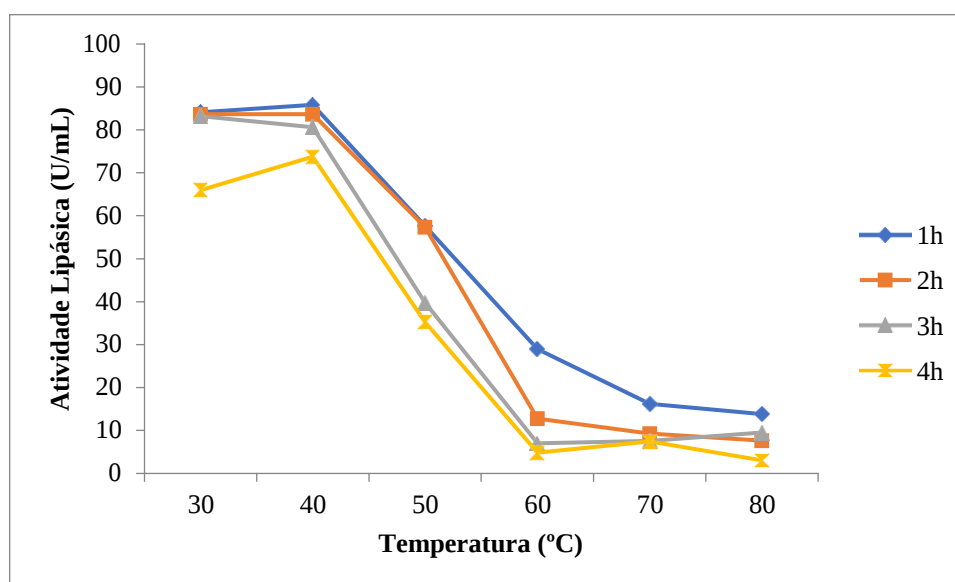


Figura 1. Estabilidade a temperatura frente à atividade lipásica em até 4 horas de incubação.

Shu et al. (2006) relataram que as lipases produzidas por *Antrodia cinnamomea* tinham 50% de atividade residual entre 25 °C e 40 °C. A lipase de *Aspergillus niger* NCIM 1207 foi estável a 40 °C durante 3 h, contudo o tratamento a 50 °C durante 1h causou 52% de perda de atividade. Baron et al., (2005) mostraram que as lipases produzidas por *Penicillium corylophilum* foram completamente inativadas após 30 min a 60 °C. No entanto, as lipases produzidas por *Rhizopus* sp, apresentava moderada termoestabilidade, com 70% de atividade residual a temperaturas de 40 a 55 °C. Além disso, Iftikhar et al., (2011) demonstraram que as lipases retinham 80% de sua atividade a 25- 30 °C por meio de plantas silvestres e 100% de sua atividade a 20-50 °C pela estirpe mutante de *R. oligosporus* e com o aumento na temperatura de incubação, a atividade da enzima foi grandemente inibida.

Na área industrial existem muitos processos que ocorrem em temperaturas em torno de 50° C. Uma vez que a termoestabilidade é uma característica requerida para as enzimas utilizadas no ramo industrial, faz-se necessário o seu estudo. A estabilidade pode variar dependendo da espécie, gênero e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa. A maioria das lipases apresenta temperatura de atividade ótima na faixa entre 30 e 40 °C (Quyen et al., 2003).

A termoestabilidade enzimática pode ser afetada pelas condições de produção, tais como o microrganismo produtor, o método de cultivo e o meio utilizado (Maldonato, 2006). A termoestabilidade é o resultado da sequência de aminoácidos da proteína, que proporciona uma conformação mais rígida à enzima (Iyer; Ananthanarayan, 2008) através de interações intramoleculares, com a internalização de resíduos hidrofóbicos e a exposição superficial de resíduos hidrofílicos (Mhetras et al., 2009).

A estabilidade de pH do extrato enzimático foi determinada, tratando este extrato com diferentes tampões até o tempo total de 4h e após a atividade enzimática foi determinada utilizando o pH otimizado e a temperatura para as enzimas de cada processo de fermentação.

As lipases produzidas por fermentação por *Aspergillus terreus* foram estáveis a pH variando de 6,0 a 10 por 4h, com atividades residuais superiores a 80%. A pH 7 a 10 houve uma redução na estabilidade de enzimas com uma atividade residual de cerca de 50%.

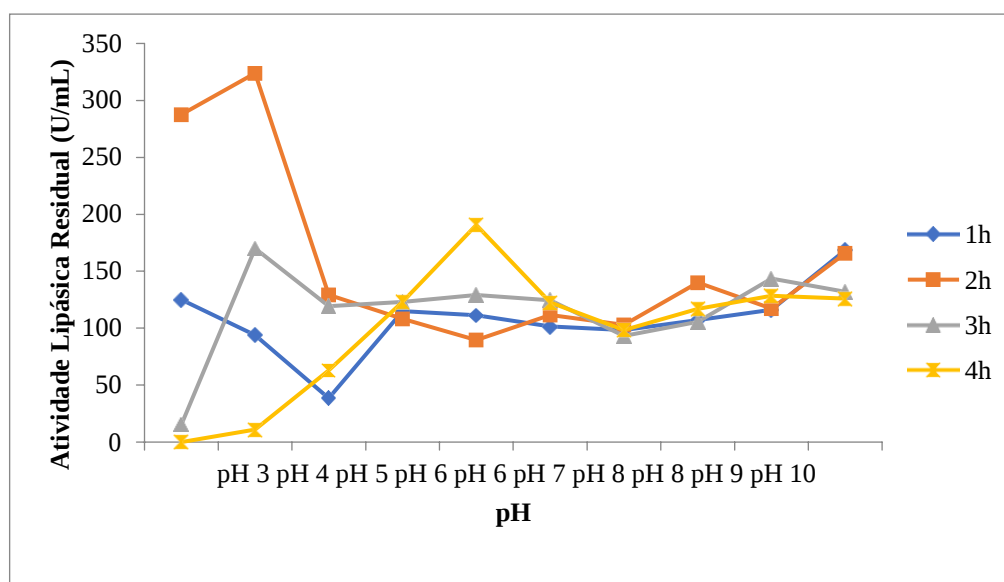


Figura 2. Estabilidade ao pH frente à atividade lipásica com até 4 horas de incubação.

Isto pode ser semelhante ao relatado por Mhetras et al., (2009), as autoras disseram que as lipases produzidas por *Aspergillus niger* NCIM 1207 eram estáveis quando o pH era alcalino

(pH 8 a 11) apesar de terem uma atividade ótima a um pH ácido. Fu et al., (2009) relataram que as lipases produzidas por *Candida* sp. foram estáveis a pH variando de 7,5 a 8,5 durante 15 min.

As lipases obtidas no presente estudo com fermentação submersa tinham uma termoestabilidade mais elevada e podem ter aplicações em processos industriais que requerem temperaturas elevadas. Os processos enzimáticos que determinam que as temperaturas mais elevadas têm níveis mais altos de reação (Iyer; Ananthanarayan, 2008).

A caracterização bioquímica das enzimas ganha destaque por fornecer dados para compreender a atuação e as alterações ocorridas, além de fornecer dados que devem ser considerados no momento da aplicação da enzima em um processo. Temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e com pH, e outros parâmetros são decisivos na hora do dimensionamento de um processo enzimático.

Efeito de surfactantes, íons metálicos e inibidores sobre atividade enzimática

Em geral, as substâncias testadas não exerceram muita influência sobre a atividade enzimática quando avaliadas na concentração de 1 mM, sendo mantida mais de 80 % da atividade em relação ao controle. No entanto, PMSF exerceu efeito inibidor sobre a atividade lipase, sendo observada apenas 22,7 % de atividade em relação ao controle na ausência desta substância, enquanto detergentes não iônicos como Tween 20 e Tween 80 exerceram um efeito ativador, mais de 103 % de atividade detectada. Na concentração de 5 mM, Triton X, Tween 20 e Tween 80 não influenciaram a atividade lipásica, sendo observada mais de 80 % da atividade do controle. O EDTA apresentou efeito inibidor pouco pronunciado, com atividade lipásica próximas a 70% da atividade do controle. Na presença de SDS, foi detectada um efeito inibidor, chegando a 47% da atividade controle. No caso de PMSF, uma inibição pronunciada foi observada, sendo detectada apenas 2,16 % de atividade, o que pode ser atribuído à desnaturação da enzima (Fig. 3).

O fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) é uma substância conhecida por inibir serino proteases em geral, sendo inicialmente reportada como inibidora de esterases (acetilcolinesterase), quimiotripsina e tripsina (Farney; Gold, 1963). No caso de serino proteases, a inibição é irreversível, pois a molécula se liga covalentemente à hidroxila do resíduo de serina do sítio ativo numa reação de sulfonilação, formando um derivado enzimático sulfonilado inativo (Powers et al., 2002). As lipases são conhecidas serino hidrolases, com uma tríade catalítica geralmente formada por serina, histidina e aspartato/glutamato, também encontrada em serino proteases (Ollis et al., 1992; Holmquist, 2000). Portanto, o fato de PMSF

inibir fortemente a atividade lipase de *Aspergillus terreus* URM 6614, indica que seu sítio ativo contém um resíduo de serina importante para a catálise.

A Figura 3, apresenta o efeito de íons metálicos sobre a atividade da lipase do extrato bruto. Na concentração de 1mM, a maioria dos íons avaliados pouco alteraram a atividade enzimática com atividades próximas a 90%. Na concentração de 5 mM, Na^+ , NH_4^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} e Pb^{2+} mantiveram a atividade enzimática em torno de 80% do controle, enquanto o íon Zn^{2+} inibiu fortemente a lipase, restando aproximadamente 21,2% de atividade, inclusive não sendo detectada atividade com Cu^{2+} .

Suzuki et al., (1986), em estudos com lipases de *Rhizopus javanicus* não observaram alterações na atividade lipolítica após a adição de 1mM de diversos íons metálicos, dentre eles o Ca^+ . A lipase de *P. aurantiogriseum* foi inibida pelo íon Zn^{2+} , bem como pelos íons Cu^{2+} e Ba^{2+} (Lima et al., 2004), resultados semelhantes aos do presente trabalho. A lipase de *Penicillium abeanum* foi inibida por 1 mM de todos os íons testados (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mo^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+}), com destaque para Hg^{2+} que inibiu 96 % da atividade enzimática (Sugihara et al., 1996).

Os solventes orgânicos são amplamente utilizados em reações com lipases, pois facilitam o manejo dos substratos hidrofóbicos geralmente utilizados e podem modular e aprimorar a atividade e a seletividade da enzima. O efeito de solventes orgânicos a 1mM e a 5 mM sobre a estabilidade da atividade lipásica está apresentado na Figura 3.

A lipase de *Aspergillus terreus* URM 6614 se apresentou estável na maioria dos solventes testados, sendo detectada mais de 70 % de atividade residual após incubação. Apesar deste efeito, a enzima se mostrou mais estável que outras reportadas na literatura, como, por exemplo, a lipase de *Aspergillus niger*, a qual apresentou nenhuma ou pouca atividade residual quando incubada por 1 h e a 28 °C nos solventes metanol, etanol, 1-propanol, acetona e n-butanol (Lima et al., 2004).

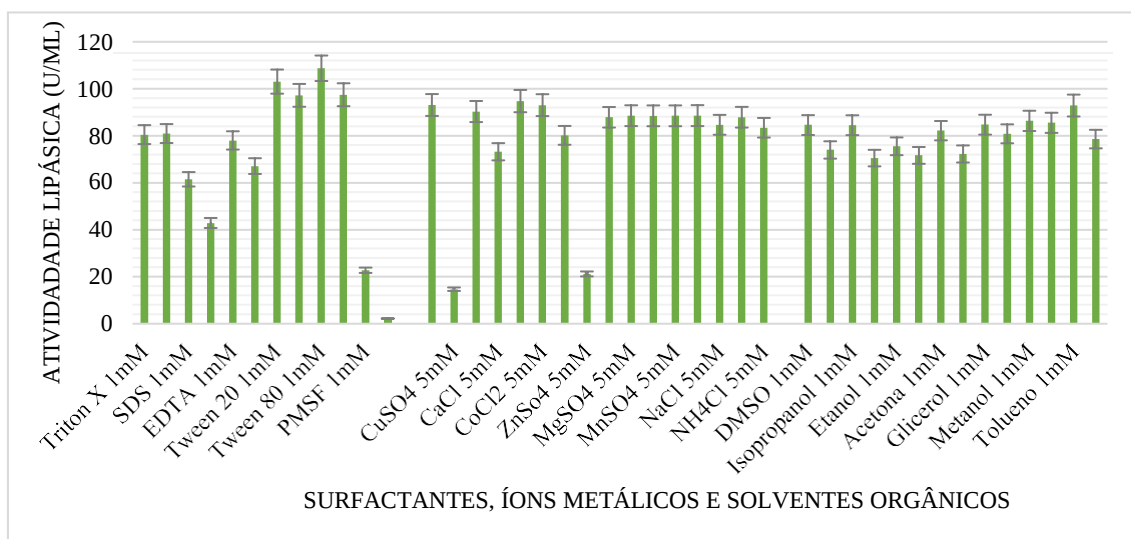


Figura 3. Efeito de surfactantes, íons metálicos e solventes orgânicos na atividade lipásica de *Aspergillus terreus* URM 6614.

Pré-tratamento da lipase produzida por *Aspergillus terreus* URM 6614

A purificação de diversas lipases é descrita na literatura que são geralmente utilizados para uma aplicação que exige um grau de pureza elevada, como na elaboração de química fina ou farmacológica, sendo alguns métodos como a ultrafiltração, precipitação e cromatografias de interação hidrofóbica, troca iônica e exclusão molecular (Sharma et al., 2001).

Diversas técnicas têm sido empregadas para a purificação de lipases, a precipitação de proteínas geralmente é usada como primeiro passo de purificação e neste caso o sulfato de amônio é o agente de precipitação mais utilizado. Outra técnica presente nos protocolos de purificação é a cromatografia (de troca iônica ou interação hidrofóbica). Esses métodos podem ser combinados para que se consiga enzimas com maior poder de catálise (Saxena et al., 2003; Gupta et al., 2004).

Os métodos de purificação de lipases são dependentes da cepa, dos meios e condições de cultura e das características da enzima. Como resultado desta diversidade, não há processos de purificação específicos. Assim sendo, enzimas produzidas por espécies diferentes do mesmo micro-organismo podem apresentar propriedades distintas (Gupta et al., 2004).

A definição das operações de um processo de purificação depende do uso alvo e também de suas características físico-químicas e do tipo de impurezas presentes no extrato enzimático, em muitos casos purificação parcial do extrato é suficiente (Gupta et al., 2004). No presente trabalho, as técnicas de precipitação com sulfato de amônio e a diálise foram investigadas,

visando uma estratégia de clareamento do extrato bruto, afim de diminuir os contaminantes presentes, para aplicação final da enzima no tratamento de efluente industrial.

Foram realizadas quatro faixas de precipitação da lipase com sulfato de amônio: de 0 a 20 %, 20 a 40 %, 40 a 60%, e de 60 a 80 %, sendo dosadas as atividades nos precipitados e no sobrenadante de 80 % de saturação, após 12 horas. Nesse caso, nenhum precipitado foi obtido nas duas primeiras faixas, sendo observado que 22,9 % da atividade foi recuperada no precipitado de 40 a 60 % de saturação e a maior parte da enzima precipitada, com 55,7 % foi obtido no precipitado de 60 a 80 %, sendo que 1,2 % da atividade permaneceu no sobrenadante de 80 % de saturação.

A técnica de precipitação das proteínas com sais é considerada uma ferramenta importante para concentração de proteínas. O processo de concentração promove a separação das proteínas da maioria dos demais compostos do meio, facilitando os processos subsequentes (Martins, 2001). A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas proteicas se agregam e precipita (Borzani et al., 2001). A faixa de concentração de 60-80% de saturação foi descrita como adequada para precipitação de enzimas produzidas com diferentes microrganismos e substratos (Sharma, et al., 2002; Kanwar, et al., 2006; Shu et al., 2006; Sun et al., 2008; Kiran et al., 2008). A precipitação com sulfato de amônio foi utilizada como etapa de pré-purificação de, pelo menos, 11 lipases de 11 fungos do gênero *Penicillium*, com faixa de precipitação variando de 50 a 85% (Li; Zong, 2010). Nos estudos de Carvalho et al., (2005) e Penha et al., (2016), utilizaram 80% de saturação de sulfato de amônio para a pré-purificação do extrato enzimático bruto de *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*, respectivamente, corroborando com o resultado deste trabalho.

A diálise foi realizada com a passagem de duas vezes o volume de extrato adicionado a célula, volume este descrito em outras pesquisas que relatam a pré-purificação de lipases microbianas (Baron et al., 2005), bem como em referência que descreve o uso e eficiência do procedimento de diafiltração (Zeman; Zydney, 1996; Wang, 2001). Nesta etapa buscou-se lavar e eliminar solutos indesejáveis da amostra de proteínas, com intuito de aumentar a atividade específica da enzima de interesse, em uma solução mais pura.

As atividades lipásica para o extrato bruto e extrato pré-tratado foram de 35,5 U/mL e 19,03 U/mL, respectivamente. Embora estes resultados sejam pouco comparáveis uma vez que as purezas das preparações enzimáticas são diferentes, isso sugere que a enzima em extrato bruto é mais ativa do que o extrato enzimático obtido após o pré-tratamento por precipitação com sulfato de amônio e diálise.

Os resultados do extrato dialisado, apresentados na Tabela 2, indicaram redução de 31,24% de atividade específica. Assim, verificou-se que o processo de diafiltração não resultou no aumento total da atividade da enzima, comportamento similar ao observado por Menoncin et al., (2010) onde a etapa de diálise não foi efetiva para aumento da atividade específica de lipase de *Penicillium verrucosum*.

Tabela 2 - Acompanhamento do comportamento do extrato enzimático durante as etapas de pré-tratamento.

Extratos	Atividade Lipásica	Conteúdo Proteico	Atividade Específica
	Total (U/mL)	(mg/mL)	(U/mg)
Bruto	35,05	3,80	9,22
Precipitado	18,5	2,60	7,11
Dialisado	19,03	3,00	6,34

A pré-purificação ou purificação de enzimas, assim como no caso de outros bioprodutos, deve sempre visar o máximo rendimento, resultando em um produto relativamente puro com custos mínimos. Em geral, deve-se sempre considerar as características da molécula alvo presente no extrato e as características finais almejadas. Estas duas informações são fundamentais na escolha das técnicas, limitações das operações e condições usadas (Berg et al., 2010).

O objetivo geral das etapas de purificação é que a pureza ou atividade da proteína alvo por unidade de massa seja aumentada com a eliminação de proteínas indesejáveis ou inativas (Pinotti, 2003). Harrison et al., (2011) salientam ainda que as abordagens utilizadas em todas as etapas de purificação devem ser implementadas com o futuro aumento de escala em mente; considerando sempre os padrões de qualidade exigidos, rendimento e custos envolvidos.

Com isso, de acordo com os dados obtidos, a etapa de aplicação da enzima, foi realizada tanto com o extrato bruto quanto com o extrato pré-tratado, afim de verificar o desempenho da enzima mediante a essas duas condições.

Aplicação do extrato bruto e pré-tratado na hidrólise de efluente de laticínios

Com base nos resultados obtidos, foi proposto um estudo detalhado do efeito das principais variáveis do processo, tais como: temperatura, rotação, ajuste do pH do meio reacional e concentração da enzima, realizado tanto com o extrato bruto quanto com o extrato pré-tratado, nos tempos de 16, 20 e 24 horas de reação (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado do planejamento fatorial Plackett-Burman (PB) 2⁴ da atividade lipásica do extrato bruto e pré-tratado no tratamento de efluente de laticínios.

Ensaio	Atividade Lipásica no Efluente (U/mL)					
	<i>Extrato bruto</i>			<i>Extrato pré-tratado</i>		
	16h	20h	24h	16h	20h	24h
1	1,34	2,79	0,90	1,06	0	0
2	5,62	6,46	3,81	1,36	1,06	0
3	7,04	8,72	5,34	1,64	0,28	0
4	1,59	2,10	0,70	0,39	0	0
5	4,22	5,45	2,83	1,24	0,22	0
6	1,30	2,33	0,87	0,72	0	0
7	4,27	5,17	1,56	1,32	0,55	0
8	8,07	9,57	6,78	3,32	1,55	0
9	10,76	13,98	7,44	4,41	3,40	1,57
10	10,40	13,78	7,19	3,96	2,83	1,35
11	10,33	13,75	7,18	3,90	2,76	1,30
12	10,21	13,90	7,19	3,95	2,68	1,33

Os resultados mostram que as melhores condições de hidrólise do efluente foram obtidos com 20 horas de reação, com o extrato bruto e com 16 horas de reação com o extrato pré-tratado, nos pontos centrais, a 35 °C, com 2,5% (p / v) de extrato enzimático, pH 8,5 e com 100 rpm de agitação. Contudo, foi com o extrato bruto que a hidrólise do efluente teve uma maior atividade. Levando em consideração o custo previsto com uma possível aplicação em larga escala, foi escolhida como melhor atividade para aplicação o tempo de 16 h, para as próximas etapas da otimização da aplicação em efluente de laticínio.

O objetivo deste conjunto de testes foi determinar a melhor combinação das variáveis para a obtenção máxima de ácidos graxos livres (AGL). Um planejamento fatorial fracionário é utilizado para melhor entendimento da influência individual dessas variáveis e de suas interações na porcentagem de hidrólise enzimática do efluente.

Pelo Gráfico de Pareto (Fig. 4) é possível avaliar os principais efeitos e interações das variáveis estudadas na atividade lipásica do extrato bruto. Observou-se que, com 95% de confiança, em 16 horas as variáveis concentração da enzima, agitação e suas respectivas interações com a temperatura foram significativas positivas bem como o pH. A temperatura e

sua interação com o pH apresentaram efeito significativo negativo sobre a atividade de hidrólise do efluente.

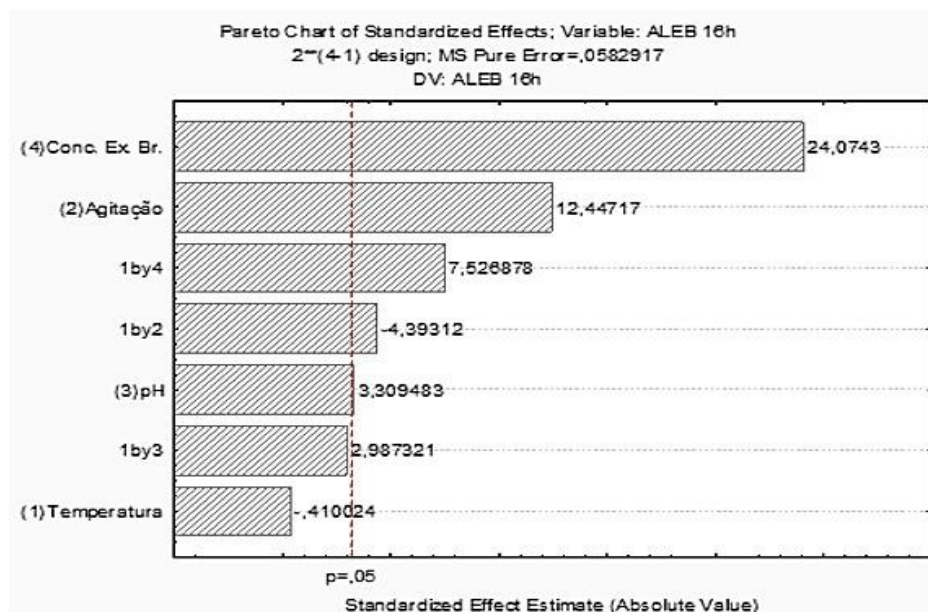


Figura 4. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das principais variáveis na aplicação do extrato enzimático no tratamento do efluente de laticínios baseados nos resultados experimentais do planejamento fatorial Plackett-Burman (PB).

Os resultados do Planejamento Fatorial Standard Designs (Box, Hunter, & Hunter), que faz combinações da maior e menor variável, revelaram que as concentrações de enzima, agitação e pH são as variáveis mais relevantes para um direcionamento para a otimização dessa aplicação. Com isso, foi realizado um segundo planejamento do tipo Box-Behnken Designs, com apenas três variáveis (Tab. 4).

Tabela 4 – Resultado da atividade enzimática com os níveis das variáveis do Planejamento Fatorial Box-Behnken Designs para a aplicação de lipases por *Aspergillus terreus* URM 6614 com o extrato bruto e pré-tratado, durante 16 horas a 35 °C.

Ensaio	Agitação (rpm)	pH	E (% m/v)*	Atividade lipásica (U/mL)	
				Extrato bruto	Extrato Pré-tratado
1	100 (-1)	8,5 (-1)	5 (0)	12,66	5,23
2	300 (+1)	8,5 (-1)	5 (0)	10,43	3,08
3	100 (-1)	10,5 (+1)	5 (0)	12,30	5,20
4	300 (+1)	10,5 (+1)	5 (0)	9,16	1,40
5	100 (-1)	9,5 (0)	2,5 (-1)	16,26	7,99
6	300 (+1)	9,5 (0)	2,5 (-1)	14,81	7,44
7	100 (-1)	9,5 (0)	7,5 (+1)	7,87	1,35
8	300 (+1)	9,5 (0)	7,5 (+1)	7,53	1,24

Continuação...

Continuação...					
9	250 (0)	8,5 (-1)	2,5 (-1)	9,71	2,20
10	250 (0)	10,5 (+1)	2,5 (-1)	9,40	2,09
11	250 (0)	8,5 (-1)	7,5 (+1)	7,60	1,22
12	250 (0)	10,5 (+1)	7,5 (+1)	7,28	1,12
13	250 (0)	9,5 (0)	5 (0)	13,13	6,44
14	250 (0)	9,5 (0)	5 (0)	13,28	6,57
15	250 (0)	9,5 (0)	5 (0)	13,26	6,54

*Quantidade de extrato bruto e pré-tratado

De acordo com os resultados obtidos, a atividade de hidrólise de lipídeos mais elevada foi obtida no ensaio 5, utilizando tanto o extrato bruto como o extrato pré-tratado, nas seguintes condições experimentais: 2,5 % (p/v) de extrato enzimático, pH 9,5, com 100 rpm de agitação, durante 16 horas a 35 °C.

A análise de variância indicou que o modelo estabelecido foi significativo ($P = 0,28$). Na maioria dos estudos a análise ANOVA geralmente mostra um resultado significativo originando um modelo experimental quadrático (Gopinath et al., 2003; Salihu et al., 2012). A análise ANOVA para a produção da lipase neste estudo, mostrou que só o modelo matemático linear foi significativo, obtendo uma equação polinomial de primeira ordem (Tab. 5).

Tabela 5. Análise de variância da ANOVA da aplicação do extrato enzimático bruto e pré-tratado em efluente de laticínios.

ANOVA										
Fator	Extrato Bruto (U/mL)					Extrato Pré-tratado (U/mL)				
	SS	df	MS	F	P	SS	df	MS	F	P
(1)Agit (L)*	6,4082	1	6,40820	1117,709	0,000893	5,46151	1	5,46151	1231,920	0,000811
(2)pH (L)	0,6385	1	0,63845	111,358	0,008861	0,45601	1	0,45601	102,860	0,009582
(3)Ext (L)**	49,5012	1	49,50125	8633,939	0,000116	27,30605	1	27,3060	6159,259	0,000162
1L by 2L	0,2162	1	0,21623	37,714	0,025506	0,67240	1	0,67240	151,669	0,006529
1L by 3L	0,3192	1	0,31922	55,679	0,017490	0,04623	1	0,04623	10,427	0,084000
2L by 3L	0,0000	1	0,00002	0,004	0,953358	0,00003	1	0,00003	0,006	0,946975
Lack of Fit	59,4383	6	9,90639	1727,858	0,000579	60,78566	6	10,1309	2285,176	0,000437
Pure Error	0,0115	2	0,00573			0,00887	2	0,00443		
Total SS	116,5332	14				94,73676	14			

* Agitação

** Concentração de extrato bruto e pré-tratado

O gráfico de Pareto apresenta de forma rápida e clara estes fatores estatisticamente importantes (Fig. 5). Observa-se que as variáveis concentração do extrato, agitação e pH, bem como a interação entre agitação/pH, apresentam um efeito significativo negativo, tanto para o extrato bruto quanto para o pré-tratado, já a interação agitação/concentração do extrato,

apresenta um efeito significativo positivo utilizando extrato bruto, e não significativo para o extrato pré-tratado. No entanto, a interação das variáveis pH/ concentração de extrato não foi significativo tanto para aplicação com o extrato bruto quanto para o pré-tratado.

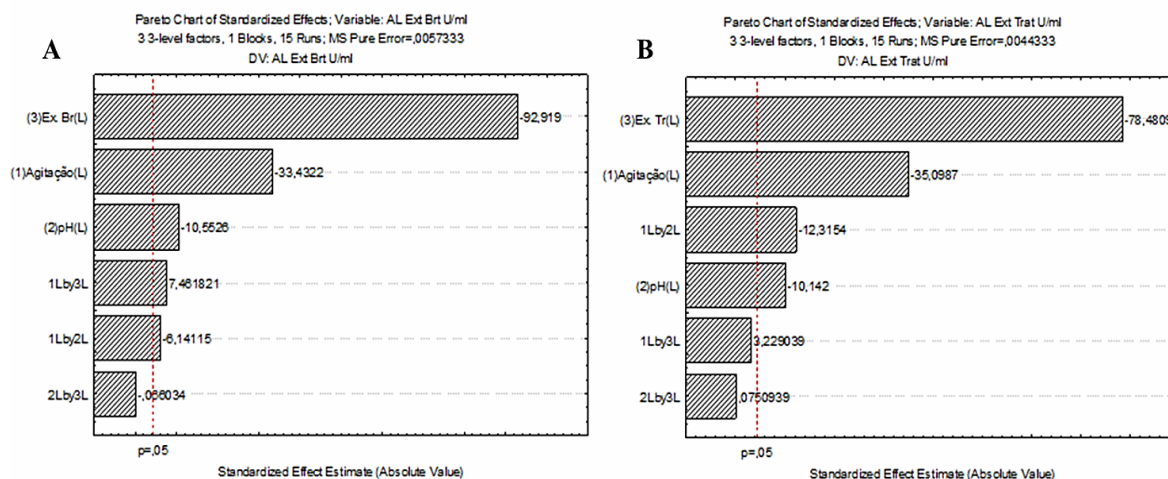


Figura 5. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das principais variáveis na aplicação do extrato enzimático em efluente de laticínios baseados nos resultados experimentais do planejamento fatorial Box-Behnken Designs. Resultado do Pareto utilizando o extrato bruto (A) e pré-tratado (B).

Durante todas as análises foi observado um padrão similar dos efeitos das variáveis na atuação da lipase, mesmo em extratos diferentes. Isso demonstra que a enzima possui características particulares, independentemente de ser aplicada em sua forma mais bruta, com o extrato bruto, ou em um extrato clarificado, no caso, o extrato resultante de um pré-tratamento. Portanto, em caso de uma aplicação em escala industrial, a ausência de uma etapa de pré-purificação minimizará os custos finais do tratamento do efluente.

Empregando a Superfície de Resposta buscou-se analisar as condições mais adequadas que maximizam a aplicação no tratamento do efluente, de acordo com a interação das variáveis (Fig. 6 e Fig. 7).

A Figura 6, apresenta os gráficos de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais: pH e agitação, concentração do extrato bruto e agitação, concentração do extrato bruto e pH. Pode-se verificar que as melhores condições para a aplicação das lipases produzidas por *Aspergillus terreus* URM 6614 em efluente de laticínios, apresentaram-se durante a relação entre o pH e agitação, que interagiram de forma positiva e a concentração do extrato bruto com a agitação, que interagiram de forma negativa. Já na Figura 7, podemos observar a interação entre as variáveis pH e agitação em função da atividade lipolítica, demonstrando que quanto maior o pH e menor a agitação do meio, maior será a atividade lipásica. Com isso, observa-se que as melhores condições para a aplicação das lipases no

tratamento do efluente apresentam-se quando há um aumento do pH e uma diminuição da concentração do extrato bruto e agitação.

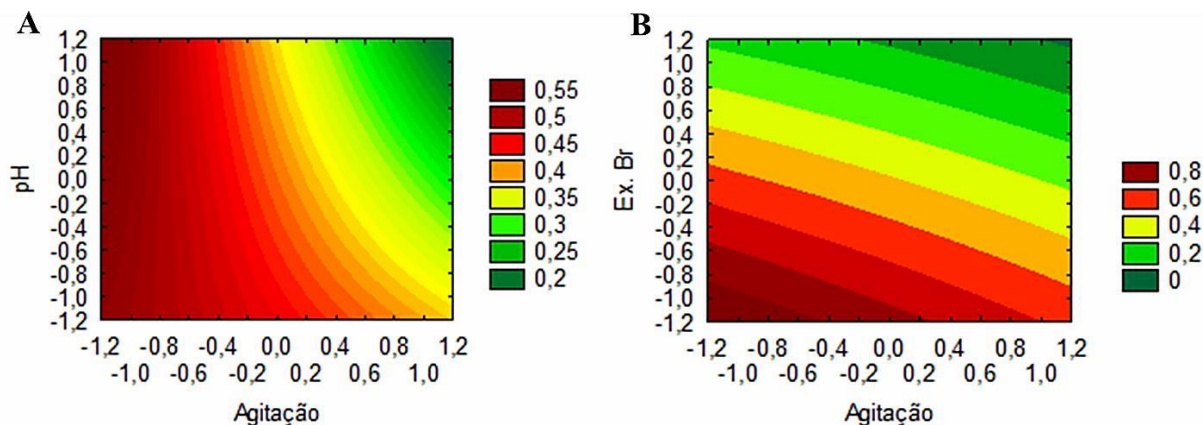


Figura 6. Gráficos de superfície de contorno mostrando as variáveis significativas para a aplicação da lipase produzida por *A. terreus* URM 6614. (A) pH e agitação e (B) concentração do extrato bruto e agitação.

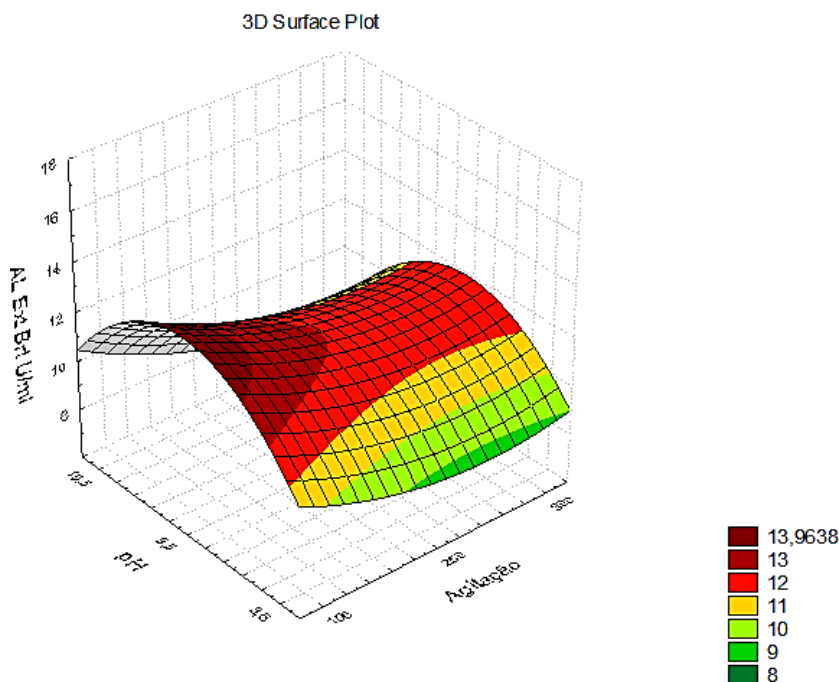


Figura 7. Gráficos de projeção da superfície de resposta da atividade lipásica (AL) em função dos fatores experimentais, pH e agitação, na aplicação da lipase contida no extrato bruto produzida por *A. terreus* URM 6614.

A matriz de resultados do delineamento experimental foi analisada estatisticamente em termos de AGL produzido na reação da biodigestão do efluente pela aplicação do extrato enzimático bruto. A melhor condição de hidrólise ocorreu com 2,5 % (p/v) de extrato enzimático, pH 9,5, com 100 rpm de agitação, durante 16 horas a 35 °C. Cammarota et al.,

(2006) estudaram o efeito da concentração de lipase SEP na hidrólise de efluente de laticínios e mostraram que a condição que produziu a maior conversão em AGL foi de 1,0% (p / v) durante 24 h, 35 ° C e 120 rpm. Jung et al., (2002) encontraram resultados semelhantes para hidrólise de efluente de laticínios usando lipase SEP a 30 °C, 3,2% (p / v) por 8 h. Leal et al., (2002) encontraram as melhores conversões a 45 °C após 24 h, utilizando lipase de *Penicillium restrictum* para a hidrólise de águas residuárias de laticínios, embora a condição selecionada para hidrólise fosse de 35 °C durante 12 h por razões de viabilidade econômica, corroborando com o resultado desse trabalho. Esse comportamento demonstra a eficiência da aplicação de lipases no pré-tratamento de águas residuárias contendo elevado teor de lipídeos trazendo vantagem com relação ao custo final do processo, uma vez que é uma preparação enzimática não purificada, produzida com resíduos da indústria pesqueira.

Conclusões

A lipase produzida por *Aspergillus terreus* URM 6614 por fermentação submersa utilizando como substrato Hidrolisado Proteico de Peixe (HPP) Tilápia, produto do aproveitamento de resíduos pesqueiro, demonstrou ser estável em uma ampla faixa de pH, íons metálicos, solventes orgânicos e na maioria dos inibidores, sendo desnaturada na presença do surfactante PMSF. Águas residuárias de indústrias de laticínios contendo elevado teor de lipídeos, podem ter a sua carga poluidora reduzida pelo tratamento prévio com lipases. Neste trabalho, o tratamento enzimático do efluente com a aplicação do extrato enzimático bruto e pré-tratado, foi otimizado para um tempo de 16h, possibilitando a degradação da matéria orgânica. A metodologia proposta mostrou ser tecnicamente e economicamente viável para a biodegradação de lipídeos presentes em efluentes com elevado teor de lipídeos, uma vez que foram obtidos resultados satisfatórios com o extrato enzimático bruto, contribuindo para aumentar a eficiência da biodigestão da matéria orgânica, possibilitando experimentações para aplicação em larga escala.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, a Micoteca URM do Departamento de Micologia e ao Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, a Indústria Bom Leite, bem como aos colegas envolvidos nessa pesquisa.

6 CONCLUSÕES

Espécies de *Aspergillus* pertencentes à seção *Terrei* apresentam alta similaridade morfológica, sendo necessária para a sua taxonomia uma abordagem polifásica. A amplificação da região ITS do rDNA, bem como a amplificação parcial do gene para a B-tubulina, são importantes ferramentas para compor uma abordagem polifásica no processo de identificação.

Todas as linhagens das espécies de *Aspergillus* testadas neste trabalho, apresentaram potencial biotecnológico para a produção de lipases através da FS, utilizando, como fonte de carbono, resíduos pesqueiros, como o hidrolisado proteico de peixe (HPP) e óleo de peixe, gerados do aproveitamento dos restos do processo de filetagem industrial de Tilápia. A produção de lipases variou de acordo com o micro-organismo e com o substrato avaliados, sendo o substrato um importante estimulante para que o micro-organismo produza a enzima.

O HPP Tilápia está sendo relatado pela primeira vez como substrato eficaz para produção de lipase, apresentando-se como melhor substrato em relação aos demais testados neste trabalho. Os substratos óleo de peixe e hidrolisado de camarão também estimularam a produção de lipases pelas linhagens avaliadas, porém em concentrações mais baixas do que no caso do HPP. O isolado que se destacou com a maior atividade lipásica foi *Aspergillus terreus* URM 6614, sendo então escolhido para a otimização do processo de produção lipásica.

As melhores condições para a produção da enzima foram: concentração do HPP (10% v/v), extrato de levedura (0,2% p/v), tempo de fermentação (120 h), rotação (150 rpm), pH 7,5 a 30 °C, com atividade lipásica de 35,04 U/mL. Os resíduos pesqueiros gerados por indústrias de filetagem de Tilápia, podem ser uma matéria-prima importante para produção de lipases através de FS, visando aumentar a produção, e reduzir os custos de todo o processo.

A lipase produzida por *Aspergillus terreus* URM 6614, foi eficiente quando aplicada na biodigestão de efluente de laticínio, mesmo na forma de extrato enzimático bruto, permitindo a redução de custos com a ausência de etapas de purificação da enzima. Essa enzima pode ser empregada para o tratamento de efluentes ricos em gorduras, podendo aumentar significativamente a eficiência deste processo, reduzindo os impactos ambientais gerados sobre os recursos hídricos.

REFERÊNCIAS

- AÇIKEL, U.; ER AN, M.; AÇIKEL, Y. S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food and Bioproducts Process**, v.8, p. 31-39. 2010.
- AKANBI, T. O.; ADCOCK, J. L.; BARROW, C. J. Selective concentration of EPA and DHA using *Thermomyces lanuginosus* lipase is due to fatty acid selectivity and not regioselectivity. **Food Chemistry**, v. 138, n.1, p. 615-620, 2013.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley, 1996.
- ALMEIDA, Z. S; PINHEIRO, A.L.R. **Recursos pesqueiros da costa maranhense: bioecologia, pesca e biomonitoramento/** Zafira da Silva de Almeida; Andreia de Lourdes Ribeiro Pinheiro (Org.) – São Luis: Editora UEMA, 2013.
- ALMEIDA, M.C. Indução de celulases e xilanases por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos. **Dissertação**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- ALONSO, F. O. M. Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). **Dissertação**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.
- ALOULOU, A.; GONZÁLEZ, J. A. R.; FERNANDES, S.; OOSTERHOUT, D. V.; PUCCINELLI, D.; Carrière, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1761, p. 995- 1013, 2006.
- ALVES, M. M.; VIEIRA, J. A. M.; PEREIRA, R. M. A.; PEREIRA, M. A.; MOTA, M. Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part I: Biofilm growth and activity. **Water Research**, v. 35, p. 241-255, 2013.
- ANOBOM, C. D.; PINHEIRO, A. S.; DE-ANDRADE, R. A.; ERIKA, C. G.; ANDRADE, A. G. C.; MOURA, M. V.; ALMEIDA, R. V.; FREIRE, D. M. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. **BioMed Research International**, v. 11, 2014.
- ARRUDA, L. F. Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. **Dissertação**. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- ARRUDA, L. F.; BORGHESI, R.; BRUM, A.; REGITANO D'ARCE, M.; OETTERER, M. Nutritional aspects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) silage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 749-756, 2006.
- AWAN, A. A.; IGBAL, A.; JAYED, M.; IDRIS, G. Response of olive hard wood cuttings to different growth media and basal injuries for propagation. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 2, n.12, p. 883-886, 2003.

AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT'ANNA JR, G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 361-365, 2007.

BAKIR, Z. B.; METIN, K. Purification and Characterization of an Alkali-Thermostable Lipase from Thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1087–1097, 2016.

BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M.; BAIGORI, M.; MICHELL, D. A.; KRIEGER, N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 34, p. 25-32, 2005.

BARROS, M.; FLEURI, L.F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal Chemistry Enginier**, v. 27, p.15-29, 2010.

BASHEER, S. M.; CHELLAPPAN, S.; BEENA, P. S.; SUKUMARAN, R. K.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**, v. 28, p. 627-638. 2011.

BENNETT, J.W. **Aspergillus molecular biology and genomics**. Capítulo 1: An Overview of the Genus *Aspergillus*. Japão. 2010.

Benjamin, S.; Pandey, A. 2001. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation, Brazilian Archives of Biology and Technology, 44 (2): 213–221.

BENSALAH, W.; FEKI, M.; WERY, M.; AYEDI, H.F. Thick and Dense Anodic Oxide Layers Formed on Aluminum in Sulphuric Acid Bath. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 113-118, 2010.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 7ed. New York: W. H. Freeman, p.1120, 2010.

BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 1, p. 13-22, 2001.

BERKA, R. M.; Dunn-Coleman, N.; Ward, M. Industrial enzymes from *Aspergillus species*. **Biotechnology**, v. 23, p. 155-202, 1992.

BEZERRA, R. S.; SANTOS, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C.B.B.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR., L. B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 199-210, 2001.

BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; SÁ, M. H. B.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-VEVY, C. M.; COURI, S. (org). **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. Rio de Janeiro, Interciência, 2008.

BOOMINATHAN, R.; MISHRA, P.; CHAND, S. **Bioseparation**, v. 5, p. 235-239, 1995.

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. Processos Fermentativos e Enzimáticos - **Biotecnologia industrial**, 1ª edição. Editora Edgard Blucher, v. 3, p. 377-378, 2001.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C; BALANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 98-101, 2007.

BRAGA, E. A. S. Caracterização das águas de lavagem provenientes da etapa de purificação da produção de biodiesel de óleo de Tilápia. **Tese**. Universidade Federal do Ceará. p.129, 2012.

BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 2, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura** – 2010. Brasília, DF, 2012.

BRESCIANI, F. R. Otimização da produção de lipases por *Luteibacter* sp. e caracterização do potencial biotecnológico. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

BRZOZOWSKI, A. M.; SAVAGE, H.; VERMA, C. S.; TURKENBURG, J. P.; DAVID M. LAWSON, D. M. L.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces* (humicola) *lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, v. 39, n. 49, p.15071-15082, 2000.

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

CAI, Y; WANG, L.; LIAO, X.; DING; Y; SUN, J. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 786–790, 2009.

CALLERI, E.; TEMPORINI, C.; FURLANETTO, S.; LOIODICE, F.; FRACCHIOLLA, G.; MASSOLINI, G. Lipases for biocatalysis: development of a chromatographic bioreactor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 715-724, 2003.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, n.17, p. 2195-2210, 2006.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, p. 75-80, 2003.

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

CARVALHO, L. C. *Aspergillus e Aspergilose*. **Dissertação**. Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal, 2013.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA JR, G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239-247, 2000.

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

CAVALCANTI, M.A.; SOUZA-MOTTA, C.M.; NOGUEIRA, E.B.S. **Catálogo da coleção de culturas da Micoteca URM**. Recife, Editora Universitária, p.109, 1996.

CAVALCANTI JUNIOR, V.; ANDRADE, L. N.; BEZERRA, L. N.; GURJÃO, L. M.; FARIAS, W. R. L. Reuso de água em um sistema integrado com peixes, sedimentação, ostras e macroalgas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, p. 118-122, 2005.

CAVALHEIRO, J. M. O.; SOUZA, E. O.; BORA, P. S. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) feed. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 602-606, 2007.

CHEN, B.; HU, J.; MILLER, E. M.; XIE, W.; CAI, M.; GROSS, R. A. *Candida antarctica* Lipase B Chemically Immobilized on Epoxy-Activated Micro- and Nanobeads: Catalysts for Polyester Synthesis. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 463–471, 2008.

CHERUKUVADA, S. L.; SESHASAYEE, A. S. N.; RAGHUNATHAN, K.; ANISHETTY, S.; PENNATHUR, G. Evidence of a Double-Lid Movement in *Pseudomonas aeruginosa* Lipase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. **PLoS Comput Biology**, v.1, n. 3, p. 1-28, 2005.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**, v. 23, p. 60–67, 2006.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 193–197, 2004.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase – producing fungi from brasilian savana soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 881–885, 2006.

COLLA, M. L.; REINEHR, C. O.; ALBERTO, V. J. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

CONTESINI, F. J.; SILVA, V. C. F.; MACIEL, R. F.; LIMA, R. J.; BARROS, F. F. C.; CARVALHO, P. O. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **The Journal of Microbiology**, v. 47, p. 563-571, 2009.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163–171, 2010.

COSTA, J. A. V.; COLLA, E.; MAGAGNIN, G. SANTOS, L.; BERTOLIN, T. Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using Solid-state Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 5, p. 759-766, 2008.

DALMAU, E.; MONTESINOSA, J. L.; LOTTIB, M.; CASASA, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657–663, 2000.

DAMASO, M.C.T.; COURI, S.; PASSIANOTO, M.A.; FREITAS, S.C. Produção de lipases por fermentação semi-sólida tendo como indutores da síntese, subprodutos do refino do óleo de milho. In: **XV Simpósio Nacional De Fermentações**, Recife, 2005.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; Cour, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 4, p. 676-681, 2008.

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

D'ANNIBALE, A.; SERMANI, G.G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2006.

DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; MOMENBEIK, F. Effect of Plant Oils upon Lipase and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-7, 2009.

DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042–1050, 2006.

DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; FLORIO, A. R.; POSTERARO, P.; PERLIN, D. S.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2479 -2483, 2012.

DE FELICE, B.; PONTECORVO, G.; CARFAGNA, M. Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. **Acta Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 231-239, 1997.

DESNUELLE, P.; SARDA, L.; AILHAUD, G. Inhibition de la lipase pancreatique par la diethyl-p-nitrophenyl en emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 37, p. 570-571, 1960.

DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1042-1050, 2006.

DIMITRIJEVIC', A.; VELICKOVIC', D.; BIHELOVIC', F.; BEZBRADICA, D.; JANKOV, R.; MILOSAVIC', N. One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 358-362, 2012.

DUEHOLM, T. E.; ANDREASEN, K. H.; NIELSEN, P. H. Transformation of lipids in activated sludge. **Water Science Technology**, v. 43, n. 1, p. 165-172, 2012.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rizopus arhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325-329, 2000.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMADRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 525-528, 2004.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Ed. EDUCS, Caxias do Sul, RS. 2010.

EMTENANI, S.; ASOODEH, A.; EMTENANIA, S. Molecular cloning of a thermo-alkaliphilic lipase from *Bacillus subtilis* DR8806: expression and biochemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1679-1685, 2013.

EVANS, D. R. H.; ROMERO, J. K.; WESTOBY, M. Concentration of Proteins and Removal of Solutes. In: RICHARD, R. B. e MURRAY, P. D. **Methods in Enzymology: Academic Press**, v. 463, p. 97-120, 2009.

FALONY, G.; MENDONZA, J. C. D.; ARMAS, J. C. Obtention of *A. niger* lipases by solid state fermentation. In: **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, 2005.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Production of *Aspergillus niger* lipase. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 235-240, 2006.

FARIA, L. A. Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido. **Dissertação**. Faculdade de Farmácia, 2010.

FARIAS, C. M.; SOUZA, O. C.; SOUSA, M. A.; CRUZ, R.; MAGALHÃES, O. M. C.; MEDEIROS, E. V.; MOREIRA, K. A.; SOUZA-MOTTA, C. M. High-level lipase production by *Aspergillus candidus* URM 5611 under solid state fermentation (SSF) using waste from

Siagrus coronata (Martius) Becari. **African Journal and Biotechnology**, v. 14, n. 9, p.820-828, 2015.

FARNEY, D. E.; GOLD, A. M. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. Rates of reactions with acetylcholinesterase, alpha-chymotripsin and trypsin. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 85, p. 997-1000, 1963.

FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R. **Óleo e biodiesel de tilápia**. In: Boscolo W. R.; Feiden, A. (Ed.). Industrialização de tilápias Toledo: GFM Gráfica & Editora, p. 151-164, 2007.

FEITOSA, I. G. Produção de enzima lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. **Dissertação**. Universidade Tiradentes, p. 102, 2009.

FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, p. 200- 208, 2003.

FELTES, M.; CORREIA, J. F.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternatives for adding value for the fish processing wastes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FELTES, M. M. C.; PITOL, L. O.; CORREIA, J. F. G.; GRIMALDI, R.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L. Incorporation of médium chain fatty acids into fish oil triglycerides by Chemical and enzymatic interesterification. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 2, p. 168-176, 2009.

FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. **Dissertação**. Universidade Federal do Paraná, 2007.

FERRER, M.; FRANCISCO, J; PLOU, F. J.; OSCAR, M; NUERO, O. M.; FUENSANTA R. F.; BALLESTEROS A. A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, p. 569-576, 2000.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FICKERS, P.; NICAUD, J. M. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* lipases: An overview. **Microbiology Monographs**, v. 25, p. 121- 136, 2013.

FREIRE, D. M.; GOMES, P. M.; BONETAL, E.P.S. 1997. Lipase production by a new promissing strain *Penicillium restrictum*, **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 6–12.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture. **Opportunities and challenges**, Rome, 2014.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent médium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 419-429, 2010.

FU, D.; YU, M.; TAN, T.; ZHOU, X. Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from *Candida* sp., **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 2-3, p. 115–121, 2009.

GHASEMI, M.; FARAHBAKHS, A.; FARAHBAKHS, A.; SAFARI, A. A. Using submerge fermentation method to production of extracellular lipase by *Aspergillus niger*. **International Scholarly and Scientific Research & Innovation**, v. 8, n. 9, p. 945-948, 2014.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 59, n. 1-10, p. 2007.

GEISER, D. M. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. **Medical Mycology**, v. 47, p. 21–26, 2009.

GONÇALVES, F. A. G. Produção de lipases extracelular por leveduras em cultivo submerso. **Dissertação**. Universidade Federal de Minas Gerais, 67p., 2007.

GOPINATH, S. C. B.; HILDA, A.; PRIYA, T.L.; ANNADURAI, G.; ANBU, P. 2003. Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 681–689.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed Research International**, p.1-10, 2013.

GOTO, H.; SHIONOYA, N.; SUGIE, M.; TOMINAGA, M.; SHIMELIS, O.; TANIGUCHI, M.; IGARASHI, T.; HIRATA, Y. 2012. Novel pre-fractionation method of trans fatty acids by gas chromatography with silver-ion cartridge column. **Journal of Oleo Science**, v. 61, n. 2, p. 49-56.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Enzymatic aminolysis and ammonolysis processes in the preparation of chiral nitrogenated compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 1125–1143, 2006.

GRBAVČIĆ, S.; BEZBRADICA, D.; IZRAEL-ŽIVKOVIĆ, L.; AVRAMOVIĆ, N.; MILOSAVIĆ, N.; KARADŽIĆ, I.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11226–11233, 2011.

GROSSO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PIRES-CABRAL, P. Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 475-480, 2013.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORJE, J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by

Aspergillus ochraceus with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 52-57, 2007.

GUPTA, N.; MEHRA, G.; GUPTA, R. A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 361-368, 2004.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763- 781, 2004.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*, v. 57, p. 40-54, 2015.

HANEFELD, U.; CAO, L.; MAGNER, E. Enzyme immobilisation: fundamentals and application. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6211–6212, 2013.

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

HAAS, M. J.; CICHOWICZ, D. J.; BAILEY, D. G. **Lipids**, v. 27, p. 571–576, 1992.

HAMDY, H. S.; ABO-TAHON, M. A. Extracellular lipase of *Aspergillus terreus* var. *africanus* (CBS 130.55): production, purification and characterization. **Annals of Microbiology**, v. 62, p. 1723–1736, 2012.

HARRISON, R. G.; TODD, P. W.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. P. *Bioseparations Science and Engineering*. Oxford: **Oxford University Press**, p.547, 2003.

HARTMANN, M.; JUNG, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 844- 857, 2010.

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; JAVED, S.; HAMEED, A. Enzymes used in detergents: lipases. **African in Journal Biotechnology**, v. 9, p. 4836-4844, 2010.

HAWKES, F. R.; DONNELLY, T.; ANDERSON, G. K. Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 525-533, 1995.

HAWKSWORTH, D.L. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. **Medical Mycology**, v. 49, p. 70-76, 2011.

HAWKSWORTH, D. L.; CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A.; REYNOLDS, D. R.; SAMSON, R. A.; SEIFERT, K. A.; TAYLOR, J. W.; WINGFIELD, M. J. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. **IMA Fungus**, v. 2, n. 105, p. 112, 2011.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HENZE, M. 2012. Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes. **Water Science Technology**, v. 25, n. 6, p. 1-15.

HILLIS, D.M.; BULL, J.J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, v. 42, p. 182–192, 1993.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; DRUET, D. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 25, p. 80-87, 1999.

HOLMQUIST, M. Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: structures, functions and mechanisms. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, n. 2, p. 209-235, 2000.

HONG, S. B.; GO, S. J.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1316-1329, 2005.

HOLWERDA, K.; VERDAKE, P. E.; DE WILLIGEN, A. H. A. Vergleichende untersuchungen über die versey fugs geschwindigkeit it einiger einsäuriger trigliceryde unter einfluss von pankreasextrakt. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 55, p. 43-57, 1936.

HUGHES, S. R.; MOSER, B. R.; ROBINSON, S.; COXA, E. J.; HARMSSEN, A. J.; FRIESEN, J. A.; BISCHOFF, K. M.; JONES, M. A.; PINKELMAN, R.; BANG, S. S.; TASAKI, K.; DOLL, K. M.; QURESHI, N.; LIU, S.; SAHA, B. C.; JACKSON, J. S.; COTTA, M. C.; RICH, J. O.; CAIMI, P. Synthetic resin-bound truncated *Candida antarctica* lipase B for production of fatty acid alkyl esters by transesterification of corn and soybean oils with ethanol or butanol. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 69 -77, 2012.

HWU, C.S.; VAN BEEK, B.; VAN LIER, J.B.; LETTINGA, G. Thermophilic high-hate anaerobic treatment of water containing long-chain fatty acids: Effect of washed out biomass recirculation. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 447-451, 2008.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; JABEEN, R.; HAQ, I. U. Purification and characterization of extracellular lipases. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 3, p. 1541–1545, 2011.

IYER P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019–1032, 2008.

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

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

JUNG, F. B.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 21, p. 1797-1802, 2002.

JUNIOR, I. I.; FLORESA, M. C.; SUTILI, F. K.; LEITE, S. G. F.; MIRANDA, L. S. M.; LEAL, I. C. R.; SOUZA, R. O. M. A. Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglycerol production under batch and continuous flow conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 53-58, 2012.

JUNTACHAI, W.; OURA, T.; KAJIWARA, S. Purification and characterization of a secretory lipolytic enzyme, MgLIP2, from *Malassezia globosa*. **Microbiology**, v. 157, p. 3492–3499, 2011.

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

KAMIYA, N.; KASAGI, H.; INOUE, M.; KUSUNOKI, K.; GOTO, M. Enantioselective recognition mechanism of secondary alcohol by surfactant-coated lipases in nonaqueous media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, p. 227-232, 1999.

KANWAR, S. S.; GHAZI, I. A.; CHIMNI, S. S.; JOSHI, G. K.; RAO, G. V.; KAUSHAL, R. K.; GUPTA, R.; PUNJ, V. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC- 6375 isolate. **Protein Expression & Purification**, v. 46, p. 421- 428, 2006.

KAR, T.; DESTAIN, J.; THONART, P.; DELVIGNE, F. Physical and physiological impacts of different foam control strategies during a process involving hydrophobic substrate for the lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 483–492, 2012.

KAUSHIK, R.; KAUSHIK, R.; SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R. K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3-4, p. 121-126, 2006.

KIRAN, R. R. S.; RAJESH, K.; RAO, G. H.; MADHU, G. M. Statistical optimization of endo-polygalacturonase production by overproducing mutants of *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Journal of Biochemical Technology**, v. 2, n. 2, p. 154-157, 2010.

KIRAN, G. S.; SHANMUGHAPRIYA, S.; JAYALAKSHMI, J.; SELVIN, J.; GANDHIMATHI, R.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; ARUNKUMAR, M.; THANGAVELU, T.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n.5, p. 483-92. 2008.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. 1rd ed. Utrecht: Centraalbureau vöör Schimmelcultures, 2002.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, v. 94, p. 21-27, 2002.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purification and biochemical characterization of an Extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp. **Ciências Agrotécnica**, v. 30, p. 494-502, 2006.

KOHNO, M.; ENATSU, M.; YOSHIIZUMI, M.; KUGIMIYA, W. High-level expression of *Rhizopus niveus* lipase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and structural properties of the expressed enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 15, p. 327-235, 1999.

KONG, W. B.; HUA, S. F.; CAO, H.; MUC, Y. W.; YANG, H.; SONG, H.; XIA, C. G. Optimization of mixotrophic medium components for biomass production and biochemical composition biosynthesis by *Chlorella vulgaris* using response surface methodology. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 360–367, 2012.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, v. 161, p.1-188, 1989.

KUNCOVÁ, G.; SZILVA, J.; HETFLEJS, J.; SABATA, S. Catalysis in organic solvents with Lipase immobilized by Sol-Gel Technique. **Journal of Sol-Gel. Science and Technology**, v. 26, p. 1183-1187, 2003.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression Purification**, v. 41, p. 38-44, 2005.

KUMAR, A; KANWARM, S. Lipase production in Solid-State Fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications, dynamic biotechnology. **Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, p. 3-27, 2012.

KUMARI A, GUPTA R. Extracellular expression and characterization of thermostable lipases, LIP8, LIP14 and LIP18, from *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 34, p.1733–1739, 2012.

LACAZ, C. S; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. rev. e ampl. São Paulo, Sarvier, p. 695, 1991.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA, J. R. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p.175-180, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica**. 3º.ed. São Paulo: Sarvier, 975p, 2002.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M. **Principes of Biochemistry**. 2º ed. Worth Publishers. 1993.

LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 43-54, 2010.

LI, Y.; LIU, Z.; CUI, F.; LIU, Z.; ZHAO, H. Application of Plackett-Burman experimental design and Doehlert design to evaluate nutritional requirements for xylanase production by *Alternaria mali* ND-16. **Applies Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 285-291, 2007.

LI, J.; WANG, Y.; JIN, W.; ZHOU, B.; LI, B. Application of micronized konjac gel for fat analogue in mayonnaise. **Food Hydrocoll**, v. 35, p. 375-382, 2014.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 65-71, 2004.

LIMA, L. K. F. Reaproveitamento de Resíduos Sólidos na Cadeia Agroindustrial do Pescado. **Embrapa Pesca e Aquicultura Palmas**, TO, 2013.

LIMA, L. N.; ARAGON, C. C.; MATEO, C.; PALOMO, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLOI, P. W.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 118-123, 2013.

LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 98-102, 2006.

LIU, C.; HUANG, L. C.; CHANG, C. T.; SUNG, H. Y. Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells. **Food Chemistry**, v. 96, p. 621-631, 2006.

LOTRAKUL, P.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **Journal Biotechnology**, v. 54, p. 113- 120, 1997.

LOKRE, S. S.; KADAM, D. G. Production and characterization of thermostable lipase from *Aeribacillus* sp. SSL096201. **GERF Bulletin of Biosciences**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2015.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THEILIN, B.; NYSTROM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1-2, p. 3-40, 1998.

MACHADO, R. M. G.; FREIRE, V. H.; SILVA, P. C.; FIGUERÊDO, D. V.; FERREIRA, P. E. **Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios**. 1 ed. Belo Horizonte: Segrac, 223, 2002.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-21, 2002.

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

MALDONADO, R. R. Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais. **Dissertação** de Mestrado em Engenharia de Alimentos, FEA, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2006.

MALDONATO, R. R.; MACEDO, G. A.; RODRIGUES, M. I. Lipase production using micro-organisms from different agroindustrial by products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v. 4, n.1, p. 108-115, 2014.

MARTINS, T. S. Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. **Dissertação**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MATA-GOMEZ, M.; RODRÍGUEZ, L. V.; RAMOS, E. L.; RENOVATO, J.; CRUZ-HERNÁNDEZ, M. A.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J.; AGUILAR, C. N. A Novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 987- 996, 2009.

MAYORDOMA, I.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J. A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 105–109, 2000.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. Screening of organic supports and activation protocols for immobilization and stabilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.

MENDES, A. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; DE LC GIORDANO, R. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831- 840, 2011.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, 296-305, 2005.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Biodegradação de Águas Residuárias de Laticínios Previamente Tratadas por Lipases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 2, p. 143-149, 2006.

MENONCIN, S.; DOMÍNGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran, **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 4, p. 537-544, 2010.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; DE LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MHETRAS, N.; BASTAWDE, K.; GOKHALE, D. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource technology**, v. 100, p. 1486-1490, 2009.

MICOTECA URM. 2016. Disponível em <<http://www.ufpe.br/micoteca>> Acesso em 11 de setembro de 2016.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. **Springer**, p. 13-32, 2006.

MONTEIRO, M. C. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. **Dissertação**. Universidade Federal de Lavras. 2013.

MORAIS, M. M.; PINTO, P. A. A.; ORTIL, S. C. A.; CREXI, V. T.; SILVA, R. L.; SILVA J. D. **Study of fish oil refining process**. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 23-33, 2001.

MOREIRA, K. A.; ALBUQUERQUE, B. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L. Application of protease from *Nocardia* sp. as a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 307–312, 2002.

MORETTO, E.; FETT, R. **Óleos e gorduras vegetais: processamento e análises**. 2. ed. Florianópolis: UFSC, 1989.

MORIANA, A.; VILLALOBOS, F. J.; FERERES, E. Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 395–405, 2002.

MOTA, F. A. S.; SANTOS, F. F. P.; LIMA, A. A. S.; MALVEIRA, J. Q.; COSTA FILHO, J. T. Desenvolvimento de uma unidade piloto destinada a extração do óleo de vísceras de tilápia para posterior utilização na cadeia produtiva de biodiesel. **Revista GEINTEC**, v. 4, n. 3, p. 1252-1269, 2014.

MOZAFFAR, Z.; WEETE, J. D. **Lipids**, v. 28, p. 377–382, 1993.

MURRAY, P. R.; ROSSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia: Médica**, 5ª edição, Elsevier Editora Ltda, pp. 770-773, 2006.

NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Reverse micellar extraction for downstream processing of lipase: effect of various parameters on extraction. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1172-1178, 2009.

NELSON, D. D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6ª ed. New York: W.H. Freeman, 1158 p. 2011.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v. 12, n. 3, p. 69-71, 1998.

NIGAM, P.S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications, **Biomolecules**, v. 3, p. 597-611, 2013.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Microbial detergent compatible lipases. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 74, p. 105-113, 2015.

NUNES, P. A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLE, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Optimized production of MLM triacylglycerols catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, p.1-9, 2012.

OMIL, F.; GARRIDO, J. M.; ARROJO, B.; MÉNDEZ, R. Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale. **Water Research**, v. 37, n. 17, p. 4099-4108, 2003.

OETTERER, M. **Produtos Obtidos por Interferência na Fração Proteica do Pescado**. Piracicaba: ESALQ, 2001.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; TOITA, J.; SEKIGUCHI, J. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, p. 413-419, 1994.

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

OLIVEIRA, M. M.; PIMENTA, M. E. S. G.; CAMARGO, A. C. S.; FIORINI, J. E.; PIMENTA, C. J. Silagem de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com ácido fórmico – Análise bromatológica, físico-química e microbiológica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1218-1223, 2006.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRAI, L. A.; ANDRADEI, J. S.; CHAGAS, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 4, 2006.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

ONIONS, A.H.S.; BRADY, B.L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: Peberdy, J.F. (Ed.) Biotechnology Handbooks 1 *Penicillium* and *Acremonium*. New York and London, **Plenum Press**, p. 1-36, 1987.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; ALENCAR, J. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

OYELEKE, S. B.; OYEWOLE, O. A.; EGWIM, E. C. Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using *Parkia biglobosa* (Africa Locust Beans) as substrate in solid state fermentation, **Advances in Life Sciences**, v. 1, n. 2, p. 49–53, 2011.

PADILHA, M. E. S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 285-290, 2007.

PADILHA, G. S.; FERREIRA, J. F.; CASTIGLIONI, G. L.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Avaliação de lipases extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 16-22, 2011.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187–204, 2000.

PANDEY, K. D.; SHUKLA, S. P.; SHUKLA, P. N. Cyanobacteria in Antarctica: Ecology, physiology and cold adaptation. **Cellular and Molecular Biology**, v. 50, p. 575-584, 2004.

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

PATEL, R. N. Microbiology enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 1, 804-826, 2002.

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

PERA, L. M.; ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; CASTRO, G. R. Lipase extracts from *Aspergillus niger*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, 247–252, 2006.

PEREIRA, V. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulasas por *Aspergillus sulphureus***. (Fresen) Wehmer. **Dissertação**. Universidade Federal de Lavras, 2013.

PEREIRA, A. P.; FERREIRA, I. C. F. R.; MARCELINO, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J. A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. **Molecules**, v. 12, p. 1153-1162, 2007.

PETERSON, S.W. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus. Classification*. Samson, R. A., Pitt, J. C. (eds), **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam, 2000.

PETERSON, S.W. Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, v. 100, p. 205–226, 2008.

PETRUY, R.; LETTINGA, G. Digestion of a milk-fat emulsion. **Bioresource Technology**, v. 61, n. 2, p. 141-149, 1997.

PIMENTEL, M. C. B.; KRIEGER, N.; COELHO, L. C. C. B.; FONTANA, J. O.; MELO, E. H. M.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 49, n. 1, p. 59-74, 1994.

PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como micro-organismo, **Erechim**, p. 45-47, 2006.

PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 444-450, 2008.

PINOTTI, L. M. **Produção e purificação de penicilina G acilase**. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 270, 2003.

PIO, R.; BASTOS, D. C.; BERTI, A. J.; FILHO, J. A. S.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; ENTELMANN, F. A.; ALVES, A. S. R.; NETO, J. E. B. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia Lavras**, v. 29, n. 3, p. 562-567, 2005.

PITT, J. I. The Genus *Penicillium* and its *Teleomorphic* States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, **Academic Press**, 1979.

PITT, J. I. A laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – **Division of Food Processing**, 1991.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of species and their teleomorphs in the family *Trichocomaceae*. In: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus*. Samson, R. A. & PITT, J. C. (eds), **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam, 2000.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 67-80, 1998.

POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4639-4750, 2002.

PURWANTO, M. G. M.; MARETHA, M. V.; WAHYDI, M.; GOELTOM, M. T. Whole cell hydrolysis of sardine (*Sardinella lemura*) oil waste using *Mucor circinelloides* NRRL 1405 Immobilized in pol-urethane foam. **Procedia Chemistry**, 14: 256-262, 2015.

QUYEN, D.T.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R.D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. **Protein Expression Purification**, v. 28, p. 102–110, 2003.

RAPER, K.B.; THOM, C. 1949. **A manual of the Penicillia**. Baltimore, Williams and Wilkins.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. 1st ed. Baltimore: The Willians & Wilkins Company, 686p, 1965.

RAY, A. Application of lipase in industry. **Asian Journal of Pharmacy and Technology**, v. 2, n. 2, p. 33-37, 2012.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Analytica**, v. 27, p. 60-66, 2007.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Vol. 3. Editora e Gráfica Universitária-UFPEL. Pelotas/RS, 2000.

REINEHRA, C. O.; RIZZARDIA, J.; SILVA, M. F.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. 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. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454- 460, 2014.

REINEHRA, C. O.; BORTOLUZZI, L.; MORAIS, V. Q.; SMANIOTTO, T. M.; ZEN, T, K.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipases com atividade de hidrólise por *Aspergillus* utilizando subprodutos agroindustriais, óleo de soja e glicerol. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 1, n. 1, p. 97-115, 2016.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147, p. 237–250, 2009.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; ZARUR, M. A.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, p. 1-16, 2011.

RIBEIRO, I. I. **Imobilização de enzimas em materiais baseados em gelatinas**. Caparica: FCT-UNL, Relatório de estágio, 2006.

RIGO, E.; NINOWA, J. I.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A.; REMONATTO, D. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT- Food Science Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132–7, 2010.

RIFAAT, H. M.; EL-MAHALAWY, A. A.; EL-MENOFY, H. A.; DONIA, S. A. Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporium*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 5, n. 1, p. 39-53, 2010.

RIGO, E.; POLLONI, A.E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; KALIL, S. J.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M. Esterification activity of novel fungal and yeast lipases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1881–1888, 2010.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 1-22, 2010.

RODRIGUES, P. C. A. Mycobiota and aflatoxigenic profile of Portuguese almonds and chestnut from production to commercialization. **Dissertation** for PhD, Universidade do Minho, Braga, 307p, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas-SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fe e Amor. 2009.

ROMERO, C. M.; PERA, L. M.; OLIVARO, C.; VAZQUEZ, A.; BAIGORI, M. Tailoring chain length selectivity of a solvent-tolerant lipase activity from *Aspergillus niger* MYA 135 by submerged fermentation. **Fuel Processing Technology**, v. 98, p. 23–29, 2012.

ROSA, D. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Tratamento biológico/enzimático de efluente com alto teor de gordura. In: **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, 2005.

RUBIO-RODRIGUEZ, N.; BELTRAN, S.; JAIME, I.; DIEGO, S. M.; SANZ, M. T.; CARBALLIDO, J. R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p. 1-12, 2010.

SABU, A.; PANDEY, A. J.; DAUD, M.; SZAKACS, G. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agroresidues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* TCC 16620. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1223–1228, 2005.

SALIHU, A.; ALAMA, M.D.Z.; ABDUL KARIMA, M.I.H.; SALLEH, M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mil effluente bases medium using statistical experimental desing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 66–73, 2011.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 412, 2004.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Identification of the common food and airborne fungi, *Aspergillus*. In: SAMSON, R. A. et al. Introduction to food and airborne fungi. Utrecht: **Centraalbureau voor Schimmekultures**, p. 64-97, 2000.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C. Methods for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi. In: Samson, R. A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C. (Ed.). Introduction to food and airborne fungi. **Wageningen: CBS**, v. 7, p. 283- 305, 2004.

SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: New Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1- 260. 2004.

SAMSON, R.A.; PETERSON, S.W.; FRISVAD, J.C.; VARGA, J. New species in *Aspergillus* section *terrei*. **Stud Mycology**, v. 69, p. 39–55, 2011.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 13-20, 2009.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p. 351- 362, 2001.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreati que sur les esters en emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 513-521, 1958.

SAMSON, R. A.; PETERSON, S.W.; FRISVAD, J. C.; Varga, J. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 39–55, 2011.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: Mashida, M.; Gomi, K. (Ed.). *Aspergillus: molecular biology and genomics*. London: **Caister Academic**, 19-40, 2010.

SAMSON, R.A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black *aspergilla*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 129-145, 2007.

SANTOS, C.; FRAGA, M. E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 168-175, 2010.

SANTOS, R. R.; MURUCI, L. N. M.; SANTOS, L. O.; ANTONIASSI, R.; SILVA, J. P. L.; DAMASO, M. C. T. Characterization of different oil soapstocks and their application in the lipase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 9, p. 561-566, 2014.

SAPONGI, S.; KNEZEVIC, Z. D.; BEZBRADICA, D. I.; ZUZA, M. G.; SAIED, O. A.; BOSKOVIC-VRAGOLOVIC, N.; MIJIN, D. Z. Use of *Candida rugose* lipase immobilized on sephabeads for the amylcaprylate synthesis: batch and fluidized bed reactor study. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 12-13, 2010.

SAUTOUR, M.; ROUGET, A.; DANTIGNY, P.; DIVIES, C.; BENSOUSSAN, M. Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 900-906, 2001.

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

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 239–247, 2003.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and caracterization of an alkaline termostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 239-247, 2003.

- SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal Microbiological Methods**, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2003.
- SCHMITZ, G. K. Obtenção de biomassa de *Aspergillus niger* com potencial catalítico para a reação de transesterificação para a produção de biodiesel. **Dissertação**. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, 2011.
- SCHONHEYDER, F.; VOLQUARTZ, K. On affinity of pig pancreas lipase for triacproin in heterogeneous solution. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 9, p. 57-67, 1945.
- SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K. E.; PULS, M.; Eggert, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p.166-170, 2006.
- SEBBEN, C. L.; BEIRÃO, L. H.; MEINERT, E. M.; TEIXEIRA, E.; DAMIAN, C. Rendimento e avaliação sensorial de hambúrgueres de carpa (*Cyprinus carpio*) com diferentes condições de processamento e armazenamento sob congelamento. **Boletim CEPPA**, v. 16, n. 1, p. 2-12, 2002.
- SEIBEL, N. F.; SOARES, L. A. de S. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, 333-337, 2003.
- SENA, A. R.; VALASQUES JÚNIOR, G. L.; BARRETTO, I. K. S. P.; ASSIS, S. A. Application of Doehlert experimental design in the optimization of experimental variables for the *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) and *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) cell lysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 4, p. 762-767, 2012.
- SETH, S.; CHAKRAVORTY, D.; DUBEY, V.K.; PATRA, S. An insight into plant lipase research challenges and countered, **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 13-2, 2014.
- SHANKAR, S. K.; MULIMANI, V. H. α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 958-961, 2007.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-643, 2001.
- SHARMA, R.; SONI, S.K.; VOHRA, R.M.; GUPTA, L.K.; GUPTA, J.K. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, 37: 1075-1084.
- SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel. A review. **Fuel**, v. 87, p. 2355-2373, 2008.
- SHARMA, M. K. Aqueous two phase extraction of lipase from rice bran. **Advances in Applied Science Research**, v. 2, n. 2, p. 265-271, 2011.
- SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, p. 1-15, 2014.

SHINSKY JJ, WHITE TJ, (eds.), PCR Protocols: **A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego, 2007.

SHU, C. H.; XU, C. J.; LIN, G. C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*, **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 734–738, 2006.

SHU, Z. Y.; JIANG, H.; LIN, R. F.; JIANG, Y. M.; LIN, L.; HUANG, J. Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 1-8, 2010.

SHOW, P.; LING, T.; LAN, J. C. W.; TEY, B.; RAMANAN, R. N.; YONG S.; OOI, C. Review of Microbial Lipase Purification Using Aqueous Two-phase Systems. **Current Organic Chemistry**, v.19, p. 19-29, 2015.

SILVA, D. P.; GELLEN, L. F. A.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; SCHEIDT, G. N. Potencial de produção de lipases e fosfolipases por *Trichoderma harzianum* para a indústria de alimentos. **Evidência**, v. 14, n. 1, p. 69-78, 2014.

SILVA, J.F.X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J.F.; CAHÚ, T.B.; BEZERRA, R.S. Utilization of tilapia processing waste for the production offish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 96- 106, 2014.

SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção *Flavi*: uma revisão. **Revista Ifes Ciência**, 1(1). Instituto Federal do Espírito Santo. 2015.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2824–2830, 2008.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486–520, 2012.

SHARMA, R; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-643. 2001.

SHU, C.; XU, C.; LIN, G. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 734–738, 2006.

SIMÕES, M. F.; SIMÕES, M. F.; PEREIRA, L.; SANTOS, C.; NELSON LIMA, N. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: Malik, A. Grohmann, E.; Alves, M. (Ed.) Management of microbial resources in the environment. **The Netherlands**, v. 5, p. 91-117. 2013.

SLIVINSK, C. T. Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido. **Dissertação**. Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2007.

SMABY, J. M.; MUDERHWA, J. M.; BROCKMAN, H. L. Is lateral phase separation required for fatty acid to stimulate lipases in a phosphatidylcholine interface? **Biochemistry**, v. 33, p. 1915-1922, 1994.

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A.G.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, p. 81:15- 23, 2013.

STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267- 2278, 2012.

SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. Industrial Biotechnology: sustainable growth and economic success. **Weinheim: Wiley**, p. 476, 2010.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p. 1591–1592, 1988.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TAKADA, N.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. *Penicillium abeanum* lipase: purification, characterization and its use for docohexaenoic acid enrichment of tuna oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 5, p. 498-501, 1996.

SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 219-224, 2008.

SUZUKI, M.; YAMAMOTO, H.; MIZUGAKI, M. Purification and general properties of a metal-insensite lipase from *Rhizopus javanicus* NR400. **Journal of Biochemistry**, v. 100, p. 1207-1213, 1986.

TAVARES, L. L. P.; NASCIMENTO, A.E.; OKADA, K.; ALVES DA SILVA, C. A. Seleção de diferentes meios para produção de lipase a partir de *Bacillus licheniformis* (UCP 1014). **Revista Exacta**, v. 9, n. 3, 157-165, 2011.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p.182-196, 2010.

TAVARES, A. C. D.; DA FONSECA, J. S.; DA FONSECA, T. R. B.; DE SOUZA, R. A. T.; BARRONCAS, J. F.; DE AMORIM SILVA, T.; TEIXEIRA, M. F. S. Enzimas extracelulares de fungos anamórficos isolados de *Morinda citrifolia* L. BBR- **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 1-6. 2013.

TAHOUN, M. K.; ALI, H. A. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 429-432. 1986.

TEIXEIRA, J. A.; FONSECA, M. M.; VICENTE, A. Geometria e modos de operação. Em: Fonseca, M. M.; Teixeira, J. A. *Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: **Lidel**. 2007.

THÉODORE, K.; PANDA, T. Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 1043, 1995.

THOM, C., RAPER, K.B. **A Manual of the Aspergilli**. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 1945.

TOROSSIAN, K.; BELL, A. W. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.13, p. 205–211, 1991.

TOIDA, J.; ARIKAE, Y.; KONDOU, K.; FUKUZAWA, M.; OHNISHI, K.; SEKIGUCHI, J. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 759-763, 1998.

TOIDA, J.; KONDOU, K.; FUKUZAWA, M.; OHNISHI, K.; SEKIGUCHI, J. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 1199-1203, 1995.

UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M.L. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-341, 2002.

VARGA, J.; TÓTH, B.; KOCSUBÉ, S.; FARKAS, B.; TÉREN, J. Evolutionary relationships among *Aspergillus terreus* isolates and their relatives. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 141–150, 2005.

VARGA, J.; KEVEI, F.; HAMARI, Z.; TOTH, B.; TEREN, J.; CROFT, J. H.; KOZAKIEWICZ, Z. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus classification, Aspergillus e Aspergillosis Website*, p. 397–411, 2000.

VERGER, R. Enzyme kinetics of lipolysis. **Methods Enzymology**, v, 64, p. 340-92, 1980.

VIANI, R.; BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, v. 19, n. 4, p. 400-407, 1996.

VIDOTTI, R. M.; GONÇALVES, G.; S. **Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de Tilápia e sua utilização na alimentação animal**. Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Continental Instituto de Pesca-APTA-SAA. São José do Rio Preto, SP, Brasil, 2006.

VIRTO, M.; CHAVARRI, F.; BUSTAMANTE, M. A.; BARRON, L. J. R.; ARAMBURU, M.; VICENTE, M. S.; PEREZ-ELORTONDO, F. J.; ALBISIU, M.; DE RENOBALLES, M. Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. **International Dairy Journal**, v.13, p. 391-399, 2003.

VOLPATO, G.; FILICE, M.; AYUB, M. A. Z.; GUISAN, J. M.; PALOMO, J. M. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 473-478, 2010.

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. **Desalination**, v. 219, p. 190–202, 2008.

WANG, W.K. **Membrane Separations in Biotechnology**. Second Edition, Marcel Dekker, Inc. New York. 2001.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In book: **PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual**, Academic Press, p. 315–322, 1990.

WILSON, L.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ILLANES, A.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of lipase–lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 259–264, 2006.

WOLSKI, E.; MENUSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. 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.

XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 3, p. 287-302. 2000.

YADAV, R. P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, S. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 28, p. 243–249, 1998.

YAZAWA, H.; KUMAGAI, H.; UEMURA, H. Characterization of triglyceride lipase genes of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, p. 1-11, 2012.

ZEMAN, L. J.; ZYDNEY, A. L. Microfiltration and Ultrafiltration. **Principles and Applications**. Marcel Dekker, INC. New York. 1996.

ANEXO A - RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 132.417



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 132.417

Recife, 11 de Agosto de 2016

Cliente: CINDY MARY DE MELLO FARIAS	
Endereço: Rua Marques de Baipendi, nº18, Casa C, Hipódromo – Recife/PE.	
Natureza do trabalho: Análise físico-química	
Material: 01 (uma) amostra de efluente	
Local da coleta: Abatedouro - Paulista	
Procedência da amostra: Efluente de abatedouro	
Referência da amostra: Efluente de abatedouro	
Data da coleta: 06/07/2016	Data de recebimento: 07/07/2016
Responsável pela coleta: Cliente	

RESULTADOS

Parâmetros	Resultados	Unidade	Método
Demanda Química de Oxigênio	709	mg/L	SMEWW 5220 C
Óleos e Graxas Totais	<10	mg/L	SMEWW 5520 D
Sólidos Dissolvidos Voláteis	66	mg/L	SMEWW 2540 E
Sólidos Totais	572	mg/L	SMEWW 2540 B

Observações:

- a) Os resultados deste ensaio/análise têm significação restrita e se aplicam tão somente a (s) amostra (s) coletada (s) pelo **Cliente**;
- b) Os resultados apresentados neste documento não podem ser usados para fins promocionais;
- c) A reprodução deste documento para outros fins, só poderá ser feita integralmente sem nenhuma alteração e com a aprovação do laboratório;
- d) Métodos utilizados: SMEWW - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22st edition, 2012.
- e) A coleta de amostras quando realizada pelo ITEP, segue o procedimento LABTAM-F-003, e as condições ambientais são registradas em planilha de campo.

Catarina B. de Andrade
 MSc. Catarina Chagas de Andrade
 Química Industrial
 CRQ 01.200.151- PE

Amostra Nº LABTAM – FQ – 1248
 O.S.nº 1833/2016

01/01

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE PERNAMBUCO - ITEP

Av. Professor Luiz Freire, 700 – Cidade Universitária – Recife – PE – CEP: 50.740-540
 FAX: 81 3183.4399 Fax: 81 3183.4272 www.itep.br e-mail: itep@itep.br
 CNPJ: 05.774.391/0001-15

ANEXO B - RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 134.284



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 134.284

Recife, 22 de Setembro de 2016

Cliente: CINDY MARY DE MELLO FARIAS	
Endereço: Rua Marques de Baependi, nº18, Casa C, Hipódromo – Recife/PE.	
Natureza do trabalho: Análise físico-química	
Material: 01 (uma) amostra de efluente	
Local da coleta: Garanhuns	
Procedência da amostra: Efluente Industrial	
Referência da amostra: Tambor de efluente de laticínio	
Data da coleta: 03/09/2016	Data de recebimento: 05/09/2016
Responsável pela coleta: Cliente	

RESULTADOS

Parâmetros	Resultados	Unidade	Método
Demanda Química de Oxigênio	37.960	mg/L	SMEW/W 5220 C
Óleos e Graxas Totais	16.779	mg/L	SMEW/W 5520 D

Observações:

- a) Os resultados deste ensaio/análise têm significação restrita e se aplicam tão somente a (s) amostra (s) coletada (s) pelo **Cliente**;
- b) Os resultados apresentados neste documento não podem ser usados para fins promocionais;
- c) A reprodução deste documento para outros fins, só poderá ser feita integralmente sem nenhuma alteração e com a aprovação do laboratório;
- d) Métodos utilizados: SMEW/W - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22st edition, 2012.
- e) A coleta de amostras quando realizada pelo ITEP, segue o procedimento LABTAM-F-003, e as condições ambientais são registradas em planilha de campo.

Catarina B. de Andrade
 MSc. Catarina Chagas de Andrade
 Química Industrial
 CRQ 01.200.151 - PE

Amostra Nº LABTAM – FQ – 1528
 O.S.nº 2465/2016

01/01

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE PERNAMBUCO - ITEP

Av. Professor Luiz Freire, 700 – Cidade Universitária – Recife – PE – CEP: 50.740-540
 PABX: 81 3183.4399 Fax: 81 3183.4272 www.itep.br e-mail: itep@itep.br
 CNPJ: 05.774.391/0001-15

