



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

MESTRANDA: Paloma Santa Cruz de Sales

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR AMOSTRAS DE *Cunninghamella*
echinulata (UCP 1308) EM MEIOS CONTENDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

Recife

2017

Paloma Santa Cruz de Sales

PRODUÇÃO DE LIPASE POR AMOSTRAS DE *Cunninghamella echinulata* (UCP 1308) EM MEIOS CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente/ Modelagem, Simulação.....

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Recife

2017

Sales, Paloma Santa Cruz de

Produção de Lipase por *Cunninghamella echinulata* Utilizando Meios Contendo Resíduos Agroindustriais. 2017

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2016.

1. Atividade lipolítica 2. *Cunninghamella echinulata* 3. Substratos agroindustriais. I. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Cunninghamella echinulata* (SIS 40)
UTILIZANDO MEIOS CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

PALOMA SANTA CRUZ DE SALES

Examinadores:

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^a. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus. Ele esteve sempre ao meu lado durante esta caminhada, muitas vezes o caminho tornou-se tortuoso e pensei em desistir. Porém, Ele me deu duas características que estão inseridas em minha alma: persistência e determinação! Contudo, não teria chegado até aqui sem a ajuda de alguns anjos que Ele me enviou.

A minha Família, minha mãe Mércia (*in memoriam*), que com certeza está muito feliz com a minha conquista, ao meu pai, Luiz Augusto, aos meus irmãos que sempre me apoiaram me dando todo o suporte com meu filho e me incentivado a cada obstáculo.

Ao meu Esposo, Anacleto, pelo seu amor e paciência nos momentos difíceis, e ao meu filho, Ernesto, presente de Deus que ilumina minha caminhada.

Aos meus amigos de longa data, aos quais conquistei na graduação, Brindíze, Cláudia, Diêgena, Jupiranan e Wellington.

A meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos, especialmente , Tainã Fonseca , Thais Ostendorf, Thais Souza e Felipe Amaral que se tornaram verdadeiros amigos. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês!

Meu muitíssimo obrigado ao meu orientador e Prof Dr. Carlos Alberto Alves da Silva. Obrigada por acreditar em mim e aceitar-me como orientanda, incentivar-me, apoiar-me sempre que precisei. Ainda no âmbito acadêmico, devo agradecer a Prof^a Dr^a Galba Takaki, um exemplo que sempre levarei comigo, como pessoa e como profissional.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO I	
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.2 OBJETIVOS.....	10
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
1.3 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.3.1 BIOTECNOLOGIA.....	11
1.3.2 ENZIMAS.....	12
1.3.3 LIPASES.....	14
1.3.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	16
1.3.5 FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASE.....	18
1.3.6 GÊNERO <i>CUNNINGHAMELLA</i>	19
1.3.6.1 <i>Cunninghamella echinulata</i>	21
1.3.7 CAATINGA.....	22
1.3.8 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS.....	24
1.3.8.1 ÓLEOS VEGETAIS RESIDUAIS.....	25
1.3.8.2 RESÍDUO DE SORVETE.....	26
1.3.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPÍTULO II	
Produção de lipase por <i>Cunninghamella echinulata</i>	43
Resumo.....	43
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	44
Resultados e Discussão.....	46
Conclusões.....	49
Agradecimentos.....	49
Referências.....	49
CAPÍTULO III	

Produção de lipase por <i>Cunninghamella echinulata</i> (UCP 1308) utilização de resíduos agroindustriais através de um planejamento fatorial.	53
Resumo	53
Abstract	53
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4. CONCLUSÕES.....	59
CAPÍTULO IV	
CONCLUSÕES GERAIS	65
Anexos	66

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Ação enzimática	14
Figura 2. Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas utilizando o processo de fermentação submersa.	17
Figura 3. Morfologia do fungo <i>Cunninghamella</i>	20
Figura 4. <i>Cunninghamella echinulata</i>	22
Figura 5. Caatinga de Pernambuco	23
Figura 6. Biocoleta.....	26
Figura 7. Resíduo de sorvete.....	27

CAPÍTULO II

Figura 1. A atividade lipolítica da amostra UCP 1308 em diferentes meios de produção.	47
Figura 2. Crescimento da biomassa da amostra UCP 1308 em diferentes meios.	48

CAPÍTULO III

Figura 1. Diagrama de pareto mostrando os efeitos principais e alterações das variáveis independentes no processo de produção de lipase por <i>Cunninghamella echinulata</i> (UCP 1308) a 168 horas de fermentação a 28°C. (1) pH, (2) óleo pós-fritura, (3) resíduo de sorvete.....	58
Figura 2. Crescimento do fungo <i>Cunninghamella echinulata</i> (UCP 1308) para o ensaio 1 em 168 horas de fermentação a 37°C e pH 5,5.....	59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Classificação das enzimas	14
Tabela 2. Gênero e espécie do fungo <i>Cunninghamella</i>	21

CAPÍTULO II

Tabela 1- Ensaio de detecção da atividade lipolítica em meio sólido utilizando diferentes amostras de <i>Cunninghamella echinulata</i>	46
Tabela 2– Determinação dos valores de pH nos meios testados da amostra UCP 1308	48
Tabela 3- Determinação da atividade enzimática de lipase em diferentes meios da amostra UCP 1308.	48

CAPÍTULO III

Tabela 1– Matriz de planejamento fatorial 2^3 completa para produção de lipase	55
Tabela 2– Produção de biomassa, pH e atividade lipolítica dos ensaios para as concentrações de pH, óleo de fritura e resíduo de sorvete em 168 horas de cultivo a 28°C a 86 rpm.	57

RESUMO

As lipases (EC 3.1.1.3) constituem um dos grupos de enzimas que possuem uma imensa variedade de aplicações biotecnológicas, podendo ser produzidas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. O uso de amostras isoladas do solo da caatinga se justifica devido a elevada biodiversidade e potencial biotecnológico na produção de enzimas, além do emprego de resíduos agroindústrias como substratos na minimização dos custos de produção. Neste trabalho, foi avaliado o potencial biotecnológico de amostras de *Cunninghamella echinulata* isoladas da Caatinga de Pernambuco denominados UCP 060, UCP 1299 e UCP 1308 para produção de lipase através de um screening dos fungos, seleção de meios utilizando resíduos agroindústrias (óleo pós-fritura e resíduo de efluente sorvete) e fermentação submersa com um planejamento fatorial completo 2^3 incubados a 37°C, 150 rpm, 168h. Os resultados revelaram que a amostra UCP 1308 apresentou a maior produção de lipase com 26,4 U/mL com 96 h, no meio 4, mostrando que o resíduo de sorvete atuou como um excelente substrato da produção da enzima. Neste trabalho foi comprovado que a elaboração de meios alternativos são economicamente viáveis para produção da lipase, proporcionando o desenvolvimento de tecnologias em consonância com os princípios da sustentabilidade.

Palavras - chave: atividade lipolítica, fermentação submersa, fungo filamentoso.

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) are one of the groups of enzymes that have an immense variety of biotechnological applications and can be produced by bacteria, yeasts and filamentous fungi. The use of isolated samples of the caatinga soil is justified due to high biodiversity and biotechnological potential in the production of enzymes, besides the use of agroindustrial residues as substrates in minimizing production costs. In this work, the biotechnological potential of *Cunninghamella echinulata* samples isolated from the Caatinga of Pernambuco denominated UCP 060, UCP 1299 and UCP 1308 were evaluated for lipase production through a screening of fungi, selection of media using agroindustrial residues (post-fry oil and Effluent waste sorbet) and submerged fermentation with a complete factorial design 2³ incubated at 37 ° C, 150 rpm, 168h. The results showed that the UCP 1308 sample presented the highest production of lipase with 26.4 U / mL at 96 h in medium 4, showing that the ice cream residue served as an excellent substrate for enzyme production. In this work it was proven that the elaboration of alternative means are economically viable for lipase production, providing the development of technologies in line with the principles of sustainability.

Key words: lipolytic activity, submerged fermentation, filamentou fungi.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos microbianos atualmente são responsáveis por uma grande parcela da economia mundial, mas apesar da potencialidade do desenvolvimento dos processos enzimáticos, os custos ainda são bastante elevados. Assim, uma das alternativas para minimizar este problema tem sido o emprego de resíduos agroindustriais como substrato na formulação de meios de produção. Das substâncias produzidas por micro-organismos as enzimas são as que mais merecem destaque, pois a produção enzimática movimentava aproximadamente 2,34 bilhões de dólares anuais no mercado internacional (MUSSATTO et al., 2007, MURUGAN et al., 2011, SANTOS et al., 2015).

Enzimas são proteínas com atividade catalítica que possibilitam inúmeras reações químicas em condições brandas, comparativamente aos processos químicos tradicionais. As lipases são empregadas em mais de 20% das biotransformações de síntese orgânica (JAYAPRAKASH., EBENEZER, 2010., PENHA et al., 2016).

As lipases verdadeiras (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalizam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Essa classe enzimática apresenta a capacidade única de atuar apenas na interface óleo/água. Essa definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolizam outros lipídeos como acilhidrolases, colesteroesterase, tioesterases, etc (BORNSCHEUER, et al., 2002; BORNSCHEUER, 2002., TREICHEL et al., 2010, COLLA, REINEHR, COSTA, 2012., KANMANI, ARAVIND, KUMARESAN, 2014., HMIDET, NAWANI, GHORBEL, 2015; KUMAR, et al., 2016). As lipases podem atuar tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico, com teor de água restrito, e são consideradas carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados (CASTRO et al; 2004., PENHA et al., 2016).

Os cultivos submersos têm sido tradicionalmente utilizados para a produção industrial de grande maioria de enzimas microbianas, devido à facilidade de crescimento dos micro-organismos e do controle de diferentes parâmetros, como pH, temperatura, aeração e umidade, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (PANDEY et al., 2000., SANDHYA et al., 2005., ORLANDELLI et al., 2012).

A exploração dos micro-organismos pela indústria tem gerado bilhões de dólares a cada ano e as vantagens de realizar ensaios com fungos filamentosos se devem a fatores como fácil cultivo e manipulação, produção de elevados níveis de

enzimas extracelulares, maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação (POLIZELI et al., 2005., KAR et al., 2006., SILVA et al., 2015).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir lipase por amostras de *Cunninghamella echinulata* (UCP 060, UCP 1299 e UCP 1308) isoladas da Caatinga de Pernambuco, através da elaboração de meios alternativos contendo resíduos oriundos da indústria de alimentos.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar amostras de *Cunninghamella echinulata* (UCP 060, UCP 1299 e UCP 1308) produtoras de lipase através de um “*screening*” enzimático em meio sólido em diferentes valores de temperatura e pH;
- Produzir lipase através de fermentação submersa utilizando meios convencionais de produção, verificando a influência das fontes de carbono e nitrogênio e os parâmetros cinéticos;
- Utilizar diferentes substratos da indústria de alimentos contendo elevado teor de ácidos graxos (óleo pós fritura e resíduo de sorvete) para elaboração de meios alternativos de produção;
- Investigar a influência dos substratos selecionados, temperatura, pH e velocidade de agitação na produção de lipase;
- Utilizar um planejamento fatorial completo para avaliar a(s) melhor (res) condição (ões) de produção da lipase;

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 BIOTECNOLOGIA

A biotecnologia atualmente é um campo de crescimento e desenvolvimento de produtos e tecnologias que envolvem áreas distintas da microbiologia, onde se utilizam diversos gêneros de micro-organismos para produção de diferentes compostos bioativos. Por ser uma área multidisciplinar, voltada para agricultura, medicina, saúde, meio ambiente, diversos produtos podem ser obtidos através de estudos diretamente relacionados com animais, plantas e principalmente micro-organismos (SILVEIRA; BORGES, 2004., FORTUIN, 2006., MATIAS., VIEIRA., FONTENELE, 2014).

Atualmente, a biotecnologia é um dos campos mais promissores de tecnologias de ponta, sendo a tecnologia enzimática de grande destaque. Os elevados custos de enzimas purificadas disponíveis comercialmente incentivam um aumento das pesquisas nesta área. Cerca de 4.000 enzimas são conhecidas, muitas delas utilizadas comercialmente, sendo a maioria delas de origem microbiana (RIGO, 2009., SILVEIRA et al., 2011).

A biotecnologia é uma ciência reconhecida universalmente como uma das principais tecnologias capacitadoras do século XXI. A confiança nessa visão, decorre de sua posição como uma inovação radical, através do impacto que ela tem tido e terá ainda sobre problemas globais, como doenças e poluição ambiental, sendo assim uma promessa de sustentabilidade industrial e da percepção de que se tornou uma tecnologia mais avançada e capaz de fornecer competitividade econômica, geração de novos mercados e ampla aplicabilidade industrial (BULL., WARD., GOODFELLOW, 2000., ALENCAR 2011). Por outro lado, a humanidade depende cada vez mais de um ambiente ecologicamente equilibrado para se desenvolver e sobreviver. Desta forma, o desenvolvimento de biotecnologias exerce um papel preponderante na busca de uma relação mais equilibrada entre os seres humanos e o ambiente (PENNA., CANOLA, 2009).

As lipases são enzimas promissoras para aplicações biotecnológicas, devido a sua versatilidade em realizar reações de hidrólise e síntese (JAEGER., EGGERT, 2012, BARROS., et al. 2010., Barros et al., 2015).

A biotecnologia, junto com a Nanotecnologia tem contribuído de uma maneira bastante significativa, pois tratam de um conjunto de conceitos, conhecimentos e de ferramentas experimentais, que comportam um novo nível de domínio nas condições ambientais, instituindo assim novas estruturas organizadoras a partir da escala

molecular, dotadas de propriedades microscópicas e macroscópicas, tornando-as adequadas a desempenharem funções necessárias à melhoria da qualidade de vida humana (PADILHA et al., 2011., GONZALES et al., 2013).

A compreensão dos conceitos de biotecnologia atualizada na conjuntura social, implica na análise das suas bases de formação e de suas constituições científicas, sociais, ambientais e econômicas, além da posição firmada pela comunidade internacional em sua regulamentação jurídica (Convenção sobre Diversidade Biológica de 1992 e Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança de 2003), e a discussão acerca das benesses e riscos dela oriundos, bem como as respectivas contingências no que diz respeito à concretização de direitos essenciais para humanidade, especificamente os direitos humanos ao desenvolvimento sustentável e a um meio ambiente equilibrado (BERTOLDI, 2015).

1.3.2 ENZIMAS

Enzimas são macromoléculas predominantemente protéicas, imprescindíveis a qualquer ser vivo, podem acelerar ou retardar as reações químicas, que mantêm e regulam os processos vitais. Através desta definição, fica entendido que a atuação das enzimas ocorre dentro do sistemas vivos (PEREIRA, 2014). Embora sejam produzidas por várias espécies de animais, vegetais e micro-organismos. As enzimas de fontes microbianas recebem uma particular atenção, devido seu potencial aplicação de nas indústrias, principalmente nas de detergentes, óleos e gorduras, fábricas de laticínios indústrias farmacêutica e de polpa e papéis (JAEGER, REETZ, 1998; JAEGER, EGGERT, 2002., HONDE, KADEMI, LEBLANC, 2004., SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012., ANOBOM et al., 2014., SAXENA, 2015 KUMAR, MARÍN-NAVARRO, SHUKLA, 2016).

A utilização de diferentes tipos de enzimas nas indústrias, tem surgido como uma das possibilidades de tornar os processos tecnológicos mais eficientes e com elevados rendimentos. A utilização de enzimas nos processos industriais apresenta um grande potencial em razão da sua alta especificidade e elevada eficiência (HASAN., SHAH., HAMEED, 2006., NIGAN, 2013., LIMA et al., 2014). As enzimas podem executar uma série de transformações químicas de modo seletivo, rápido e versátil, e não requerem altas temperaturas ou valores contrários de pH para execução das suas atividades enzimáticas (GONÇALVES, 2007., SALUM et al., 2007., SILVA et al., 2014).

O Brasil, importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente um enorme potencial para produzi-las. Essa potencialidade é evidenciada pela grande diversidade biológica existente, ainda pouco explorada, que serviria como fonte para a obtenção de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial e pela abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas; a palha de arroz, o bagaço de cana, etc) que constituem substrato de baixo custo para a formulação de meios econômicos de produção (BOM.,FERRARA.,CORVO, 2008., BARATO et al; 2011., RODRIGUES et al., 2014).

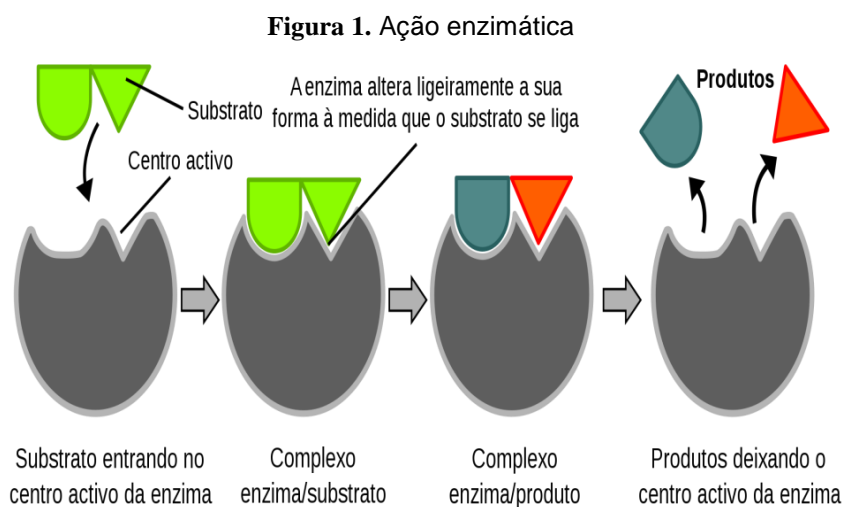
Enzimas de diferentes classes, principalmente as microbianas, são comercializadas no mercado mundial, sendo que as hidrolases representam a maior fração das enzimas comercializadas, onde aproximadamente 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente as utilizam. No entanto, a tendência é a mudança nesse quadro de vendas, em função da crescente demanda por enzimas passíveis de aplicações em processos de biorremediação, tratamento de efluentes indústrias, química fina e na hidrólise de biomassa vegetal para produção de biocombustíveis (CARVALHO et al., 2008).

Segundo Henn (2002) as moléculas de enzimas contêm uma fenda especial denominada sítio ativo, que contém aminoácidos cujas cadeias laterais criam uma superfície complementar ao substrato. Isso permite que as enzimas atuem na ruptura de uma determinada ligação química. O sítio ativo liga-se ao substrato, formando um complexo enzima-substrato que será convertido a enzima e produto (Figura 1). Qualquer que seja o mecanismo catalítico de uma reação, uma vez que as moléculas de substrato tenham reagido, a enzima separa-se dos produtos, liberando a molécula de enzima para novas reações. Portanto, as enzimas não são consumidas nas reações que catalizam.

A aplicação de enzimas para remover contaminantes ambientais e indústrias tem sido estudada nos últimos 20 anos. As reações realizadas utilizando técnicas baseadas em enzimas são caracterizadas por alta eficiência e seletividades e são significativamente mais benignas para o meio ambiente quando comparadas aos métodos puramente químicos de remediação ambiental (SZATKOWSKI et al., 2011., TORRES, 2014).

A popularização do uso de enzimas, esbarra no elevado custo das enzimas comerciais, e depende da escolha de micro-organismos mais eficientes, de meios de produção menor custo ou de processos fermentativos mais adequados que, dessa

forma, possibilitem aumentar a produtividade e o rendimento, minimizando os custos do processo e ampliando a produção (SANTOS, 2014., PENHA et al., 2015).



Fonte: <http://www.estudopratico.com.br/enzimas-funcoes-e-classificacao/2013>.

Assim novos estudos surgem com o intuito de aumentar a estabilidade enzimática, visando a utilização nos, mas diversos processos industriais/ambientais. Dessa forma, as enzimas são classificadas de acordo como tipo de reação: Oxireduases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e Ligases (GUIMARAES et al., 2010., TAVARES et al., 2012., BISATTO, 2012). A tabela 1 abaixo demonstra que as reações catalisadoras citadas no texto.

1.3.3 LIPASES

As lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerolacil hidrolases) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis a ácidos graxos e glicerol na interface entre as fases aquosa e lipídica (JAEGER., EGGERT, 2012, BARROS., et al. 2010., Barros, M. et al., 2015).

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que ocupam um lugar de destaque entre os biocatalisadores, e têm muitas aplicações, motivo esse que faz crescer significativamente sua participação no mercado mundial de enzimas industriais. (SAXENA et al., 2003., HASAN et al., 2006., FREIRE., CASTILHO, 2008., CAI et al., 2009). (BARROS., FLEURI., MACEDO, 2010., GHASEMI et al., 2011., TAVARES et al., 2011). Lipases provenientes de distintas fontes microbianas, normalmente apresentam uma ampla faixa de propriedades dependentes da fonte produtora,

relacionada ainda com a especificidade posicional, especificidade ao substrato, estabilidade em solventes orgânicos, termo estabilidade, pH ótimo, etc (REINEHR et al., 2014).

Tabela 1. Classificação das enzimas

Classificação	Reação que catalisam	Enzimas
Oxido-redutases	Reações de óxido-redução. Transferência de átomos de O e H ou elétrons de um substrato para o outro.	Hidrogenase; Oxidase; Peroxidase; Hidroxilases; Oxigenases.
Transferases	Reações de transferência de grupos específicos de um composto para o outro.	Aminotransferases; Acetiltransferase; Cinases; Fosforilases; Frutossiltransferase
Hidrolases	Reações hidrolíticas	Lipases; Proteases; Amilases; Pectinases.
Liases	Reações reversíveis, não hidrolíticas de remoção de grupos da molécula de substrato.	Descarboxilases; Aldolases
Isomerases	Reação de isomerização transformam isômeros entre si (cis e trans).	Glicose-isomerase.
Ligases	Reação de síntese de novos compostos, derivados da junção de duas moléculas.	Piruvato carboxilase

Fonte: SANTOS, 2012

As lipases quimicamente são denominadas carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, e dependendo das condições empregadas, também catalisam diversas reações de síntese (esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização). As lipases fúngicas têm sido preferencialmente utilizadas, porque em sua maioria, não são prejudiciais à saúde humana e são reconhecidas como GRAS (Generally Regarded As Safe). (HOUDE., KADEMI., LEBLAC., 2004., TREICHEL et al., 2010).

O vasto interesse pela produção desta enzima está associado diretamente à ampla aplicação em indústrias dos mais diversos setores, como alimentícia, farmacêutica, produção de biocombustíveis, bem como sua aplicação no tratamento e remoção da carga lipolítica em águas residuais. Entretanto, o elevado custo das lipases comerciais limita sua aplicação em tecnologias industriais e, por outro lado, impulsiona estudos relacionados à produção desta enzima por meio de micro-

organismos viabilizando a redução dos custos do processo de produção das lipases (SBARDELOTTO et al., 2014).

Embora sejam produzidas por diversas origens (vegetais, animais e micro-organismos) as lipases representam a classe mais utilizada de enzimas em aplicações biotecnológicas (HANSAN., SHAH., HAMEED, 2006., MESSIAS et al., 2012).

O campo de aplicação comercial mais importante para lipases hidrolíticas é a sua adição em detergentes, de uso doméstico e industrial. Por estimativa, aproximadamente 1000 toneladas de lipases são adicionadas em cerca de 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos a cada ano. Entretanto existem três desafios que os produtores de lipases para detergentes precisam atender: a alta variação no teor de triglicerídeos de manchas de gordura, requerendo lipases com baixa especificidade de substrato, (2) lavagem em condições altas (com valores de pH de 10 a 11 e temperatura de 30 °C a 60°C) exigindo maior estabilidade da enzima, e (3) efeitos da desnaturação química e degradação proteolítica causada pelos aditivos do detergente, tais como o surfactantes e proteases. Soluções para estes problemas são estudadas analisando as propriedades das lipases pela engenharia de proteínas (JAEERG., REETZ, 1998.,COLLA et al., 2012., TOMBINI, 2015).

Essas enzimas atuam preferencialmente na degradação de cadeias de ácidos graxos de tamanhos diferentes, alterando o produto de modo considerável. A produção de aromas em produtos lácteos é acelerada quando há a formação de ácidos graxos livres, peptídeos solúveis e aminoácidos durante a maturação do produto. Logo as lipases têm sido utilizadas para a produção de aromas (SAID; PIETRO, 2004, SILVA et al., 2014).

1.3.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação submersa é o processo mais utilizado na produção comercial de enzimas. Os processos submersos são aqueles em que o micro-organismo, ou outras células desenvolve-se em meio de cultura com o excesso de água sob agitação. As fermentações são conduzidas em mesas agitadoras e aeradas mecanicamente, com volumes que podem chegar a 1000 m³ (KIRK., BORCHET., FUGLASNG, 2002., FAHEIRA JUNIOR, 2012).

As ótimas condições para a produção de lipases em meio submerso tem sido alvo de muitas pesquisas. Os fatores que influenciam a produção de lipases pelos micro-organismos, são fonte de carbono, fonte de nitrogênio, temperatura, pH,

concentração de sais inorgânicos, concentração de oxigênio dissolvido e velocidade de agitação (SILVA., LIMA., PINOTTI, 2014).

A formulação meio de cultivo e/ou os diferentes micro-organismos produtores podem influenciar diretamente no processo de produção enzimática principalmente se for intra e extra celular. As enzimas que são produzidas intracelularmente vêm despertando interesse, principalmente, devido a sua estabilidade e seu mais alto grau de pureza. É ainda possível imobilizar as células de micro-organismos inteiras obtendo assim maiores rendimentos, maior estabilidade operacional e custos mais baixos (SILVA et. al., 2009., WOLSKI, 2008., SILVA, LIMA, PINOTTI, 2014).

A produção de lipases microbianas tem sido realizada principalmente por fermentação submersa (FSM), devido a produção está associada diretamente ao crescimento microbiano e conseqüentemente, as variações da composição do meio de produção e as condições de cultivo (SANCHEZ, DEMAINE, 2002; GEISSELER et al., 2010; NIAZ, et al., 2014; WACKETT, 2015; COLLA et al., 2016). Estas enzimas também podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES), no qual são utilizados substratos insolúveis com baixas percentagens de água em sua composição, atuando como fontes de diversos nutrientes e como suporte fisiológico (PANDEY, 2000., PALACIOS, BUSTO, ORTEGA, 2014).

A figura 2 descreve de forma simplificada a produção de enzimas por um micro-organismos.

Figura 2. Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas utilizando o processo de fermentação submersa.



Fonte: Adaptado de Sant'Anna Junior (2001).

A produção da lipase tem sido estudada na fermentação submersa por ser muito utilizada na produção de enzimas microbianas, contendo resíduos industriais e outros substratos. No entanto, sua otimização é de grande importância para viabilizar

o desenvolvimento de tecnologia em países importadores. O uso de substratos de baixo custo, como resíduos industriais, tem sido uma alternativa para reduzir os custos de produção (PANDEY, SOCCOL, MITCHELL, 2000., LADEIRA et al., 2010., MUKHTAR, HAQ, 2013., BUENROSTRO-FIGUEROA et al., 2014).

1.3.5 FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASE

A utilização de enzimas em processos industriais e laboratoriais ganhou ênfase em meados do século passado, sendo hoje alvo de intensos estudos em vários ramos. Os procedimentos a serem estudados consistem em produção e seleção de fungos, cuja capacidade para produção da enzima lipase sejam satisfatórias (MONTEIRO, SILVA, 2009., CARMINATI, PIN, MARTINS, 2014).

Os fungos filamentosos secretam uma grande variedade de enzimas no ambiente para auxiliar sua nutrição, o que os tornam capazes de decompor vários materiais naturais, refinados ou processados (AGUIAR, 2010., FARIAS et al., 2015).

É verificado na literatura que uma grande variedade de micro-organismos, principalmente os fungos filamentosos são descritos como bons produtores de lipase, pois habitam em ambientes ambientais extremos e suportam com facilidade as diversas mudanças de pH e de temperatura dependendo dos parâmetros reacionais utilizados e das diferentes especificidades encontradas (SUSEELA LANKA, et al., 2015).

As lipases microbianas, apresentam um elevado potencial em aplicações comerciais devido sua estabilidade, seletividade e larga especificidade por substratos, podendo atingir uma atividade máxima em pH na faixa de 6 e 8 (DALMAU et al., 2000., LIMA et al., 2003., AÇIKEL, ERAN, AÇIKEL, 2010., QIN, et al., 2014). Com relação à estabilidade o pH, os protocolos experimentais variam com o tempo e as condições de incubação adotados podem ser determinadas e detectadas por diferentes metodologias (BEISSON et al., 2000; HASAN, SHAH, HAMEED, 2009; ABD-ELHAKEEM, ELSAYED, ALKHULAQI, 2013., ÜLKER et al., 2016).

A literatura reporta que uma variedade de micro-organismo é capaz de produzir enzimas, através da fermentação, em condições experimentais definidas. Entretanto, a quantidade de enzima produzida, na maioria dos casos somado ao custo associado ao meio de cultivo inviabilizava a transposição do processo para a escala industrial. Dessa forma, a identificação de micro-organismos que produzam grandes quantidades de enzimas, a busca por meio de cultivo de baixo custo, torna-se oportuna para aperfeiçoar a produção industrial de enzimas de interesse biotecnológico gerando

economia no processo produtivo (OLIVEIRA et al., 2007, JESUS et al., 2013, LIMA 2014).

1.3.6 GÊNERO *CUNNINGHAMELLA*

Os fungos filamentosos são micro-organismos que se destacam devido à sua grande facilidade de cultivo e por secretarem uma grande quantidade de enzimas diretamente nos meios de produção, não sendo necessária, assim, a ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimáticos, com elevado potencial para inúmeras aplicações industriais. (FENSELAU, DEMIREV, 2001; HONG et al., 2005., RODRIGUES et al., 2011., NASCIMENTO et al., 2014., SILVA et al., 2015).

Entre os fungos dessa classe encontram-se os do gênero *Cunninghamella* que pertencem a ordem Mucorales e foram primeiramente descritos em 1903 como fungos filamentosos (FRANCO, 2005). Os principais representantes são *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella bertholletiae* (ALEXOPOULOS,1996., ANDRADE et al., 2015).

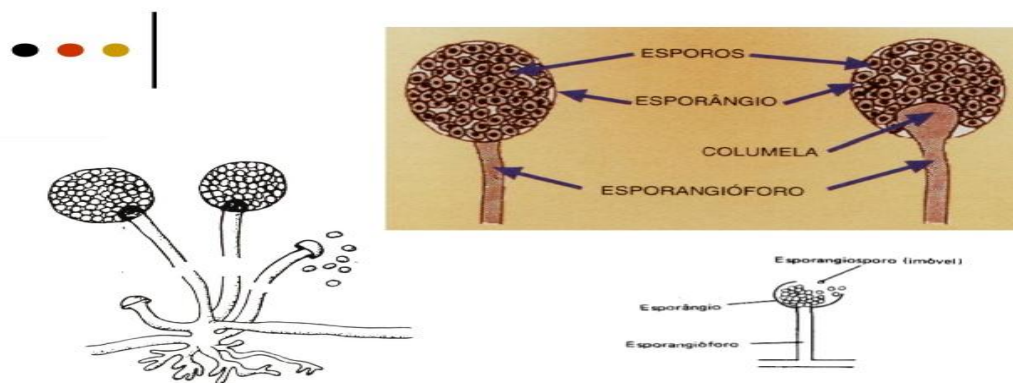
Os fungos da Ordem Mucorales se destacam como produtores de compostos em processos biotecnológicos industriais como: enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos, ácidos graxos, antibióticos, conservantes dentre outros. Temos como exemplo a *Chonephora*, *Mycotipha*, *Cunningamella*, *Mortierella*, *Syncephalastrum* e *Radiomyces*, que compreende exemplares de gêneros de grande interesse econômico, pois esses fungos são utilizados pelas indústrias por sintetizarem produtos industriais importantes como ácidos, etanol e enzimas. Outros ainda capazes de produzirem precursores de corticóides, como por exemplo o hormônio cortisona. Esse potencial econômico-industrial significativo é devido a sua capacidade em resistir a variadas condições ambientais, referentes à sua atividade fisiológica, bioquímica e genética (DUBE, 1978., TOMBS, 1982., GRIFFIN, 1994., ALEXOPOULOS et al., 1996., CARLILE, 1996., PUTZKE et al.,2004).

O gênero *Cunninghamella* contém espécies de importância na micologia médica e em processos biotecnológicos. *Cunninghamella* é um fungo filamentoso encontrado em solo e de material vegetal, particularmente em Mediterrâneo e zonas subtropicais. Também foi recuperado a partir de material de animal, queijo e castanha do Brasil (LARONE; 1995; S-T GERMAIN, SUMMERBELL., 1996., SUTTON et al., 1998., ASHA,VIDYAVATHI., 2009).

Os fungos filamentosos da ordem Mucorales, como *Mortierella* sp., *Cunninghamella echinulata*, *Mucor rouxii*, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, são mais profundamente estudados para a produção de ácidos graxos poliinsaturados.

A *Cunninghamella* caracteriza-se por hifas hialinas septadas (zigomicetes) e pela produção de sporangioforo característico do gênero. O sporangioforo termina numa vesícula globosa ou piriforme que da origem a sporangiola globosa ou ovoide (figura3).

Figura 3. Morfologia do fungo *Cunninghamella*.



Fonte: <http://pt.slideshare.net/gildocrispim/aula-11-fungos/2015>.

O solo é considerado um dos principais habitats para população e microorganismos com potencial biotecnológico e dentre estes, encontram-se os fungos da classe Zygomycetes, com destaque para os da ordem Mucorales do gênero *Cunninghamella* (ANDRADE et al., 2015).

Fungos oleaginosos são muitas vezes apreciados na produção de óleo de célula única, rico em ácidos graxos, quer na fermentação submersa ou em sistemas de fermentação em estado sólido. A economia destes bioprocessos, se tornar mais favorável quando substratos são utilizados como fontes de carbono ou nitrogênio (AGGELIS et al., 1995., CERTIK et al.,1993).

Os fungos foram agrupados em um único reino, Reino Fungi, por Whittaker em 1969, onde se procurou reunir todos os fungos com características típicas, que agrupa os fungos com base em estudos de biologia molecular. O gênero *Cunninghamella* contém atualmente 14 espécies, destacadas a seguir na tabela 2 (UNIPROT CONSORTIUM, 2010., ZHENG., CHEN, 2001., ASHA., VIDYAVATHI, 2009., LUSTOSA, 2011).

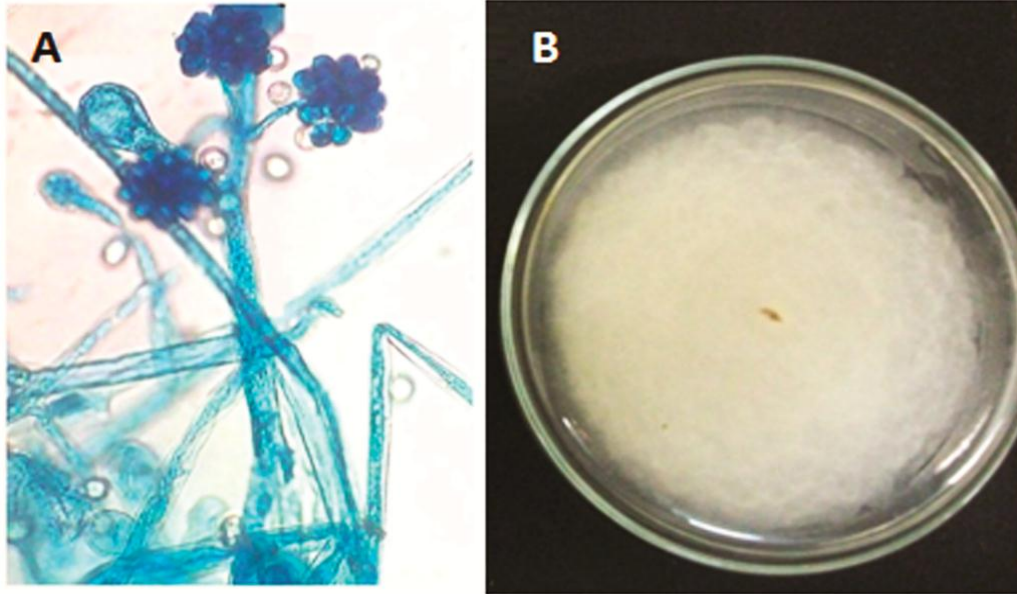
Tabela 2. Gênero e espécie do fungo *Cunninghamella*

GÊNERO	ESPÉCIE
<i>Cunninghamella</i>	<i>bainieri</i> ,
<i>Cunninghamella</i>	<i>bertholletiae</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>binariae</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>blakesleeana</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>clavata</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>echinulata</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>elegans</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>homothallica</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>intermedia</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>multiverticillata</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>phaeospora</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>polymorpha</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>septate</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>vesiculosa.</i>

1.3.6.1 *Cunninghamella echinulata*

Cunninghamella echinulata, é conhecida por acumular altas concentrações do ácido gama linolênico um ácido graxo essencial havendo vários papéis importantes, dentre eles, a formação de prostaglandina. Seu uso é indicado no tratamento de tensão pré-menstrual, osteoporose, processos inflamatórios e na pressão sanguínea alta (SHAW, 1965., KENNEDY, 1993., WYNN et al., 2001., SILVA et al., 2003., AHMED et al., 2006., JEENOR et al., 2006., CERTIK et al., 2006).

A capacidade oxidante e redutiva de micro-organismos, especialmente fungos, é bem conhecida há muito tempo e são utilizadas em reações preparativas. Entre os fungos da espécie *Cunninghamella* têm a capacidade de metabolizar uma ampla variedade de xenobióticos de forma semelhante aos sistemas de enzimas de mamíferos (KEUM, LEE, KIM, 2012., AMADIO, MURPHY, 2012., ZHANG et al., 2012).

Figura 4. *Cunninghamella echinulata*

Fonte: SILVA. N. R. A, 2014

A – Morfologia do gênero *Cunninghamella echinulata*.

B – *Cunninghamella echinulata* inoculada no meio sabouraud.

O crescimento da colônia tem uma aparência aveludada com uma coloração branca, como o contrário da colônia. A microscopia apresentou hifas sem septo, muitas vesículas e esporóforos simples e curtos; suas características podem ser observadas na (figura 4 A, B).

1.3.7 CAATINGA

A região semi-árida apresenta grande parte da sua extensão (aproximadamente 980.133,08 km²) recoberta pelo bioma Caatinga, com abrangência de 734.478 km², o qual apresenta como característica principal a ocorrência de déficit hídrico (Medeiros, et al., 2012., IBGE, 2013., Silva, et al., 2013). Este é decorrente de uma série de fatores, dentre os quais pode se destacar a precipitação pluvial baixa que oscila entre 200 e 800 mm/ano com volume mau distribuídos no espaço e no tempo. A baixa precipitação quando associada à elevados índices de radiação e temperaturas resultam em uma demanda evaporativa alta, provocando estresse hídrico nas plantas, vindo a ser potencialmente agravado pelas mudanças nos padrões atmosféricos de larga escala (Souza et al., 2015). O bioma Caatinga destaca-se por apresentar espécies apenas encontradas aqui no Brasil e com características únicas de tolerância ao estresse hídrico. Apesar disso, ainda é pouco estudado e já foi

intensamente modificado (Casteletti et al., 2004., Souza et al., 2015., BORGES et., 2016).

Figura 5. Caatinga de Pernambuco



Fonte: MELLO, 2015.

A Caatinga é a mais importante região natural do Nordeste brasileiro, ocupando aproximadamente 11% do território nacional, com um enorme potencial para conservação de serviços ambientais, uso sustentável de recursos e bioprospecção (BRASIL 2013., AMORIM et al., 2016).

Caracterizada como o único bioma com domínio exclusivo do Brasil, a Caatinga cobre grande parte da área do semi-árido, e está localizada na região Nordeste do país, e em parte do estado de Minas Gerais. O bioma possui a maior área remanescente de floresta tropical seca do mundo (MILES, 2006). A vegetação é constituída de estrato arbóreo e arbustivo caducifólio, em coexistência com estrato herbáceo notadamente sazonal (SÁ et al., 2004., GONZALEZ, 2015).

O solo armazena organismos vivos e proporciona altas taxas metabólicas que ocorrem em seu interior, por existirem raízes e a presença de decomposição da matéria orgânica. É nesta região, a rizosfera, onde existe uma maior atividade microbiana, em razão da presença de exsudatos e secreções radiculares, que representam a maior parte do carbono disponível para os micro-organismos. Sem a influência das raízes e da atividade da biota que funcionam de forma simbiótica, o solo pode ser considerado oligotrófico ou relativamente pobre em fontes de carbono disponíveis (ARAÚJO, MONTEIRO, 2007., BARROS, 2012.,PLANTE, STONE, MCGILL, 2014).

1.3.8 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS

A utilização de substratos agroindustriais na formulação de meios de produção de substâncias bioativas produzidas por micro-organismos tem sido uma das alternativas mais utilizadas nos últimos anos, devido à possibilidade de redução dos custos e de diversas substâncias bioativas (DAMASO et al., 2008; CHANDEL et al., 2012; SALIHU et al., 2012; MALDONADO, MACEDO, RODRIGUES, 2011., VATS, 2015., DAS MERCÊS PENHA, et al., 2016). Esses resíduos apresentam além de uma elevada quantidade de matéria orgânica, servem como fontes de proteínas, óleos essenciais, são passíveis de recuperação e aproveitamento, além de reduzirem o preço final da composição do meio de produção. A utilização adequada destes resíduos ajudam a minimizar problemas ambientais e energéticos, além disso, podem gerar bioprodutos com relevantes aplicações nas diversas áreas industriais e ambientais (MARQUES et al., 2014., ADIO et al., 2015., ELAIN et al., 2016).

Os processos industriais, no geral, além do produto de interesse, geram múltiplas saídas de outros materiais em forma de resíduos e emissões não incorporadas no produto final que geralmente são aceitas como efeito normal no processo de fabricação. Nos últimos anos tem se intensificado o aproveitamento de resíduos agroindustriais, e uma das formas de agregar-lhes valor é submetê-los a processos fermentativos para obtenção de produtos de maior valor agregado e ao mesmo tempo minimizar o seu despejo no meio ambiente. A produção de enzimas a partir de processos fermentativos tem sido vista como uma saída possivelmente sustentável para os resíduos agroindustriais (MÉLO et al., 2014).

A geração de resíduos na indústria é um problema crescente, sendo que muitos deles não possuem destinação adequada. Alguns desses resíduos possuem potencial para ser reutilizados em outros processos, a exemplo da produção de lipase, através de micro-organismos utilizando meios contendo resíduos agroindustriais (ORTENZIO et al., 2015).

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois, além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. A indústria de alimentos produz uma série de resíduos de alto valor de reutilização (Pelizer, Pontieri, Moraes, 2007).

1.3.8.1 ÓLEOS VEGETAIS RESIDUAIS

Segundo a empresa alemã especialista em oleaginosas denominada Oil World, no Brasil há uma produção anual de nove milhões de litros de óleo vegetal. Desses nove milhões 1/3 é aplicado em óleos comestíveis. Avalia-se que sejam consumidos anualmente no país 20 litros de óleo por pessoa, sendo não mais que 1% coletado e descartado de forma correta, o restante é destinado a rios e lagos degradando o meio ambiente (FARIA et al., 2007; MOURA et al., 2015).

O óleo comestível utilizado diariamente em residências, indústrias de alimentos e comércio é uma substância insolúvel em água e causa danos ambientais quando descartado diretamente no solo e nas redes de esgoto. Como o óleo apresenta menor densidade que a água, ele permanece na superfície do líquido, criando uma barreira que dificulta a entrada da luz e oxigênio, comprometendo a base da cadeia alimentar aquática, além de causar entupimento e transtornos no funcionamento das redes de esgoto. Quando em contato com o solo, ocasiona impermeabilidade, dificultando o escoamento das águas das chuvas e o acesso aos nutrientes necessários para a fauna e flora ali presentes (WILDNER, HILLING, 2012., THODE FILHO et al., 2013). A reparação deste solo para torná-lo novamente fértil e apto para cultivo é um processo oneroso e difícil (WILDNER, HILLING, 2012., COSTA et al., 2015).

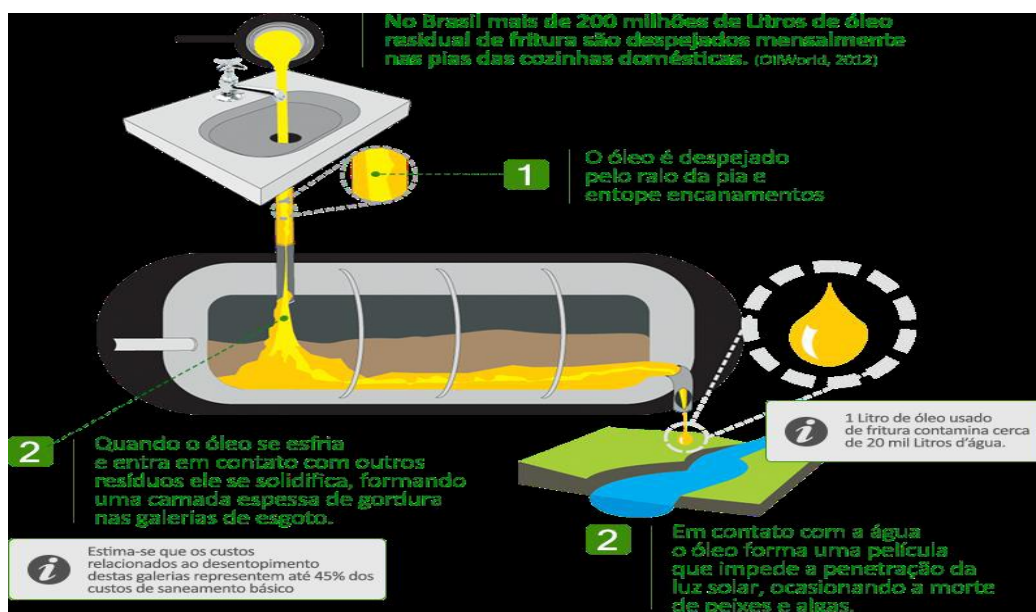
Existem dois diferentes processos de frituras de imersão, o contínuo e descontínuo. No contínuo o óleo é aquecido diversas vezes, ou seja, ele é resfriado e reaquecido. No descontínuo ocorre o aquecimento contínuo, para uma fritura única (OSAWA, GONÇALVES, MENDES, 2010., FREIRE, MANCINI-FILHO, FERREIRA, 2013). No processo de fritura contínua, acontece a reação de hidrólise com a formação de ácidos graxos livres que alteram as características sensoriais do produto e diminuem o ponto de fumaça do óleo/gordura de fritura. No processo de fritura descontínua, ocorrem reações de oxidação, hidrólise e polimerização, produzindo moléculas complexas e compostos voláteis, como a acroleína (responsável por um aroma desagradável no ambiente). Nesse estágio, há o aumento do ponto de fumaça e tais reações diminuem a eficiência e o caráter "nutricional" do óleo (EDER, 1999., TAVARES et al., 2007).

O óleo empregado repetidas vezes em frituras sofre deterioração rápida, pela elevada temperatura do procedimento, tendo como efeito a alteração de suas características físicas e químicas. O óleo se torna denso, grosso, tem sua acidez acrescida e desenvolve aroma desagradável, usualmente chamado de ranço, passando à categoria de exaurido, quando, então, não mais se presta para novas

frituras, em função de atribuir sabor e aroma desagradáveis aos alimentos, em virtude de contrair características químicas comprovadamente prejudiciais à saúde (REIS et al., 2007., WEYER, 2015).

O óleo utilizado demora catorze anos para ser absorvido pela natureza, e acarreta diversos danos quando é descartado incorretamente. A figura 6 representa o destino inadequado desse e alguns prejuízos que pode acarretar (FARIA et al., 2007; MOURA et al., 2015).

Figura 6. Biocoleta



Fonte: Biocoleta. 2012

1.3.8.2 RESÍDUO DE SORVETE

O sorvete é considerado um gelado comestível constituído basicamente por compostos estruturais: células de ar, cristais de gelo, gotículas de gordura e uma fase aquosa, na qual os polissacarídeos, proteínas, lactose, sais minerais, corantes e aromas são dispersos. (BAHRAMPARVAR, TEHRANI, RAZAVI, 2013., SILVA *et al.*, 2014., WARREN, HARTEL, 2014., PASSOS et al., 2016).

A legislação brasileira define o sorvete como um gelado comestível, sendo esse um produto alimentício obtido a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais, que garantam a conservação do produto no estado

congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo (ANVISA, 1999).

O sorvete é uma das guloseimas preferidas das crianças e adultos, principalmente nos dias mais quentes do ano. O que talvez não seja do conhecimento de todos é que o popular doce também é um alimento nutritivo e que desde 2002 ganhou uma data especial no calendário, 23 de setembro, início da Primavera é o Dia do Sorvete. A data, instituída pela Associação Brasileira das Indústrias de Sorvete – ABIS, é comemorada justamente para marcar o início das temperaturas mais quentes do ano no país, época que normalmente é acentuado o consumo de sorvetes (MAIA, PFÜLLER, 2015).

Figura 7. Resíduo de sorvete



Fonte: Próprio Autor

1.3.8.2.1 Composição nutricional

Do ponto de vista nutricional, o sorvete é um alimento quase completo, pois contém proteínas, açúcares, gordura vegetal e/ou animal, vitaminas A, B1, B2, B6, C, D, K, cálcio, fósforo e outros minerais essenciais numa nutrição balanceada. É um complemento alimentar de alto valor nutritivo, sem ser excessivamente calórico. Comparativamente, vale dizer que 100g de sorvete de creme têm 186 calorias, enquanto a mesma quantidade de pão francês tem 269 calorias (ESTANISLAU, 2006., MAIA, PFÜLLER, 2015).

1.3.8.2.2 Composição residual do sorvete

A gordura é o ingrediente mais importante no sorvete e normalmente constitui entre 28 e 38% dos sólidos totais na mistura, dependendo da formulação. A função da gordura na formulação de sorvetes é a de contribuir para o desenvolvimento de uma textura suave, melhorar o corpo do produto e aumentar a resistência à fusão (PEREDA, 2005., XAVIER, 2009).

Os principais ácidos graxos encontrados em todos os chocolates e nos produtos contendo chocolate são o palmítico, esteárico, oleico e linoleico (SUZUKI, 2009., TAVARES, 2011).

Dos ácidos graxos monoinsaturados, destaca-se o ácido oleico (18:1n-9), com quantidades que variam de 500,00 (light) a 2120,00 (normal) mg/100g de sorvete. As quantidades de ácidos graxos polinsaturados variaram de 40,00 mg (light) a 450,00 mg (normal), tendo como destaque para ácido linoléico (18:2n-6) (SUZUKI, 2009., TAVARES, 2011).

1.3.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELHAKEEM, M.A., ELSAYED, A.M., ALKHULAQI, T.A. New Colorimetric Method for Lipases Activity Assay in Microbial Media .**American Journal of Analytical Chemistry**, v.4, p.442-444, 2013.

ABOURASHED, E. A., CLARK, A. M., HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: an updated review. **Current Medicinal Chemistry**, v.6, p. 359-374, 1999.

AÇIKEL, U., ERAN, M., AÇIKEL, Y.S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food Bioprod. Proc.**, v. 8, p. 31-39, 2010.

ADIO, O. Q. et al. Production of lipases in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* F7-02 with agricultural residues. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. 6, p. 509, 2015.

ADRIO, J. L., DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, p. 117–139, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Portaria n.379, de 26 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 abr. 1999.

AGGELIS G, KOMAITIS M, PAPANIKOLAOU S, PAPADOPOULOS G. A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. I. Lipid accumulation during growth of *Mucor circinelloides* CBS 172-27 on a vegetable oil. *Grasas Aceites* 1995;46:169–73.

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), 2010.

AHMED, S. U. et al. Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid in submerged fermentation. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, 44 (2), 283-287, 2006.

ALENCAR, A. A. **Produção de bacitracina por *Bacillus licheniformis* utilizando meio alternativo à base de soro de leite**. Dissertação (Mestrado) – Desenvolvimento de processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 2011.

ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W., BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. Ed. New York: John Wiley & Sons, 869p. 1996.

AMADIO, J. , MURPHY C. D. Produção de metabólitos humanos do fármaco anticancerígeno flutamida via biotransformação em espécies e *Cunninghamella*.

AMORIM, L. D. M; SOUSA, L. O. F; OLIVEIRA, F. F. M; Ramiro Gustavo Valera CAMACHO, R. G. V; MELO, J. I. M. **Fabaceae na Floresta Nacional (FLONA) de Assú, semiárido potiguar, nordeste do Brasil**. <http://rodriguesia.ibri.gov.br> DOI: 10.1590/2175-7860201667108. *Rodriguésia* 67(1): 105-123. 2016. Acesso em 30 de março de 2016.

ANDRADE, C. J. et. al. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Hestia Citino Ciência Tecnologia inovação & Oportunidades**, v. 1, n. 1, p.30-36, 2012.

ANDRADE, M. V. R. F.; DEUSDARÁ. T. T; SCHEIDT, G. N; JÚNIOR, A. F. C. Isolamento, caracterização fenotípica e perfil de crescimento de cepas do fungo *Cunninghamella sp.* **Biota Amazônia**. Macapá, v. 5, n. 2, p. 58-64, 2015.

ANOBOBOM, C.D. et al., From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. **BioMed Research International**, ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. Biosci. Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007. Article ID 684506, 11 pages, 2014.

ASHA, S; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**; v.27, p.16-29.2009.

Avaliação da incorporação de galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* em sorvetes e comparação com estabilizantes comerciais. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, p. 275-282, abr-jun, 2016. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

BARATTO, C. M. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**. v. 11 n. 2, p. 15-28, 2011.

BARROS, M. et al. Efeitos de surfactantes na atividade catalítica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01. V Simpósio de Bioquímica e biotecnologia. Universidade Estadual de Londrina- Departamento de Bioquímica e Biotecnologia 2015.

BARROS, M., L. F. Fleuri and G. A. Macedo (2010). "Seed lipases: sources, applications and properties - a review." *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 27(1): 15-29.

BEISSON, F., TISS, A., RIVIÉRE, C; VERGER, R. Methods for Lipase Detection and Assay: A Critical Review, **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, p.133-153, 2000.

BERTOLDI, M. R. Biotecnologia moderna e desenvolvimento humano sustentável: uma composição possível. **Revista Iberoamericana de Filosofía, Política y Humanidades**, nº 33. Primeiro semestre de 2015. p. 211-227. ISSN 1575-6823 e-ISSN 2340-2199 doi: 10.12795/Araucária, 2015.

BISATTO, R. **Poliésteres via catálise enzimática heterogênea**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BORNSCHEUER, U. T. Methods to Increase Lipases and Esterases. **Currents Opinions Biotechnology**, 13, 543-547, 2002.

BORNSCHEUER, U.T. et al., Optimizing lipases and related enzymes for efficient application, **Trends in Biotechnology**, v.20, no.10, p.433-437, 2002.

BOTTCHER, D. and BORNSCHEUER, U.T.(2010) Protein engineering of microbial enzymes. *Curr. Protoc. Prot. Sci*; **66**, 26.7.1-26.7.14.

BRASIL - Ministério do Meio Ambiente. 2013. Bioma Caatinga. Disponível em <http://www.mma.gov.br/publicacoes/biomas/category/61-caatinga>. Acesso em 30 de março de 2016.

BUENROSTRO-FIGUEROA, J. et al. Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation. **Food and Bioproducts Processing**. v. 92, n. 4, p. 376-382, 2014.

BULL, A. T; WARD, A. C; GOODFELLOW, M. Search and Discovery strategies for biotechnology: the paradigma shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573-506, 2000.

CARLILE, M. J. & WATKINSON, S. C. - **The Fungi**.3rd Edition. Academic Press Ltd. Londres.482, p, 1996.

CARMINATI, H. B; PIN, T. C; T; MARTINS, M. O. D. **ANÁLISE COMPARATIVA DA PRODUÇÃO DE LIPASE A PARTIR DE FRUTOS NECROSADOS**. COBEQ – CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XX, 2014, Florianópolis – SC.

CARVALHO et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentração de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v.26, n. 1, p.75-80, 2008.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CERQUEIRA, V. S; COSTA, J. A. V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescada em solos impactados utilizando surfactantes químico e biólogo. **Química Nova**, v. 32, n. 2. 394-400, 2009.

CERTIK M, SEREKE B, SAJBIDOR J. Lipid production and fatty acid composition of selected strains belonging to Mucorales. *Acta Biotechnol* 1993;13:193–6.

CERTIK, M.; SLAVIKOVA, L.; MASRNOVÁ, S.; SAJBIDOR, J. Enhancement of nutritional value of cereals with γ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, 44 (1), 75-82, 2006.

CHANDEL, A.K. et al., Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.87, no 01, p.11-20, 2012.

COBEQ – CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XI, 2015, Campinas – SP. **Utilização de resíduos provenientes do milho na produção de celulasas pelo fungo fsde16 em cultivo semissólido** Campinas – SP, 2015. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0321-26015-177419.pdf>> Acesso em: 05/ mai. / 2016.

COBEQ – CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XX, 2014, Florianópolis – SC. **Modificação química do amido extraído do resíduo do processamento agroindustrial da manga**. Florianópolis – SC, 2014. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0321-26015-177419.pdf>> Acesso em: 03/ jun. / 2015.

COBEQ – CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XX, 2014, Florianópolis – SC. **Avaliação do resíduo agroindustrial de acerola para produção de celulases por fermentação em estado sólido** Florianópolis – SC, 2014. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0321-26015-177419.pdf>> Acesso em: 03/ jun. / 2015.

COLLA, L.M., REINEHR, C.O., COSTA, J.A.V. Aplicações e produção de lípases microbianas. Revista CIATEC-UPF, v.4, n.2, p.1-14, 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 29 ago. 2014.

COSTA, T. M; SPERB, J. G. C; RONCHETI, A. L; BOTELHO, T. K. R; SELL, T. M; BERTOLI, S. L; TAVARES; L. B. B. Avaliação da velocidade específica de crescimento radial de fungos em óleo vegetal residual. REA – Revista de *estudos ambientais* (Online) v.17, n. 2, p. 29-40, 2015.

CRUZ, A.C.R. et al. Fungos conidiais na caatinga: espécies associadas ao folheto. **Acta Bot. Bras.** V. 4, n. 23, p. 999-1012, 2009. Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, 506p.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J.L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.657-663, 2000.

DAS MERCÊS PENHA, E. et al. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. **Ciencia rural**, v. 46, n. 4, p. 755-761, 2016.

DUBE, H.C. – A Textbook of Fungi, Bacteria and Viruses. **Vikas Publishing House Put Ltd.**, 239 p, 1978.

EDER, K. The effects of a dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats. *Lipids*, Champaign, v.34. n.7, p.717-725, 1999.

ELAIN, A. et al. Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 1-5, 2016.

ESTANISLAU, Marcelo, 2006. Novas normas da Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Disponível em< [http:// www.saboreseletras.com.br](http://www.saboreseletras.com.br)> (Acesso em abril de 2016).

FAHEIRA, J. G. S. Produção de celulase por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais. Dissertação (Mestrado de Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza CE. 75f, 2012.

FAO. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. O que você precisa saber sobre a fome em 2012.** Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acesso em: 3 out. 2014.

FARIA et al. **A Utilização de Óleo Vegetal Refinado como Combustível - Aspectos Legais, Técnicos, Econômicos, Ambientais e Tributários.** Centro de Estudos da consultoria do Senado. Brasília, 2007.

FARIA et al. A Utilização de Óleo Vegetal Refinado como Combustível - Aspectos Legais, Técnicos, Econômicos, Ambientais e Tributários. Centro de Estudos da consultoria do Senado. Brasília, 2007.

FARIAS, T. N; GARCIA, T. F; CARVALHO, Í. F; ALBUQUERQUE, J. P. **AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CMC₅₀ (ENDOGLUCANASE) DE FUNGO FILAMENTOSO PRÉ- SELECIONADO**. Anais da Jornada Científica – Integração: Educação, Sociedade e Tecnologia. Tangará da Serra – MT, 16 a 18 de agosto de 2015.

FERNANDES, M. L. M. et al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FERREIRA, G. L. **Substituição de farelo de trigo pelo farelo de casca de milho sem água de maceração de alimentos completos para gatos**. 2013. 60f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Lavras, MG 2013.

FORTUIN, F. T. J. M. **Aligning innovation to business strategy: combining cross-industry and longitudinal perspectives on strategic alignment in leading technology-based companies**. 2006.189f. Tese (Doutorado). Wageningen University and Research Center, Wageningen University, Wageningen, 2006.

FREIRE, G. D. M.; CASTILHO, F. L. Lipases em biocatálise. In: Bon. et al. (org). Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro, Interciência, 300 p., 2008.

FREIRE, P.C.M., MANCINI-FILHO, J. FERREIRA, T.A.P.C. Principais alterações físico-químicas em óleos e gorduras submetidos ao processo de fritura por imersão: regulamentação e efeitos na saúde. Rev. Nutr. vol.26 no.3 Campinas May/June 2013.

GEISSELER, D et al.,. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review, **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, no.12, p.2058 - 2067, 2010.

GEMA H, KAVADIA A, DIMOU D, TSAGOU V, KOMAITIS M, AGGELIS G. Production of -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 58:303–7.

GIROTO, J. M; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n. 10, 2001.

GONÇALVES, G. A. F. **Produção de lipases extracelular por levedura em cultivo submerso**. 2007. 64 p. Monografia (Especialização em Microbiologia)–Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GONZALES, H. B. et al. Desenvolvimento sustentável para o resgate da cultura do cacau baseado no aproveitamento de resíduos. **Interfaces Científicas – saúde e Ambiente**, Aracaju Se, v. 1, n. 2, p. 41-52, 2013.

GONZALEZ, C. R. **Modelagem dos estoques e fluxos de carbono no sistema solo-planta em áreas de caatinga densa do semiárido Pernambucano**. 2015. 39f. Dissertação (mestrado) Universidade federal de Pernambuco departamento de energia nuclear. PE. 2015.

GRIFFIN, D. H. - **Fungal Physiology**. John Willey & Sons Incorporation Publishers.458 p, 1994.

GUIMARÃES, I. C. O. et al. Identificação de *Aspergillus sp.* toxigênico em arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Lavras Mg, v. 30, n.8, p. 60-62, jan. 2010.

HASAN, F., SHAH, A.A., HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v.27, p.782-798, 2009.

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

HENN, J. D. Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves. Disponível em: www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/aditiv_enzimas.pdf. Acessado dia 18/11/2007.

HONDE, A., KADEMI, A., LEBLANC, D. Lipases and their applications: an overview. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.118, no.1-3, p.155-170, 2004.

HONG, S. B. et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, New York. v. 97, n. 6, p.1316-1329, 2005.

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/ba/Induced_fit_diagram_pt.svg/648px-Induced_fit_diagram_pt.svg.png. Acessado em 16/02/2017.

IBGE ; GIONGO, V. et al. Carbono no Sistema Solo-Planta no Seminário Brasileiro. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 39, p. 235-251, 2012.

JAEGER, K. E. et al. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa* **Federation of European Biochemical Societies**, v. 332, n. 1/2, p. 143-149, 1993.

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

JAEGER, K.L.; REETZ, M. T. – Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, **TIBTECH**, v.16, p.396-403, 1998.

JAYAPRAKASH, A.; EBENEZER, P. Investigation on extracellular lipase production by *Aspergillus japonicus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*. *Indian Journal of Science and Technology*, v. 3, n. 2, p. 113-117, 2010.

KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 3, p. 1147-1162, 2014.

KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 3, p. 1147-1162, 2014.

KENNEDY, M. J., READER, S. L., DAVIES, R. J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. **Biotechnology and Bioengineering**. v.42, p 625-34, 1993.

KEUM, Y.S., LEE, Y.H., KIM J. H. Metabolismo do metoxiclor por *Cunninghamella elegans* ATCC36112. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57 : 7931-7937. Doi: 10.1021 / jf902132j, 2012.

KIRK, O; BORCHERT, T. V; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345 – 51, 2002.

KOBLITZ, M.G.B; ALENCAR, S.M. **Bioquímica de alimentos**: teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242p.

KUMAR, A. et al. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1, 2016.

KUMAR, V.; MARÍN-NAVARRO, J.; SHUKLA, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 1-10, 2016.

LADEIRA, S. A. et al. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de protease pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: Otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**. v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

LARONE DH. Medically important fungi - a guide to identification. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 1995.

Letras de Biotecnologia. 2011; 33 : 321-326. Doi: 10.1007 / s10529-010-0425-3, 2012.

LIMA, B.F. et al. Seleção de Meios de Produção de Lipase por Amostras de *Aspergillus* sp Isoladas da Caatinga de Pernambuco. **Exacta**. v. 7 n. 1, p.147-157, 2014.

LIMA, V.M.G. et al., Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*, **Food Technology and Biotechnology**, v.41, no.02, p.105-110, 2003.

LUSTOSA, K. R. M. D. **APLICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA β -GLICOLISAÇÃO DA ENTACAPONA CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**. Dissertação (mestrado). Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, 2011.

MACEDO, G. A; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 115-119, 1997.

MAIA, M. C; PFÜLLER, E. E. Produção de gelados comestíveis na indústria de sorvetes e picolés gaúcho – SANANDUVA / RS. RAMVI, Getúlio Vargas, v. 02, n. 04, Jul./Dez. 2015.

MALDONADO, R.R., MACEDO, G.A., RODRIGUES, M.I. Lipase production using microorganisms from different agro-industrial by products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.4, n.1, p.108-115, 2011.

MARQUES, T.A. et al.,. Utilization of dairy effluent as alternative fermentation medium for microbial lipase production. **Romanian Biotechnological Letters**, v..19, n 1, p.9042-9050, 2014.

MATIAS, F; VIEIRA, P. I. L; FONTENELE, H.A. avaliação do perfil de Investimentos em Biotecnologia no Brasil. **Cadernos de Prospecção**. vol.7, n.3, p.314-323, 2014.

MESSIAS, Josana Maria et al. Microbial lipases: Production, properties and biotechnological. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n.02, p. 213-234, 2011.

MILES, L.; NEWTON, A.C ; DEFRIES, R.S; RAVILIOUS , C.; MAY,I.; BLYTH, S.; KAPOS,V.; GORDON J. E. 2006. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography* v. 33, p.491–505.

MONTEIRO, M. C. P. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MONTEIRO, V. N; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Rev. proc. Químicos*. Jan./Jun. 2009.

MOURA, B. H. G; ARAÚJO, F. S; ARAÚJO, H. R. R; SANTOS, K. V; PADILHA, M. F. P; SOUZA, T. R. P. S; MACEDO, J. M; AMARAL, C. Small entrepreneurs of frying oil disposal that act in city centre of porto velho, rondônia. *SOUTH AMERICAN Journal of Basic Education, Technical and Technological*, v.2, N.2, p.34-44, 2015.

MUKHOPADHYAY, M. et al. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Appi Biochem Biotechnol**, p. 1 66: 486-520, 2012.

MUKHTAR, H., HAQ, I. Comparative Evaluation of Agroindustrial Byproducts for the Production of Alkaline Protease by Wild and Mutant Strains of *Bacillus subtilis* in Submerged and Solid State Fermentation. **The Scientific World Journal**. v. 2013, 2013.

NAJAFPOUR, G. D et al. Bioconversion of cheese whey to methane in na upflow anaerobic packed bed bioreactor. **Cherm. Biochen.Eng. Q**; 24 (1): 111-117, 2010.

NASCIMENTO, M.B. et al. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de Tanase por *aspergillus* sp isolados do solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil. **E-xacta**. v. 7 n. 1, p. 95-103, 2014.

NIAZ, M. et al. Extracellular Lipase Production by *Aspergillus nidulans* (MBL-S-6) under Submerged Fermentation. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 16, n. 3, p. 536-542, 2014.

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

OLIVEIRA, A. N., OLIVEIRA, L. A., ANDRADE, J. S., CHAGAS-JUNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

ORLANDELLI, R. C; SPECIAN, V; FELBER, C. A; ALENCAR, J. P. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Sabios: Ver. Saúde e Bio**, v.7, n. 3, p. 97 – 109, 2012.

ORTENZIO, Y. T; AMARAL, G. G; ALMEIDA, S. S; OLIVEIRA, E. C. A. M. Cultivo de Microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. **Bioenergia**. N. 1, p. 58-65, jan./jun. 2015.

OSAWA, C.B., GONÇALVES, L.A.G., MENDES, F.M. Avaliação dos óleos e gorduras de fritura de estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas/SP: As boas práticas de fritura estão sendo atendidas? **Revista Alimento e nutrição**. V. 21, nº 21, p.47-55, jan/mar. 2010.

PADILHA, Giovana Silva et al . Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 31, n. 1, Mar. 2011 .

PALUDO, C. R. **Biotransformação da β -lapachona culturas microbianas: uma alternativa para estudos de metabolismo *in vitro***. 2013. 200f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2013.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3636, p. 1-4, 2002.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**. v. 35, n.10, p.1153-1169, 2000.

PASSOS, A. A. C; SÁ, D. M. A. T; MORAIS, G. M. D; CHACON, L. S. S; BRAGA, R.C.

PELIZER, L. H; PONTIERI, M. H; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *J. Technol. Manag. Innov.* 2007, Volume 2, Issue 1.

PENHA, E. M; VIANA, L. A. N; GOTTSCHALK, L. M. F; TERZI, S.C; SOUZA, E. F; FREITAS, S. C; SANTOS, J. O; SALUM, T. F. C. Agro-industrial residues utilization of palm oil for lipase production by *Aspergillus niger*. **Cienc. Rural** vol.46 no.4 Santa Maria Apr. 2016 Epub Dec 22, 2015.

PENNA, J. B; CANOLA, B. C. A evolução da biotecnologia e da engenharia genética frente às implicações ambientais, ao biodireito e aos direitos fundamentais.

PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília faculdade de Ceilândia – FCE/ UNB curso de Farmácia, 2014. **R. Fac. Dir. UFG**, v. 33, n. 2, p. 74-88, jul./dez. 2009.

PLANTE, A. F., STONE, M. M., MCGILL, W. B. The Metabolic Physiology of Soil Microorganisms. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, p. 245, Philadelphia, PA. USA. E. Eldor A. Pau. 2014. Disponível em: <https://books.google.com.br> Acesso em 02. 09 de 2014. ISBN 978-0-12-415955-6.

PUTZKE, J. ; PUTZKE, M. T. L. Os **Reinos dos Fungos**, 2ª edição Edunisc, Santa Cruz do Sul. p168, 2004.

QIN, X. L. et al. Fatty acid specificity of T1 lipase and its potential in acylglycerol synthesis. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1614-1621, 2014.

RAMOS, S. M. S. **Isolamento e seleção de fungos de solo para biodegradação do pesticida organofosforado clorpirifós**. 2014. 58 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife, PE, 2014.

REINEHR, C. O et al. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*

através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise, V. 37, No. 3, p. 454-460, 2014.

REIS, M. F. P; ELLWANGER, R. M; FLECK, E. **Destinação de óleos de fritura**. In: 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Anais. ABES: 2007, Belo Horizonte.

RIGO, E. **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja**. 2009. 188f. Tese de (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC 2009.

ROCHA, I. S. et al. Estudo Prospectivo Relativo a depósitos de Patentes relacionadas às Enzimas Peptidases. **Cadernos de Prospecção**. Vol.8, n.1, p.123-132, 2015.

RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**. v. 111, n. 4, p. 877-892, 2011.

SÁ, I.B; RICHÉ, G.R; FOTIUS, G.A. As paisagens e o processo de degradação do semiárido nordestino In: MMA-UFPE (Ed.) Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília: MMA-UFPE, 2004. p.17-36.

SAID, S; PIETRO, R. – Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico, Eventos, 2002, 122 p.

SALIHU, A. et al., Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v.58, p.36–44, 2012.

SALUM, T. F. C. et al. Ester synthesis by immobilized Burkholderiacepacia lipase. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2007.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes, **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.895-906, 2002.

SANDHYA, C, et al; Comparative evaluation of protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and other extrolites. *Studies in Mycology* (Baarn) v. 28. n. 1. p. 46 – 54. 2011.

SANTOS, F. S; MEDEIROS, S. R. A. Prospecção tecnológica sobre o uso do farelo de trigo na alimentação humana. **GEINTEC**. São Cristóvão/SE – 2016. Vol. 6/n. 1/ p.2861-2873 2861.

SANTOS, M. H. R; CASTRO, L. A; BITTENCOURT, J. V. M. Avaliação da qualidade microbiológica em gelados comestíveis comercializados na região dos Campos Gerais – PR. 8º Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais. 2013.

SANTOS, R. R. et al. 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, p. 561-566, 2014.

SAXENA et al., Potential pancreatic lipase inhibitory activity of an endophytic *Penicillium* species - *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **Volume 30, Issue 1**, 2015.

SBARDELOTTO, M et al. **Estudo da produção e extração de lipase microbiana utilizando torta de canola como substrato**. ANAIS do SEPE – Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS ISSN 2317 – 7489 Vol. IV (2014).

SILVA, C.F. Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção flavi: Uma revisão. **Revista Ifes Ciência**. v.1, n.1, 2015.

SILVA, D. P. et al. Potencial de Produção de lipases e Fosfolipases Por *Trichoderma harzianum* para a Indústria de Alimentos.

SILVA, G. S.; BRUNO, L. M.; CASTRO, H. F., Seleção e Imobilização de Fungos. Departamento de Engenharia Química – Lorena – SP, 2009.

SILVA, H. N. L.; LIMA, R. C.; PINOTTI, L. M. **PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Bacillus megaterium***. X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica, v. 1, nº 1. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Universidade Severino Sombra Vassouras – RJ – Brasil. Dezembro de 2014.

SILVA, T.L.; PINHEIRO, H.M.; ROSEIRO, J.C. Stress-induced morphological and physiological changes in γ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch and continuous cultures. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, 32 (7), 880- 888, 2003.

SILVEIRA, J. M. F. J. et al. Caracterização da trajetória tecnológica da biotecnologia agrícola por meio de redes de patentes. **Gestão & Políticas Públicas**, Campinas, n. 2, p.163-187, 2011.

SILVEIRA, J; BORGES, I. Um panorama da biotecnologia moderna. In: SILVEIRA, J; POZ, M; ASSAD, A. **Biotecnologia e recursos genéticos: desafios e oportunidades para o Brasil**. Campinas:Unicamp, 2004.

SINGH, A.K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, no. 02, p.486-520, 2012.

SPERB, J. G. C; COSTA, T. M; VAZ, D. A; VALLE, J.A. B; VALLE. R. S. C; TAVARES, L. B. B. Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **ENGEVISTA**. V. 17, n. 3, p. 385-397, setembro 2015.

ST- GERMAIN G, SUMMERBELL R. Identifying filamentous fungus - a clinical laboratory handbook. 1st ed. Belmont, California: Star Publishing Company; 1996.

STROPARO, E.C.et al.Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico.

SUSEELA LANKA, et. al. Optimization of Process Variables for Extracellular Lipase Production from *Emericella nidulans* NFCCI 3643 Isolated from Palm Oil Mill Effluent (POME) Dump Sites Using OFAT Method, **Research Journal of Microbiology**, v.10, n.02, p.38-53, 2015.

SUTTON DA, FOTHERGILL AW, RINALDI MG, editors. Guide to clinically significant fungi. 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998.

SUZUKI, R.M. Composição química e quantificação de ácidos graxos em chocolates, achocolatados em pó, bebidas achocolatadas e sorvetes de chocolate. Universidade Estadual de Maringá, 140p, 2009.

TAVARES, I. M. C. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em sólido estado por *Aspergillus niger* a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de cróton grewoides.**

2012. 67 f. Dissertação (Mestrado do Curso de Engenharia em Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga Bahia, 2012.

TAVARES, L. L. P. et al. Seleção de diferentes meios para produção de lipase a partir de *Bacillus licheniformi*. **EXACTA**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 309-316, 2011.

TAVARES, M. et al. Avaliação da qualidade de óleos e gorduras utilizados para fritura no comércio da região metropolitana da Baixada Santista, estado de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 40-44, 2007.

THODE FILHO, S; SANTOS, A. S. S; ALMEIDA, T. M; SILVA, E. R. Tecnologia ambiental aplicada ao gerenciamento e processamento do óleo vegetal residual no estado do Rio de Janeiro. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**. v.15, p.3026-3035, 2013.

TOMAZ, R. M. A. G. **Avaliação de fungos com potencial de degradação de Diuron e Pyriothobac-sodium**. 2003. 134f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia de Química, Campinas.

TOMBINI, J. **PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA A PARTIR DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE SOJA**. 2015. 74f. Dissertação (mestrado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco 2015.

TOMBS, M.P. & BLAKE, G.G. - Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 700, p. 81-89, 1982.

TORRES, J. A. **Oxidação enzimática de compostos fenólicos em água residuária do processamento do café**. 2014. 108f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Lavras, MG 2015.

TREICHEL, H.; et al., A review on microbial lipases production, **Food Bioprocess Technology**, v.3, p.182-196, 2010.

ÜLKER, S. et al. New lipase assay using Pomegranate oil coating in microtiter plates. **Biochimie**, v. 120, p. 110- 118, 2016.

WACKETT, L. P. Broad specificity microbial enzymes. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 188-189, 2015.

WEYER, M. Resíduos sólidos domésticos: estudo de caso do óleo vegetal residual no bairro morada da serra cuiabá/Mt. **Revista geonorte**, v.6, N.24, p.62-80, 2015.

WILDNER, L. B. A; HILLING, C. Reciclagem de óleo comestível e fabricação de sabão como instrumentos de educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. REGET/UFMS, v.5, p.813-824, 2012.

WOLSKI, E; **Estudo Comparativo da Produção de Lipase por Fermentação Submersa Utilizando *Penicillium* sp. Livre e Imobilizado**. Dissertação (mestrado). URI-Erechim, 2008.

WYNN, J. P; HAMID, A. A; LI, Y; RATLEDGE, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. **Microbiology**, New York, 147, 2857-2864, 2001.

XAVIER, L. P. S. Processamento de sorvete. Monografia (graduação) Curso de Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade federal de pelotas. 2009.

ZHANG D, FREEMAN J. P, SUTHERLAND J. B, WALKER A.E, YANG Y, CERNIGLIA CE. Biotransformação de clorpromazina e metdilazina por *Cunninghamella elagens* Microbiologia Aplicada e Ambiental. 1996; 62 : 798-803. 2012.

CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido à revista Brazilian of Journal Microbiology

Produção de lipase por *Cunninghamella echinulata* (UCP 1308) por fermentação submersa em diferentes meios de cultura

Paloma S. Cruz de Sales ; Felipe André Pereira da Cunha Amaral; Tainã Crisia de Souza Fonseca; Carlos Alberto Alves da Silva

Universidade Católica de Pernambuco, Coordenação Geral de Pós -Graduação, Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 50050-900 Recife, PE, Brasil

Resumo

As lipases são enzimas capazes de realizar a hidrólise de ácidos graxos, o que é muito importante nas indústrias. Podem ser produzidas por animais, vegetais e micro-organismos. Várias maneiras de cultivo desta enzima têm sido desenvolvidas, modificando os tipos de micro-organismos produtores, tipos de substrato e processos de fermentação. Dentre os fungos capazes de produzir lipase, a *Cunninghamella echinulata* se destaca por se desenvolver e produzir a enzima em condições adversas. Frequentemente, uma das formas de aproveitamento de resíduos agroindustriais tem sido a produção dessa enzima que é de interesse industrial, seja para baixar os custos de produção, seja para dar utilidade a tais rejeitos. Neste trabalho foi estudada a produção de lipases a partir de cepas do fungo *Cunninghamella echinulata*, utilizando 4 meios diferentes para produção de lipase, usando as amostras, denominadas UCP 060, UCP 1299, UCP 1308 isoladas da Caatinga de Pernambuco. Os ensaios de produção ocorreram a 150 rpm, 28°C, durante 168 h. Os resultados evidenciaram que o melhor meio testado foi o meio 4, com a amostra UCP 1308, com uma produção de 5,84 U/mL de lipase.

Palavras-chave: Lipase. Enzimas microbianas. *Cunninghamella echinulata*

Introdução

Enzimas microbianas são muitas vezes mais úteis do que as enzimas derivadas de plantas ou animais por causa da grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, os rendimentos elevados, facilidade de manipulação genética, e rápido crescimento de micro-organismos em meios baratos. Enzimas microbianas também são mais estáveis do que as suas enzimas de plantas e animais e a sua produção é mais conveniente e mais segura (SILVA, IZABELI, GUSMÃO, 2014, MESSIAS et al ., 1999).

Enzimas lipolíticas provenientes de micro-organismos apresentam um grande valor para aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades e facilidade de produção em grande escala, sendo um dos grupos mais utilizados no setor industrial (MILETIC et al., 2012). Entretanto, do ponto de vista de aplicação industrial, as lipases na forma livre não podem ser reutilizadas, não sendo economicamente viáveis em alguns processos devido à necessidade de grandes quantidades de enzima (SOUZA et al., 2015).

As lipases (EC 3.1.1.3) são um grupo heterogêneo de proteínas encontradas em inúmeras espécies de plantas, micro-organismos e animais, sendo descritas como triacilglicerol lipase. Atuam diretamente sobre ligações ésteres das carboxilas dos triglicerídeos, hidrolisando principalmente os de cadeia longa (cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono) liberando ácidos graxos e glicerol (BHUTANI et al., 2015, MESSIAS et al., 1999).

As lipases (EC 3.1.1.3) constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas (BENJAMIN, PANDEY, 1998). As lipases têm sido isoladas a partir de muitas espécies de plantas, animais, bactérias, fungos e leveduras. As enzimas de microbianas são utilizadas em diversas indústrias, tais como indústrias de laticínios, alimentos, detergentes, têxteis, farmacêuticas, de cosméticos e de biodiesel, e na síntese de produtos químicos finos, agroquímicos e novos materiais poliméricos (SANDOVAL, MARTY, 2007., JAEGER, EGGERT, 2002). A investigação sobre as lipases microbianas tem aumentado devido ao seu grande potencial comercial (SAXENA, 1999., HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

Cunninghamella é um dos fungos mais comuns dentro da Ordem Mucorales. As espécies deste gênero são geralmente encontradas no solo, exibem colônias com rápido crescimento, com coloração que varia entre branco e cinza, esporangióforos eretos, ramificados e a extremidade de cada ramificação forma vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangióolos. Micélio não septado quando jovem, torna-se septado com a idade da cultura (ALEXOPOULOS, MIMS, 1996., LOPES, VEIGA, MORAES, 2015). O trabalho realizado teve como objetivos a seleção de amostras de *Cunninghamella echinulata* produtoras de lipase em meio sólido e a produção da enzima por fermentação submersa em diferentes meios de produção.

Material e Métodos

Micro-organismos

Foram utilizados 3 amostras de fungos filamentosos do gênero *Cunninghamella echinulata*, isolados da caatinga de Pernambuco denominados de UCP 060, UCP 1299, UCP 1308, previamente catalogadas no Banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (unicap), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). As culturas foram mantidas no meio Ágar Sabouroud Dextrose (ASD) suplementado com azeite de oliva á 0,1% a temperatura de 28°C, com a seguinte composição: dextrose (40g/L), peptona (10g/L), Ágar (20g/L), água destilada 1000m/L pH 5,5. Durante 96 horas, 28°C.

Seleção de amostras produtoras de lipase em meio sólido

Para a detecção da enzima lipase em meio sólido, foi utilizada a metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), usando o meio para a detecção da atividade lipolítica (g/L): Glicose(40g); Peptona(10g); Ágar(20g); Tween 20(10mL); pH 5,5. O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri e após a solidificação foi feito

um furo no centro das placas, cujo diâmetro foi de 0,8cm. Foram preparados suspensões esporícas das três amostras de *Cunninghamella echinulata* denominadas (SIS 37, 40 e UCP 12136) e inoculados 100µL nos poços. As placas foram incubadas em diferentes temperaturas (28°C, 37°C, 45°C) durante 96 horas com acompanhamento diário. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A formação de halo característico ao redor do crescimento da colônia evidenciava a produção de lipase.

Pré inóculo

A contagem do número de esporangiólos/mL em suspensão foi realizada em câmara de Neubauer. 25mL da suspensão esporíca na concentração de 10^7 U/mL foi inoculado em meio caldo Sabouraud.

Meios de produção

Foram utilizados 4 meios de produção de lipase, com diferentes composições:

Meio 1 (g/L): Glicose (1,0), extrato de levedura (0,5), peptona (2,0), NaNO₃ (0,1), KH₂PO₄ (0,1), MgSO₄.7H₂O (0,05), óleo de oliva (1,0), pH 6,5;

Meio 2 (g/L): Óleo de oliva (0,30), peptona (70), NaNO₃ (1,0), KH₂PO₄ (1,0), MgSO₄.7H₂O (0,05), pH 7,0;

Meio 3 (g/L): Peptona (1,0), NaCl (0,5), CaCl₂ 2H₂O (0,1), Tween 20 (1,0), pH 6,0;

Meio 4 (g/L): Glicose (0,1), MgSO₄.7H₂O (0,2), K₂HPO₄ (0,7), extrato de levedura(0,4), óleo de oliva (0,20), pH 6,5;

A produção de lipase foi realizada em agitador orbital utilizando Erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de 125 mL (% p:v), 150 rpm 37° C, durante 144 h, com acompanhamento a casa 24 h. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação da biomassa microbiana

A biomassa foi determinada após o termino dos ensaios dos meios de produção. A massa micial foi filtrada em papel filtro e o material retido foi transferido para frascos previamente etiquetados e pesados. Em seguida os frascos foram destinados ao liofilizador para posterior quantificação da biomassa. O sobrenadante denominado extrato enzimático foi utilizado para a determinação do pH e para a atividade enzimática.

Determinação do pH

Todas as amostras coletadas foram submetidas ao processo de leituras no potenciômetro para determinação do pH.

Detecção enzimática

A atividade enzimática foi determinada através da metodologia descrita por SOARES et al. (1999). Foi preparada uma reação contendo 5 mL de uma emulsão (azeite de oliva 100mL + goma arábica 7%), mais 2 mL de tampão fosfato (0,1M), com pH 8,0 e 1 mL da amostra fermentada. A mistura foi colocada sob agitação de 82 rpm, à 37°C de temperatura durante 10 minutos.

A reação foi paralisada através da adição de 10 mL de uma mistura acetona-etanol-água (1:1:1), onde foram liberados os ácidos graxos livres presentes na mistura. A mistura foi titulada com uma solução de KOH (0,4M) na presença do indicador fenolftaleína. Atividade enzimática foi determinada através da seguinte relação: uma unidade da atividade lipolítica (U/mL) será definida como a quantidade da enzima bruta que liberou 1 µmol de ácido graxo por minuto. Os resultados obtidos foram calculados através da seguinte equação:

$$AE \text{ (U/mL)} = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times V_c}$$

Onde:

AE é a atividade lipolítica (U/mL); V_a é o volume da amostra titulada (mL); V_b é o volume da amostra utilizado na reação, branco (mL); N é a molaridade da solução de KOH (N); t é o tempo de reação em minutos, V_c é o volume da amostra utilizada na reação (mL).

Resultados e Discussão

Screnning enzimático de *Cunninghamella echinulata* produtora de lipase em meio sólido. Na tabela 1 encontram-se resultados obtidos nos ensaios de detecção da atividade enzimática em meio sólido. Verifica-se que nas temperaturas testadas de 45°C não foram detectados presença de halos característicos da enzima testada.

Tabela 1- Ensaio de detecção da atividade lipolítica em meio sólido utilizando diferentes amostras de *Cunninghamella echinulata*.

SAMPLES	TEMP.	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0
UCP 1299	28°C	1.5 cm	3.0 cm	2.0cm
	37°C	2.0 cm	3.5 cm	3.0 cm
	45°C	–	–	–
UCP 1308	28°C	4.5 cm	4.0 cm	3.5 cm
	37°C	2.0 cm	2.2 cm	3.0 cm
	45°C	–	–	–
UCP 060	28°C	1.5 cm	1.5 cm	1.0 cm
	37°C	1.6 cm	2.0 cm	1.2 cm
	45°C	–	–	–

(-) Não detectado a presença da enzima testada.

Para a temperatura de 37°C e pH 5.0, 6.0 e 7.0 verifica-se que foram detectados formação de halo entre 1,2 e 3,0 cm nas 3 amostras testadas.

O melhor resultado obtido foi com a amostra denominada de UCP 1308 com a temperatura de 28°C e pH 5.0, onde apresentou o maior halo com o valor de 4,5 cm.

PAPAGIANNI, 2014., ABDEL-AAL et al.,(2016) realizaram experimentos envolvendo a produção de lipase utilizando resíduos alternativos e comprovaram que a faixa ideal de pH para produção da enzima está na faixa de entre 4,0- 7,0.

A produção de lipases por micro-organismos pode ser influenciada diretamente por diferentes fatores, como fonte de carbono, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura e pH do meio, e condições de aeração (CAMMAROTA, FREIRE, 2006., LIMA, 2014).

Segundo ORLANDELLI, et al., 2012., MOMSIA, (2015) o sucesso na obtenção de um produto fúngico requer um conhecimento detalhado das características de

crescimento e da fisiologia da cepa produtora, sendo cada fungo, único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico.

Após a identificação da amostra que apresentou a maior produção enzimática em meio sólido, foram realizados ensaios de produção da lipase em meio líquido, utilizando 4 diferentes meios por fermentação submersa. Foram coletadas amostras a cada 24 horas durante 168 h para determinação da curva de crescimento, biomassa, pH e atividade lipolítica.

BENTO, et al ., 2014., RODRIGUES, et al., (2015) descreveram que a presença de elementos minerais (fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro e cloro) e uma pequena quantidade de elementos que desempenham importante papel como constituintes de enzimas e coenzimas. São geralmente necessários nos meios de produção de enzimas por micro - organismos.

A figura 1 apresenta a curva de crescimento da amostra UCP 1308. Verifica-se que o maior crescimento obtido foi detectado no meio denominado de 4.

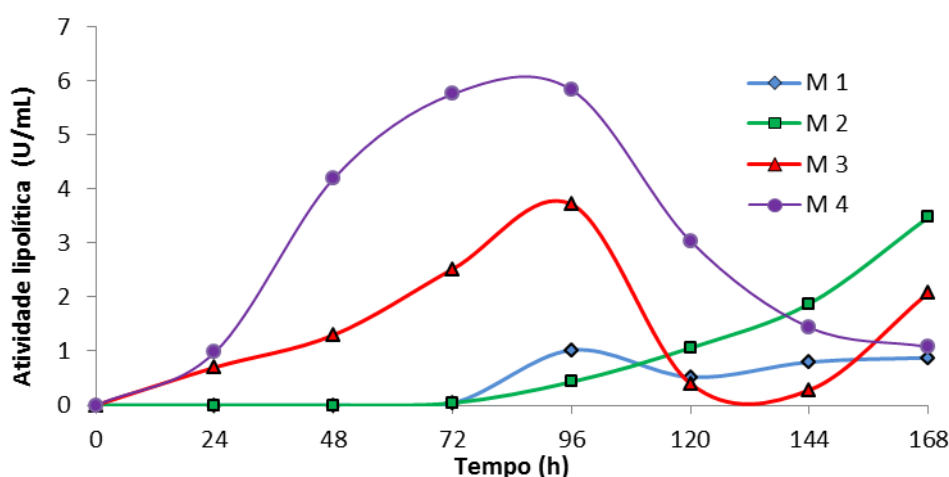


Figura 1. A atividade lipolítica da amostra UCP 1308 em diferentes meios de produção.

Na figura 2 estão descritos valores das biomassas (g/L) obtidas em 4 diferentes meios de produção da lipase, durante 168 horas. Verifica-se que os meios 1 e 4, foi produzido maior quantidade de biomassa dos processos de produção. A amostra produziu maior quantidade de biomassa no meio 4 com 168 horas de crescimento (3,04 g/L).

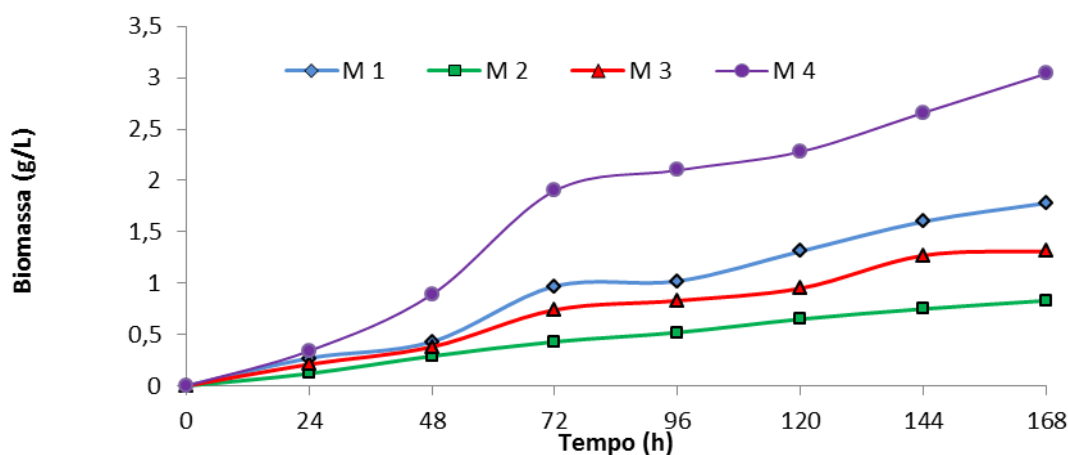


Figura 2. Crescimento da biomassa da amostra UCP 1308 em diferentes meios.

Os valores de pH obtidos durante os 4 ensaios de produção de lipase com a amostra UCP 1308 estão descritos na tabela 3. Verifica-se que os valores de pH iniciais dos 4 meios foram mantidos em 5,5, e após 72 horas houve uma variação, ao término do processo de produção, os meios 1 e 2 ficaram da faixa de pH alcalino, o meio 3 próximo a neutralidade, e o meio 4 ficou na faixa ácida.

Tabela 2– Determinação dos valores de pH nos meios testados da amostra UCP 1308

pH	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Meio 1	5,5	–	–	5,3	5,4	6,6	7,5	8,1
Meio 2	5,5	–	–	7,0	6,6	8,4	8,6	8,4
Meio 3	5,5	–	–	6,5	8,3	6,4	6,7	6,6
Meio 4	5,5	–	–	6,3	6,1	5,7	5,2	4,4

Verifica-se na tabela 2 que os valores obtidos na determinação da atividade da lipase produzida em diferentes meios utilizando a amostra UCP 1308 que no meio 4, foram obtidos os maiores valores da atividade com 72 h (5,76 U/mL) e 96h (5,84 U/mL).

Tabela 3- Determinação da atividade enzimática de lipase em diferentes meios da amostra UCP 1308.

Lipase	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h (U/mL)
Meio 1	–	–	–	0,04	1,02	0,52	0,80	0,88
Meio 2	–	–	–	0,04	0,02	1,06	1,88	3,48
Meio 3	–	–	–	2,52	3,72	0,04	0,08	2,08
Meio 4	–	–	–	5,76	5,84	3,04	1,44	1,08

MOMSIA, (2013) descreve que em seus estudos os maiores valores de níveis enzimáticos foram (2,684 U/mL) e (1,386 U/mL) e foram observados após 144 horas de cultivo. A partir do qual foi observado um decréscimo na atividade lipolítica.

Por sua vez, apresentou as menores atividades enzimáticas, sendo a atividade (0,866 U/mL) observada no tempo de 72h. MARTIN et al., 2007., LEE, (1999) realizaram experimentos relacionados com a produção de lipase, e constataram que os maiores índices de produção se encontravam quando a fermentação apresentava valores de pH na faixa de 5,25-9,25. LOTRAKUL, DHARMSTHITI, (1997), BRIONES, SERRANO, LABIDI, (2012) obtiveram em seus trabalhos que a atividade máxima enzimática é atingida quando o valor de pH ótimo fica na faixa neutra, com valores entre 6,5 e 7,0.

A atividade lipásica é comumente medida pelo monitoramento da liberação de ácidos graxos ou glicerol a partir do triacil glicerol; e o uso de meio sólido com

substratos indutores como óleos vegetais, triglicerídeos padrões (tributirina, trioleína), Tween 80 e corantes tem sido fartamente descrito na literatura, visando a pré-seleção de microrganismos produtores de lipases (SANDOVAL, MARTY, 2007., RODRIGUES et al., 2015).

Diante dos resultados alcançados destaca-se a habilidade da amostra *Cunninghamella echinulata* UCP 1308 em hidrolisar ácidos graxos presentes na composição dos meios estudados, através da quebra das ligações ésteres tríplexes transformando-os na enzima estudada.

Conclusões

Cunninghamella echinulata demonstrou ser um micro-organismo propício para produção da lipase, tendo um resultado satisfatório. Os estudos demonstraram que o fungo estabelece condições promissoras para a produção industrial, considerando a fácil manipulação, fácil cultivo e o curto espaço de tempo de síntese do meio, promovendo uma diminuição nos custos de produção.

Agradecimentos

Os autores agradecem, a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (**CAPE**) e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infra-estrutura para execução de toda parte experimental.

Referências

- ABDEL-AAL H. et al. Enzyme producing capabilities of some extremophilic fungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natrun, Egypt. Part 1: Protease, lipase and phosphatase **European Journal of Biological Research** 2016 p.92-102.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. John Wiley, Sons, Pub., 233p., 1996.
- BENJAMIN S., PANDEY A. Candida rugosa lipases: **molecular biology and versatility in biotechnology**. Yeast, 14: 1069-1087, 1998.
- BENTO, C. B. P. et al. Influence of white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of lignocellulosic agro-industrial residues. Afr. J. **Microbiol. Res**, v. 8, n. 28, p. 2724-2732, 2014.
- BHUTANI K. K, LUNAGARIYA N.A, PATEL N. K, JAGTAP S. C. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art clinical perspectives. **Excli Journal** 13: 897-921, 2014.
- BRIONES, R., SERRANO, L., LABIDI, J. Valorization of some lignocellulosic agro-industrial residues to obtain biopolyols. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 244-249, 2012.
- CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil grease content. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 2195-2210, 2006.
- CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C. The fungi. London: Academic Press, 1997.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. Vol. 1. Academic Press. 120p. 1980.
- GOPINATH, S.C.B., HILDA, A., LAKSHMI PRIYA, T., ANNADURAI, G. Purification of lipase from *Cunninghamella verticillata* and optimization of enzyme activity using

response surface methodology. **World Journal of Microbiology** 18: 449-458, 2002.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

JAEGER, K. E., EGGERT, T . Lipases for biotechnology, Curr. Opin. **Biotechnol.** 13: 390-397, 2002.

LEE K.M. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, pp. 646-650,1999.

LIMA, B. F. et al. Seleção de meios de produção de lipase por amostras de *Aspergillus* sp isoladas da caatinga de Pernambuco. **e-Xacta**, v. 7, n. 1, 2014.

LOPES, S. A.; VEIGA, I. G.; MORAES A. M. Desenvolvimento de dispositivo de quitosana e xantana para a liberação tópica ou em tecidos moles de indometacina. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 13205-13212, 2015.

LOTRAKUL, M., S. DHARMSTHITI Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 13, 163-166, 1997.

MARTIN, C. et al. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 137, n. 1-12, p. 339-352, 2007.

MARTINS, V. G., KALIL, S. J., COSTA, J. A. V. Lipases and biosurfactant production by solid state fermentation for utilization in bioremediation of vegetable oils and hydrocarbons. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.

MESSIAS, J. M., COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G. GIESE, E. C., DEKKER, R. F MIRANDA, O. A. et al. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue, **Bioresource Technology**, v. 69, p.145-147, 1999.

MILETIC, N., VUKOVI, Z., NASTASOVI, A., LOSS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v.115, p. 126-135, 2012.

MIRANDA O. A. et al., Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue, **Bioresource Technology**, v. 69, p.145-147, 1999.

MOMSIA, T. A review on microbial lipase-versatile tool for industrial applications. **International journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research Hyderabad**, INDIA, v. 2, n. 4, 2013.

OLIVEIRA, G. R. B. Inibição da lipase pancreática no controle do metabolismo lipídico. **Visão Acadêmica**, v.16, n.3, p. 47-52, 2015.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 97-109, 2012.

PANESAR, R.; KAUR, S., PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 70-76, 2015.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial process, **Biotechnology Advances**, 2004.

POORNA, C. A., PREMA, P. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 2, p. 106-112, 2006.

RODRIGUES, C. et al. Isolation and selection of lipase-producing fungi based on lipase activity and hydrolytic potential on soybean oil and grease trap scum. 2015.

SANDOVAL, G; MARTY, A. (2007) Screening methods for synthetic activity of lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 390-393.

SAXENA, R. K; GHOSH, P. K; GUPTA, R; SHEBA DVIDSON, W; BRADDOO, S; GULATI, R. Microbial lipases, potential biocatalysts for the future industry. *Curr. Sci.* 77: 101-115, 1999.

SILVA K.R.I., DURRANT L.R., MENEZES C.R. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos basidiomicetos de degradação branca cultivados em bagaço de cana-de-açúcar através de fermentação semisólida. In: Workshop Internacional Brasil-Japão em biocombustível, meio-ambiente e novos produtos de biomassa. v. 4, 2007.

SILVA, S.S., IZABELI, S.S.T., GUSMÃO, P.F.L. Fungos conidiais associados a substratos vegetais submersos em algumas áreas do bioma Caatinga. *Rodriguésia* v. 65, n.2, p.527-538, 2014.

SOUZA, F. M. et al. Produção de lipase de *Aspergillus niger* e imobilização em membranas de poliétersulfona. V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, 2015

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido à revista Brazilian of Journal Microbiology

Produção de lipase por *Cunninghamella echinulata* (UCP 1308) utilização de resíduos agroindustriais através de um planejamento fatorial.

Resumo

A produção de enzimas por microrganismos através de métodos biotecnológicos pode ser realizada através de bioprocessos submersos e em estado sólido, podendo ser afetada por fatores como o pH, a temperatura, a composição do meio, o preparo do inóculo, a aeração, a agitação, as fontes de carbono e nitrogênio, a concentração de oxigênio dissolvido, a cepa do microrganismo, entre outros. Neste trabalho, foi avaliada a influência de resíduos agroindustriais para produção de lipase. Com a utilização do planejamento fatorial 2^3 foi possível à escolha de uma melhor condição para a utilização desses substratos. Os resíduos adicionados ao meio de cultura foram resíduo de sorvete, óleo pós fritura. Ensaios foram realizados em 168 horas em meio líquido a 37°C. Os resultados mostram que os dois resíduos responderam significativamente para atividade lipolítica, sendo que o resíduo de sorvete obteve uma atividade enzimática superior, 26,4 (U/mL).

Palavras chaves: Resíduos agroindustriais, *Cunninghamella*, Lipase.

Abstract

The production of enzymes by microorganisms through biotechnological methods can be carried out through submerged and solid state bioprocesses and may be affected by factors such as pH, temperature, media composition, inoculation preparation, aeration, agitation, The sources of carbon and nitrogen, the concentration of dissolved oxygen, the strain of the microorganism, among others. In this work, the influence of agroindustrial residues for lipase production was evaluated. With the use of factorial design 2^3 it was possible to choose a better condition for the

use of these substrates. The residues added to the culture medium were ice cream residue, post-fry oil. Assays were performed in 168 hours in liquid medium at 37°C. The results show that the two residues responded significantly to lipolytic activity, and the ice cream residue obtained a higher enzymatic activity, 26.4 (U / mL).

Keywords: Agroindustrial wastes, *Cunninghamella*, Lipase

INTRODUÇÃO

As lipases podem ser produzidas por micro-organismos, por animais e por vegetais, porém as lipases de origem microbianas são atualmente as mais utilizadas industrialmente. A produção e aplicação de lipases de origem microbiana também tem sido a mais empregada no meio biotecnológico. Esse fato se deve principalmente às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do custo de obtenção (Freire., Castilho, 2008., Adrio., Demain, 2014., Silva et al., 2016).

A utilização de substratos agroindustriais na formulação de meios de produção de substâncias bioativas produzidas por micro-organismos tem sido uma das alternativas mais utilizadas nos últimos anos, devido à possibilidade de redução dos custos da elaboração dos meios de produção de diversas substâncias bioativas (Damaso et al., 2008., Chandel et al., 2012., Salihu et al., 2012; Maldonado, Macedo, Rodrigues, 2014., Vats, 2015., Das mercês, et al., 2016), os resíduos agroindústrias apresentam uma elevada quantidade de matéria orgânica, servem como fontes de proteínas, óleos essenciais, e são passíveis de recuperação e aproveitamento, além de reduzirem o preço final da composição do meio de produção. Assim a utilização adequada destes resíduos ajudam a minimizar problemas ambientais e energéticos, além disso, podem gerar bioprodutos com relevantes aplicações nas diversas áreas industriais e ambientais (Marques et al., 2014; Adio et al., 2015., Elain et al., 2016).

O Brasil tem potencial na produção de enzimas por possuir grande quantidade e variedade de matérias-primas renováveis. O desenvolvimento de tecnologia por reaproveitamento de resíduos na produção de enzimas favorece o desenvolvimento sustentável, fundamental na preservação do meio ambiente (Lima et al., 2014., Lopes et al., 2013., Fernandes et al., 2012., Menezes et al., 2012).

O planejamento fatorial é uma estratégia analítica útil e sua principal aplicação reside na triagem das variáveis mais relevantes de um determinado sistema analítico (Costa et al., 2001., Hanrahan, 2006; Ilzarbe et al., 2008., Vivacqua, Pinho, Ho, 2016., Said et al., 2016). A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro.

O planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas (Kennedy, Krouse, 1999., Parekh, Vinci, Strobel, 2000., Treichel et al., 2010., Keskin-gündoğdu et al., 2016., Shu et al., 2016).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

Os estudos foram realizados com amostra de *Cunninghamella echinulata* UCP 1308 isolada da Caatinga de Pernambuco que foi mantida em meio Sabouraud suplementado com azeite de oliva á 0,1% a temperatura de 28°C. previamente catalogada no banco de culturas da Universidade Católica e Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB).

Meio convencional de produção

A produção enzimática foi realizada utilizando, Erlenmyers de 500 mL, com volume útil de 250mL (%p:v). Alíquotas de 25mL de uma suspensão esporica 10^7 esporos/mL foram adicionadas em meio de cultura contendo uma solução(g/L) contendo glicose (1g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2g), K_2HPO_4 (7g), extrato de levedura (4g), com pH 5,5 e suplementado com 10 mL de azeite de oliva.

Meios alternativos de produção

Os meios alternativos foram preparados utilizando a mesma composição do meio padrão do azeite de oliva, sendo utilizados resíduos de sorvete e óleo de fritura, na mesma quantidade do indutor (10mL/L).

Planejamento Fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central, cujas variáveis centrais foram pH, óleo de fritura e resíduo de sorvete. Foi feito um inóculo nos meios de cultura da suspensão esporica contendo 10% do volume total. Os ensaios foram realizados durante 168 horas, 150 rpm, 37°C de acordo com a matriz descrita na tabela 1:

Tabela 1– Matriz de planejamento fatorial 2^3 completa para produção de lipase

Variáveis	- 1	0	+ 1
pH	4,5	5,5	6,5
Óleo de fritura (mL/L)	9,0	10,0	11,0
Resíduo de sorvete (mL/L)	9,0	10,0	11,0

Detecção Enzimática

A atividade enzimática foi determinada através da metodologia descrita por SOARES et al. (1999). Foi preparada uma reação contendo 5 mL de uma emulsão (azeite de oliva 10 mL + goma arábica 7%), mais 2 mL de tampão fosfato (0,1M), com pH 8,0 e 1 mL da amostra fermentada. A mistura foi colocada sob agitação de 82 rpm, a 37°C de temperatura durante 10 minutos.

A reação foi paralisada através da adição de 10 mL de uma mistura acetona-etanol-água (1:1:1), onde foram liberados os ácidos graxos livres presentes na mistura. A mistura foi titulada com

uma solução de KOH (0,4M) na presença do indicador fenolftaleína. Atividade enzimática foi determinada através da seguinte relação: uma unidade da atividade lipolítica (U/mL) será definida como a quantidade da enzima bruta que liberou 1 µ/mL de ácido graxo por minuto. Os resultados obtidos foram calculados através da seguinte equação:

$$AE \text{ (U/mL)} = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times V_c}$$

Onde:

AE é a atividade lipolítica (U/mL);

V_a é o volume da amostra titulada (mL);

V_b é o volume da amostra utilizado na reação, branco (mL);

N é a molaridade da solução de KOH (N);

t é o tempo de reação em minutos,

V_c é o volume da amostra utilizada na reação (mL).

Determinação do pH

O pH das amostras coletadas foi determinado através de potenciometria.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A utilização de diversos tipos de resíduos com alto valor nutricional tem sido descrito na literatura para produção de substâncias de alto valor agregado, principalmente enzimas microbianas. Esses resíduos apresentam normalmente uma grande quantidade de nutrientes que podem ser utilizados e com isso diminuem os custos de produção dos processos fermentativos (Poorna, Prema, 2006., Martin, et al., 2007., Briones, Serrano, Labidi, 2012., Bento et al., 2014., Panesar, Kaur, Panesar, 2015).

Os resultados descritos na tabela 2 apresentam a realização de um planejamento fatorial 2³, onde os melhores resultados da produção enzimática foram detectadas no ensaio 1, utilizando os meios alternativos contendo os resíduos agroindustriais que apresentava as seguintes condições: pH (4,5), óleo pós fritura (9,0mL/L) e resíduo de sorvete (9,0mL/L). Apresentando uma atividade de 26,4 U/mL com pH 5,6 onde se manteve na faixa ácida.

Outro fator que pode ter levado uma maior atividade lipolítica no meio 4 foi possivelmente a presença de sais de potássio e magnésio Castiglioni (2009) descreveu que o potássio e o magnésio são compostos de grande importância para o metabolismo de microorganismos, pois dependendo de sua concentração podem atuar favorecendo ou inibindo determinadas rotas metabólicas.

Aliyu salihu et al. (2012), Wolski, Rigo, Di luccio (2009), realizaram experimentos relacionados com a produção de lipase utilizando resíduos alternativos, e constataram que os maiores índices de atividade enzimática se encontravam quando a fermentação se encontrava em

períodos equivalentes entre 48h-72h e 72h-96h com o pH entre 4,0 e 5,5. Segundo Lotrakul, Dharmstithi (1997) obtiveram em seus resultados que a temperatura mais favorável para a produção da enzima se encontrava numa faixa ótima com valores menores que 40°C.

Ertugrul et al.,(2007) relata que o *Bacillus sp* foi identificado como o maior produtor de lipases entre as 17 cepas isoladas com atividade lipolítica de 15 U/ml utilizando o óleo de oliva no meio de produção.

Kanwar et al. (2002) alcançaram uma atividade lipolítica de 25 U/mL, a 34 °C e pH 8,0, utilizando como fonte de enzimas lipolíticas, a bactéria *Pseudomonas*, isoladas de solo contaminado com petróleo.

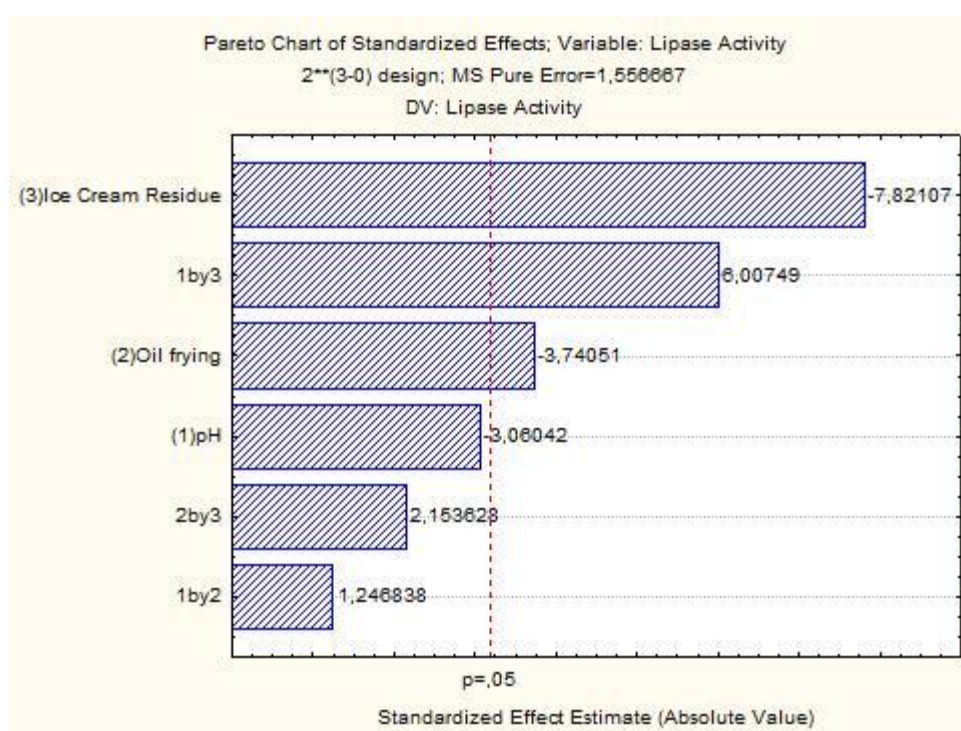
Os ensaios mostram que a *Cunninghamella echinulata* (UCP1308) teve um resultado satisfatório para a produção da lipase.

Tabela 2– Produção de biomassa, pH e atividade lipolítica dos ensaios para as concentrações de pH, óleo de fritura e resíduo de sorvete em 168 horas de cultivo a 28°C a 86 rpm.

Ensaio	Variáveis descodificadas			Variáveis respostas		
	pH	Óleo pós - fritura (mL)	Resíduo de sorvete (mL)	Biomassa	pH	Lipase (U/mL)
1	4,5	9	9	1,40	5,6	26,4
2	6,5	9	9	1,13	7,2	15,6
3	4,5	11	9	2,56	5,1	18,4
4	6,5	11	9	2,55	7,1	13,4
5	4,5	9	11	2,83	5,0	10,6
6	6,5	9	11	2,21	7,1	13,8
7	4,5	11	11	2,54	5,7	9,8
8	6,5	11	11	3,31	7,2	11,8
9	5,5	10	11	1,67	6,0	10,0
10	5,5	10	11	1,85	6,1	12,0
11	5,5	10	11	1,84	5,7	10,4
12	5,5	10	11	1,83	6,6	12,6

Os resultados expressos no diagrama de pareto (Figura 1) apresenta a significância dos resultados, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada vermelha, correspondente ao valor de $p = 0,5$. As seguintes variáveis independentes: Resíduo de sorvete, óleo pós fritura e pH, influenciaram a produção de lipase. Sendo que o resíduo de sorvete e o óleo de fritura foram as variáveis independentes mais relevantes para produção de enzima, por ambas estarem acima dos valores de p .

Figura 1. Diagrama de pareto mostrando os efeitos principais e alterações das variáveis independentes no processo de produção de lipase por *Cunninghamella echinulata* (UCP 1308) a 168 horas de fermentação a 28°C. (1) pH, (2) óleo pós- fritura, (3) resíduo de sorvete.



Os resultados obtidos encontram-se superiores comparando-se com Riaz, M. et al (2010), que analisou a caracterização e produção de lipase por *Bacillus sp.* FH5, obtendo a atividade máxima de enzima, após 48 horas igual a (5,12 U/mL), porém nossos resultados são inferiores quando comparados com Fernandes (2007) analisando a produção de lipases por *Burkholderia cepacia* que obteve uma atividade máxima de (49,5 U/mL) a 72 horas de cultivo.

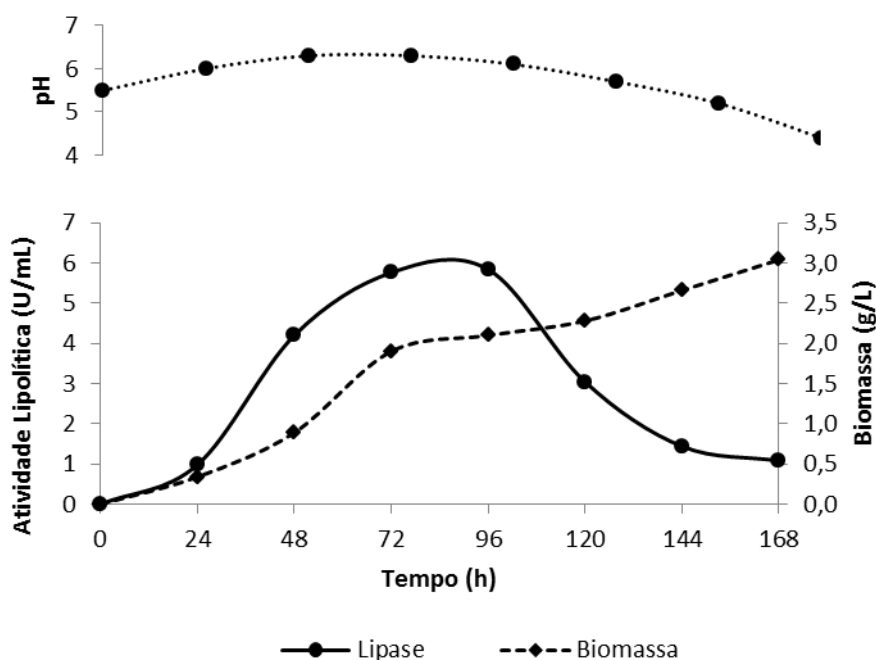
Weber, 2013 utilizando o reaproveitamento de óleo de fritura para a produção enzimática de etil e metil, descreve que existe um grande interesse na utilização de lipases como biocatalizadores para converter comercialmente óleos vegetais e gorduras em FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos), FAEE (ésteres etílicos de ácidos graxos) como biocombustíveis.

A cinética de crescimento do ensaio 1, da *Cunninghamella echinulata* (SIS 40) esta representada na figura 2, percebe-se que houve uma rápida adaptação do micro-organismo na fase no qual

ocorre a síntese de enzima e de outros constituintes celulares necessários a absorção de nutrientes presentes no meio. Logo após o micro-organismo cresceu de forma rápida. Absorvendo os nutrientes e sintetizando seus constituintes atingindo seu auge entre 72 e 96 horas. Daí por diante houve um declínio no seu crescimento que permaneceu até 168 horas de cultivo.

Segundo (Lee 1999, Silva, Durrant, Menezes, 2007) a presença de diversos fatores podem influenciar a produção de biomassa e relatam que flutuações ou oscilações do pH, temperatura e tempo podem reduzir o crescimento de um micro-organismo e interferir na produção enzimática podendo causar a inativação de algumas enzimas e estimular a secreção de outras

Figura 2. Crescimento do fungo *Cunninghamella echinulata* (UCP 1308) para o ensaio 1 em 168 horas de fermentação a 37°C e pH 5,5.



4. CONCLUSÕES

- Verificou-se que a amostra de *Cunninghamella echinulata* tem capacidade para produção de lipase, utilizando diferentes meios de produção, estabelecendo-se uma alternativa para os estudos relacionados à produção de lípases microbianas.
- A elaboração dos meios com resíduo de sorvete na sua composição aumenta a atividade da produção de lipase no micro-organismo testado.

- O resíduo de sorvete, utilizado como fonte de carbono, estimulou a produção de lipase pelo micro-organismo, favorecendo uma melhor da atividade lipolítica, tornando-se uma alternativa para minimizar os custos de produção e também o descarte de forma incorreta de uma grande maioria de resíduos com elevado potencial nutritivo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem, a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infra-estrutura para execução de toda parte experimental.

REFERÊNCIAS

- ADIO, O. Q. et al. Production of lipases in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* F7-02 with agricultural residues. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. 6, p. 509, 2015.
- ADRIO J. L., DEMAÏN A. L. **Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes**. Biomolec. 2014 Feb;4(1):117–39, doi: 10.3390/biom4010117.
- ALIYU SALIHU, M.D. et al., Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **ELSEVIER: Resources, Conservation and Recycling** 58 (2012) 36-44.
- BENTO, C. B. P. et al. Influence of white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of lignocellulosic agro-industrial residues. **Afr. J. Microbiol. Res**, v. 8, n. 28, p. 2724-2732, 2014.
- BRIONES, R., SERRANO, L., LABIDI, J. Valorization of some lignocellulosic agro-industrial residues to obtain biopolyols. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 244-249, 2012.
- CASTIGLIONI, G. L. Estudo da produção e utilização de lipase de *Burkholderia cepacia* na síntese enzimática de biodiesel. Tese (doutorado em Engenharia de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, p. 152, Campinas, 2009.
- CHANDEL, A.K., et al. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.87, no 01, p.11-20, 2012.
- COSTA, A. C. et al. Factorial design and simulation for the optimization and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 125-137, 2001.
- DAMASO, M. C. T. et al., Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.676-68, 2008.
- DAS MERCÊS PENHA, E. et al. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. **Ciencia rural**, v. 46, n. 4, p. 755-761, 2016.

ELAIN, A. et al. Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 1-5, 2016.

ERTUGRUL, S.; DONMEZ, G.; TAKAC, S. S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal Hazard Mater*, v. 149, p. 720-724, 2007.

FERNANDES M.L.M., SAAD E.B., MEIRA J.A., RAMOS L. PP., MITCHELL D.A., KRIEGER NO. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, pp. 8-13, 2008.

FERNANDES, M. L. M – Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. p. 120. Curso de Pós-Graduação em Química Universidade Federal do Paraná. Tese de Doutorado (2007).

FREIRE, D. M. A., CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. Rio de Janeiro (Rio de Janeiro): Editora Interciência; 2008. Capítulo 16, In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**; p. 506, ISBN: 9788571931893.

HANRAHAN, G., LU, K. Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, n. 3-4, p. 141-151, 2006.

ILZARBE, L. et al. Practical applications of design of experiments in the field of engineering: a bibliographical review. **Quality and Reliability Engineering International**, v. 24, n. 4, p. 417-428, 2008.

KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique.

KENNEDY, M., KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 456-475, 1999.

KESKIN GÜNDOĞDU, T. et al. Experimental design methods for bioengineering applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 368-388, 2016.

LEE K.M. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, pp. 646-650, 1999.

LIMA, B. et al. Seleção de meios de produção de lipase por amostra de *Aspergillus sp* isoladas da caatinga de Pernambuco. **Revista Exacta**. v. 7, n.1, p. 147-157, 2014.

LIMA, L. R., ALMEIDA, P. F., MATOS, J. B. T. L. Prospecção de técnicas moleculares (qpcr e fish) a serem utilizadas em amostras ambientais para pesquisa na área de biotecnologia. **Cad. Prospec.**, Salvador, v. 9, n. 1, p. 79-91, 2016.

LOPES, F. C. et al. Pigment Production by Filamentous Fungi on Agro-Industrial Byproducts: an Eco-Friendly Alternative. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 3, pp. 616-625, 2013.

LOTRAKUL, M., S. DHARMSTHITI Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 13, 163±166, 1997.

MALDONADO, R. R., MACEDO, G. A., RODRIGUES, M.I. Lipase production using microorganisms from different agro-industrial by products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.4, n.1, p.108-115, 2014.

MARQUES, T. A. et al. Utilization of dairy effluent as alternative fermentation medium for microbial lipase production. **Romanian Biotechnological Letters**, v..19, n 1, p.9042-9050, 2014.

MARTIN, C. et al. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 137, n. 1-12, p. 339-352, 2007.

MENEZES J.D.S., DRUZIAN J.I., PADILHA F.F., SOUZA R.R. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. **Revo. Elet. em**

PANESAR, R.; KAUR, S., PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 70-76, 2015.

PAREKH, S.,VINCI, V. A., STROBEL, R. J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 3, p. 287-301, 2000.

POORNA, C. A., PREMA, P. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 2, p. 106-112, 2006.

RIAZ, M ., SHAH, A. A ., HAMEED, A ., HASAN, F. Characterization of lipase produced by *Bacillus* sp. FH5 in immobilized and free state. *Ann Microbiol* v. 60, p. 169-175, 2010.

SAID, K. A. M., AMIN, M. A. M. Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes. **Journal of Applied Science & Process Engineering**, v. 2, n. 1, 2016.

SALIHU, A. et al., Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v.58, p.36–44, 2012.

SHU, G. et al. Screening of médium compounds using a two-level factorial designer for *Saccharomyces boulardii*. **Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry**, v. 17, n. 1, p. 45, 2016.

SILVA K.R.I., DURRANT L.R., MENEZES C.R. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos basidiomicetos de degradação branca cultivados em bagaço de cana-de-açúcar através de

fermentação semisólida. In: **Workshop Internacional Brasil-Japão em biocombustível, meio-ambiente e novos produtos de biomassa**. v. 4, 2007.

SILVA, M.O. M. B. et al. Isolation of microorganisms and lipase production study using agricultural residues. **Scientia Plena**, V. 12, n. 05, 2016.

VATS, S. et al. Mass production of *Beauveria bassiana* (NCIM No. 1300) fungal spores on cereal grains and agro-industrial residues. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 58-60, 2015.

VIVACQUA, C. A., PINHO, A. L. S., HO, L. L. Analysis of Augmented Unreplicated Factorial Designs Repeated in Time. **Quality and Reliability Engineering International**, v. 32, n. 3, p. 855-862, 2016.

WOLSKI, E. RIGO, M. DI LUCCIO, et al., Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium* sp. using experimental design. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254 (2009).

Capítulo IV

CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Dentre as amostras de *Cunninghamella echinulata* testadas neste estudo, para a triagem de melhores cepas produtoras de lipase em meio sólido, o micro-organismo UCP1308 foi o que se apresentou o melhor resultado dentre das outras amostras testadas;
- Nos ensaios referentes à seleção dos meios de produção de lipase em fermentação submersa, o meio que apresentou os melhores resultados foi o meio denominado 4, dentre os quatro meios selecionados para a produção de lipase;
- Os ensaios que utilizaram os planejamentos fatoriais 2^3 tendo como variáveis independentes o resíduo de sorvete, pH e óleo de fritura, para a produção de lipase, o ensaio 1 foi o que demonstrou os melhores resultados da produção;
- Os valores ácidos de pH influenciam diretamente na produção das lipases fúngicas;
- A maior produção de lipase nos ensaios contendo meios alternativos sem a presença do indutor, foi obtida com 96 horas de produção, obtendo um valor de 26,4 U/mL no meio contendo resíduo de sorvete;
- Verifica-se que a ausência do indutor nos meios alternativos, favorece o aumento da produção enzimática;
- A utilização de resíduos agroindustriais com teores de nutrientes ricos em ácidos graxos, podem contribuir na formulação de meios alternativos para produção de enzimas microbianas, principalmente as lipases;
- Esses resultados demonstraram uma alternativa para utilização dos resíduos derivados da indústria de sorvete, na redução dos custos da produção da lipase para fins biotecnológicos, pois contribuiu para minimizar os impactos ambientais.

Anexos

- Instruções aos autores da revista Brazilian of Journal Microbiology

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **notas prévias**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (até 50 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto não dividido em tópicos
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências tabelas e figuras.

Notas prévias devem conter 10 páginas. Figuras e tabelas devem estar restritas a, no máximo, duas figuras ou duas tabelas ou uma figura e uma tabela.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

As referências no texto devem ser citadas pelos seus números. As citações de autores no

texto devem ser feitas de acordo com o seguinte exemplo: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número) mentioned that... Não use caixa alta para redigir o nome completo dos autores.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que

já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser numeradas seqüencialmente em ordem alfabética, pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As referências devem ser citadas no texto por seus números com um espaço entre o número das referências (3, 7, 22). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo do *BIOSIS*. Todas as referências listadas devem ser citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem ser incluídas na lista final.

Exemplos:

a. Artigos de Periódicos

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S.; Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Artigos ou Capítulos de Livro

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Livros

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology - an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patentes

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Teses e Dissertações

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de*

Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publicações na Web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection.

Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

Referências como "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheça que às vezes elas devam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências. Referências consistem de artigos que são "aceitos para publicação" ou "no prelo". No entanto, referências de artigos que são "submetidos" ou "em preparo" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. _____

Título do Artigo:

" _____ "

Nome(s) do(s) Autor(es)

Assinatura(s)

Data: ____/____/____

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE ARTIGOS PARA A ENGEVISTA

O TEXTO:

Os artigos submetidos não devem conter nenhuma identificação dos autores. Deve constar nos metadados de submissão a identificação completa de TODOS os autores.

1. Os artigos devem ser inéditos, não sendo aceitas compilações, transcrições, traduções, reproduções ou adaptações de trabalhos já publicados em revista. Aceitam-se versões novas de trabalhos apresentados em congresso, colóquio, seminário ou outro evento técnico-científico. Não são aceitos trabalhos que tenham cunho promocional de empresa, marcas ou produtos e que possam induzir à promoção comercial;
2. Os trabalhos devem ser apresentados em formato Word 97 ou versão posterior. Devem ser **submetidos exclusivamente através da página do [SEER](#)**.
3. As seguintes instruções devem ser observadas:
 - a. **Formato de Página:** A4
 - b. **Margens:** superior e inferior – 1,5; esquerda - 3 e direita - 2,5;
 - c. **Espaçamento:** simples
 - d. **Tipo de letra:** Times New Roman (12)
 - e. No máximo 20 (vinte) páginas, contendo, no mínimo, os seguintes itens: título, identificação do autor, resumo, palavras-chave, desenvolvimento, conclusão e bibliografia. Artigos com maior número de páginas poderão ser aceitos a critério dos editores:
 - i. **Título:** o mais conciso possível, sugerindo, sem dubiedade, o assunto. Centralizado, em Arial 16, todo em maiúsculas. **Nos metadados o título também deverá estar todo em maiúsculas**seguido, entre parênteses pela versão do título em inglês (quando o artigo não for nesse idioma);
 - ii. **Identificação do autor:** nome (em itálico e negrito, alinhado à direita); endereço profissional e e-mail (em nota de rodapé e fonte 10). Esta identificação só deverá ser inserida após a aprovação do artigo, quando for solicitada a versão final e deve coincidir com a informação constante nos metadados de submissão. Se houver divergência o artigo não será publicado. Assim, recomenda-se especial cuidado do autor que faz a submissão em, nesse momento, inserir no sistema todos os autores do artigo. Qualquer troca de autores posterior significará uma nova submissão, com o recomeço de todo o processo de avaliação do artigo.
 - iii. **Resumo (e abstract):** em no máximo vinte linhas. O **abstract** deve vir precedido do título em inglês;

- iv. **Palavras-chave** (e **keywords**): no máximo quatro (4);
- v. **Desenvolvimento** (em duas colunas e sem qualquer nota de rodapé):
 - 1. numeração progressiva de títulos e subtítulos, em Arial negrito;
 - 2. tabelas e figuras: devem ser centralizadas, ter um número e um título, colocados *acima da tabela e abaixo da figura*;
 - 3. equações: centralizadas e numeradas sequencialmente.
 - 4. Na descrição da metodologia, ou equivalente, não deve ser incluído nenhum tópico sobre classificação da pesquisa (exploratória, quantitativa, etc). Informações desse tipo apenas aumentam o tamanho do artigo sem acrescentar nada de relevante ao conteúdo do texto.
 - 5. Evitar complicar desnecessariamente o texto. Evite modismos linguísticos, gramaticalmente errados. Por exemplo, modal não é substantivo (não existe o modal terrestre ou aéreo) e uma situação que gera um problema não é uma “situação problema” é, no máximo, uma situação problemática.
 - 6. Muito cuidado com o espaçamento de palavras. É comum alguns editores de texto incluam códigos que anulam os espaçamentos feitos. Recomenda-se, antes da submissão de cada versão, verificar como fica o arquivo quando aberto no Word para Windows, em especial se o texto foi feito num MAC.
- vi. **Conclusão** (em duas colunas): clara, objetiva e concisa.
- vii. **Bibliografia** (em duas colunas): de acordo com a formatação de Harvard. Em especial, os autores devem seguir rigorosamente os seguintes pontos:
 - 1- As citações, no corpo do texto, não devem usar caixa alta. Apenas a primeira letra de cada nome deve estar em maiúscula.
 - 2- Ainda nas citações, deve-se usar o *et al* para 3 ou mais autores.
 - 3- Nas referências não usar *et al* em hipótese alguma. Deve aparecer o nome de todos os autores.
 - 4- Nas referências apenas o(s) último(s) sobrenome(s) de cada autor é por extenso. Os primeiros nomes virão apenas com a inicial.
 - 5- As referências devem ser à obra original, não se admitindo o uso do "apud".
 - 6- Devem ser evitadas citações literais. O seu uso abusivo, mesmo com referência à obra citada, caracteriza plágio. Em caso de extremamente necessário fazer um citação literal, ela deve ser curta, em itálico e com citação à obra original. Não serão publicados artigos com mais de 2 citações literais
 - 7- Em cada referência os nomes dos autores devem ser indicados. Mesmo que os autores de duas referências sejam os mesmo, os seus nomes devem ser novamente escritos. Nunca usar "----" para indicar a repetição de autores.

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS:

Artigo em revista:

ENSSLIN, L., GIFFHORN, E., ENSSLIN, S. R., PETRI, S. M. & VIANNA, W. B. 2010. Avaliação do desempenho de Empresas Terceirizadas com o uso da Metodologia Multicritério de Apoio à Decisão - Construtivista. *Pesquisa Operacional*, 30, 125-152.

Artigo em congresso:

PINHEIRO, P. R., DE CASTRO, A. K. A. & PINHEIRO, M. C. D. A Multicriteria Model Applied in the Diagnosis of Alzheimer's Disease: A Bayesian Network. 11th IEEE International Conference on Computational Science and Engineering, 2008 São Paulo, Brasil. 15-22.

Livro:

ARROW, K. J. 1951. *Social Choice and Individual Values*, New York, Wiley.

Capítulo de livro:

BALSADI, O. V. 2008. O mercado de trabalho assalariado na cultura da cana-de-açúcar no período 1992-2006. In: FILHO, F. B. B. (ed.) *Energia e Biomassa*. Brasília.

Teses e dissertações

AZEVEDO, J. 2001. *Aplicação da metodologia multicritério de apoio à decisão na seleção de centros de usinagem para uma central de usinagem*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.

EXEMPLO DE PRIMEIRA PÁGINA FORMATADA, APÓS ACEITAÇÃO DO ARTIGO:

Ver em <http://www.uff.br/engevista/seer/index.php/engevista/article/view/484/217>

JULGAMENTO:

Os textos serão submetidos a 3 (três) consultores, que emitirão um parecer sobre a viabilidade ou não de sua publicação, em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Editorial da ENGEVISTA, que se reserva o parecer final sobre a publicação.

ÉTICA NA PUBLICAÇÃO: A submissão de um artigo à Engevista implica que não está submetido a nenhum outro periódico. São sumariamente recusados artigos que não respeitem esta norma. Igualmente são recusados artigos que sejam considerados plágio. Qualquer cópia de textos ou ideias de outros autores, sem a devida citação, ou a cópia de partes significativas de trabalho de outro, mesmo que com citação, é considerada plágio.

OPEN ACESS: A Engevista é um periódico de acesso livre. Os direitos autorais dos artigos permanecem com os autores. Não é cobrada nenhuma taxa de publicação nem de download dos artigos. Os artigos podem ser usados em outros trabalhos desde que feita a devida referência.