

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MARIA JHULIA DE PAULO FERREIRA DE SOUZA

**PESQUISA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE LIPASE NO ACERVO DE
MICROORGANISMOS DA UTFPR-FB**

FRANCISCO BELTRÃO

2023

MARIA JHULIA DE PAULO FERREIRA DE SOUZA

**PESQUISA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE LIPASE NO ACERVO DE
MICRORGANISMOS DA UTFPR-FB**

Research of lipase producing bacteria in the UTFPR-FB microorganism collection

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em engenharia química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Eugênia Castro Bravo.

Coorientadora: Prof. Dra. Irrede Angela Lucini Dalmolin.

FRANCISCO BELTRÃO

2023



Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

MARIA JHULIA DE PAULO FERREIRA DE SOUZA

**PESQUISA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE LIPASE NO ACERVO DE
MICRORGANISMOS DA UTFPR-FB**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
como requisito para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal
do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 06/Dezembro/2023

Claudia Eugênia Castro Bravo
Doutorado em Ciências dos Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Irede Angela Lucini Dalmolin
Doutorado em Engenharia de Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Ellen Porto Pinto
Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

“A folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação de Curso”

FRANCISCO BELTRÃO

2023

Dedico este trabalho à minha família, por sempre apoiar meus sonhos, e aos meus amigos por estarem comigo durante todo este processo.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meu profundo agradecimento àqueles que foram pilares essenciais durante toda a minha jornada acadêmica. À minha mãe, Lucimara, meu pai, Henrique, ao meu avô Celso, a minha avó Francisca e minha madrinha, Juliana, agradeço pelo apoio incondicional, amor e orientação que foram a bússola a guiar meus passos.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Prof. Dra. Claudia Eugenia Castro Bravo, cuja orientação perspicaz e experiência foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua dedicação e paciência moldaram não apenas a pesquisa, mas também minha formação acadêmica, muito obrigada por toda parceria.

Aos amigos incríveis – Bárbara, Valeska, Beatriz, Julia, Rodrigo, Diogo, Guilherme, Daniel, Leonardo, Carol, João, Dhonatan, Lucas, Maria Edoarda, Crystiele, Roberta, Crystian e Carlos – agradeço pela amizade, apoio moral e por todos momentos incríveis que passamos juntos desde o início. Especialmente, a Leonardo, Carol e João, que dividiram comigo praticamente todos os cinco anos de faculdade. Nossa convivência não apenas fortaleceu os laços de amizade, mas também transformou desafios acadêmicos em experiências compartilhadas, tornando a jornada mais significativa.

À minha namorada, Mariana, obrigada por ser minha fonte constante de apoio durante esse processo. Sua presença transformou meus dias de estudo em momentos especiais. Sou grata por todos momentos que passamos juntas e por ter você ao meu lado, te amo.

Gostaria também de expressar minha gratidão à Atlética X de Maio e aos amigos que conquistei no vôlei. A vivência esportiva proporcionou não apenas momentos de lazer e descontração, mas também amizades valiosas que enriqueceram minha experiência universitária, tornando essa trajetória mais memorável e repleta de boas lembranças.

Não posso esquecer de estender meus agradecimentos à UTFPR e aos técnicos dos laboratórios. A infraestrutura e recursos fornecidos foram fundamentais para a realização desta pesquisa. Agradeço também a todas as pessoas que, de várias formas, contribuíram para minha formação acadêmica, seja através de debates enriquecedores, trocas de experiências ou valiosos conselhos.

A todos, meu sincero agradecimento por tornarem esta jornada memorável e bem-sucedida.

RESUMO

A lipase, é uma enzima considerada versátil, desempenha um papel crucial em diversas indústrias, incluindo a alimentícia, farmacêutica e de detergentes. Seu uso abrange desde a produção de queijos até a síntese de biodiesel a partir de óleos vegetais. Dada a relevância das enzimas microbianas na degradação de resíduos industriais, este trabalho teve como objetivo principal verificar o potencial de produção de lipases por cepas de *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, microrganismos da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). De acordo com as condições experimentais e metodologia adotada, verificou-se que nenhuma das cepas de microrganismos testados apresentou atividade lipolítica. Possivelmente esses resultados estão associados à variabilidade genética e escolhas nutricionais específicas para cada microrganismo. Importante ressaltar a complexidade na produção de lipase por diferentes cepas bacterianas, corroborando com a fundamentação teórica sobre a variabilidade dessas enzimas e a importância de estratégias de cultivo adaptadas a cada microrganismo. Os resultados contribuem para o entendimento da atividade lipolítica em cepas bacterianas relevantes, oferecendo insights para pesquisas futuras na interseção da microbiologia e biotecnologia.

Palavras-chave: lipase; *Bacillus* sp.; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; atividade lipolítica.

ABSTRACT

Lipase, a versatile enzyme considered, plays a crucial role in several sectors, including food, pharmaceuticals and detergents. Its use ranges from cheese production to the nature of biodiesel from vegetable oils. Given the relevance of microbial enzymes in the handling of industrial waste, the main objective of this work was to verify the potential for lipase production by strains of *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, microorganisms from the collection of the Microbiology Laboratory of the Federal Technological University of Rio Grande do Sul. Paraná (UTFPR). According to the experimental conditions and methodology imposed, we ensured that none of the strains of microorganisms tested showed lipolytic activity. These results are possibly associated with genetic variability and specific nutritional choices for each microorganism. It is important to highlight the complexity in the production of lipase by different bacterial strains, corroborating the theoretical foundation on the variability of these enzymes and the importance of cultivation strategies adapted to each microorganism. The results positively advance the understanding of lipolytic activity in relevant bacterial strains, offering insights for future research at the intersection of microbiology and biotechnology.

Keywords: lipase; *Bacillus sp.*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; lipolytic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1 - Reativação das culturas microbianas	24
Figura 2 - Método Koukler e Jeager modificado	25
Fotografia 2 - Produção de lipase por <i>Bacillus</i> sp. com concentração de 0,001%(m/v)	25
Fotografia 3 - Placas de Petri com rodamina B em concentração de 0,1% (m/v) e 0,001%(m/v)	26
Fotografia 4 - Produção de lipase por <i>P. aeruginosa</i> com concentração de 0,001% (m/v)	26
Fotografia 5 - Produção de lipase por <i>P. aeruginosa</i> com concentração de 0,001% (m/v) e 0,1% (m/v)	27
Fotografia 6 - Produção de lipase por <i>S. aureus</i> com concentração de 0,001% (m/v)	27
Fotografia 7 - Produção de lipase por <i>S. aureus</i> com concentração de 0,001% (m/v) e 0,1% (m/v)	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1 Resíduos industriais	12
3.2 Enzimas microbianas na degradação de resíduos industriais	12
3.2.1 Vantagens e desvantagens do uso das enzimas microbianas.....	14
3.3 Lipases	15
3.4 Produção de lipase por microrganismos	16
3.4.1 Seleção da cepa produtora	16
3.4.2 Preparo do meio de cultura	17
3.4.3 Inoculação.....	18
3.5 Aplicações da lipase	19
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	20
4.1 Microrganismos	20
4.2 Reativação das culturas microbianas	20
4.3 Bioensaios para a determinação da atividade enzimática	21
4.4 Protocolo para armazenamento dos microrganismos em temperatura de 4 °C	21
5 RESULTADOS	23
5.1 Reativação das Culturas Microbianas	23
5.2 Bioensaios com rodamina B	24
5.3 Protocolo de armazenamento dos microrganismos	29
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são moléculas capazes de acelerar os processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, principalmente por serem ecologicamente mais viáveis. As enzimas têm benefícios como serem naturais, biodegradáveis, específicas, não consumidas no processo, acelerarem reações por reduzirem a energia de ativação, serem estereosseletivas e atuarem em condições suaves. Comparativamente, as enzimas convertem substratos em produtos de forma mais rápida que os catalisadores químicos, sem alterar o equilíbrio químico e acelerando reações reversíveis (Monteiro; Silva, 2009).

De acordo com Denti (2021), as enzimas podem ser classificadas de diferentes formas com base em suas propriedades e características. Uma das classificações mais comuns é baseada no tipo de reação química que elas catalisam. Essas classificações ajudam a compreender e organizar a diversidade de enzimas existentes e auxiliam na sua identificação, estudo e aplicação em diversos campos, incluindo a indústria, a medicina e a pesquisa científica.

A produção de lipases microbianas apresenta diversas vantagens em relação a outras fontes de lipases, como as de origem animal ou vegetal. Além disso, as lipases microbianas exibem alta atividade enzimática, o que as torna altamente eficientes na catálise de reações lipolíticas. Essas enzimas são também altamente versáteis, com ampla especificidade para diferentes substratos lipídicos, o que as torna aplicáveis em diversos setores industriais (Martins, 2021). A degradação dos resíduos industriais com capacidade poluente pode ser realizada por processos biotecnológicos, utilizando enzimas microbianas.

Segundo Sharmaa *et al.* (2001), a maioria das lipases microbianas são enzimas extracelulares induzíveis e muitas delas foram purificadas, caracterizadas e seus genes codificadores clonados.

Existem dois principais métodos de produção de lipases: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). Ambos os métodos têm suas vantagens e desafios específicos, e a escolha entre eles depende das características da cepa produtora, das condições de cultivo desejadas e dos recursos disponíveis.

Na fermentação em estado sólido, a produção de lipases ocorre em substratos sólidos, como resíduos agrícolas, bagaço de cana-de-açúcar ou farelos de cereais. Nesse método, os microrganismos são cultivados em condições de baixa atividade de água, impregnando o substrato com nutrientes e água suficientes para o crescimento microbiano. Ao final do processo, as lipases são recuperadas do substrato sólido passam por etapas de purificação. A FES é particularmente adequada para fungos filamentosos, que apresentam boa tolerância a

essas condições (Damasco; Couri, 2021).

De acordo com Damasco e Couri (2021), a fermentação submersa é uma técnica utilizada para produzir a lipase em escala industrial, que consiste no cultivo de microrganismos em um meio líquido. Este método de produção é geralmente mais utilizado em escala industrial devido à sua facilidade de controle dos parâmetros de cultivo. Segundo Pinheiro *et al.* (2007), ela permite um maior rendimento de produção, uma vez que é possível obter altas concentrações de lipase no meio líquido. Isso facilita o processo de extração e purificação da enzima, resultando em uma maior facilidade de obtenção de uma lipase mais pura e com alta atividade enzimática.

Entretanto, antes de escolher o método para produção de enzimas microbianas, é fundamental selecionar os microrganismos que produzem a enzima de interesse. Um método útil para a seleção de microrganismos lipolíticos é o zimograma, que consiste na detecção qualitativa da atividade de lipase secretada em meio sólido contendo ágar, meio de cultivo e substrato no qual se pode observar a formação de halos claros ao redor das colônias, que correspondem às zonas do substrato hidrolisado.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo verificar a produção de enzimas lipolíticas microbianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Selecionar microrganismos produtores de lipase.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Reativar as culturas microbianas do laboratório de Microbiologia da UTFPR-FB;
- ✓ Repicar as culturas microbianas sucessivas vezes até a obtenção de culturas axênicas;
- ✓ Realizar bioensaios qualitativos para caracterizar a produção de lipases;
- ✓ Descrever protocolo para armazenar o microrganismo em temperatura de 4 °C.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Resíduos industriais

Os resíduos industriais são subprodutos gerados pela atividade industrial que não possuem mais utilidade imediata no processo produtivo. Eles podem ser sólidos, líquidos ou gasosos e contêm uma variedade de substâncias que podem ser prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana, logo, é de suma importância ressaltar que a disposição inadequada pode causar poluição de lençóis freáticos, do ar e danos à biodiversidade (Deus; Battistelle; Silva, 2015).

De acordo com a ABNT NBR 10004 (2004), os resíduos industriais são classificados em diferentes categorias. A classe I engloba os resíduos perigosos, que representam riscos tanto para a saúde quanto para o meio ambiente, devido a características como inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade e capacidade patogênica. A classe II abrange os resíduos não inertes, que são biodegradáveis e/ou combustíveis, podendo se decompor naturalmente ou ser utilizados como fonte de energia. Por fim, a classe III é composta pelos resíduos inertes, que não são combustíveis, não se degradam significativamente e não apresentam reações químicas relevantes.

A gestão adequada dos resíduos industriais é essencial para evitar impactos ambientais negativos, pois esses resíduos contêm substâncias tóxicas e poluentes que podem contaminar o solo, água e ar. As indústrias devem adotar medidas para reduzir a geração de resíduos, reutilizar e reciclar materiais quando possível e tratar os resíduos adequadamente antes da disposição final. A adoção de tecnologias mais limpas e processos de produção eficientes é fundamental para minimizar a quantidade de resíduos gerados e seus impactos ambientais. A valorização de resíduos, por meio da reciclagem, recuperação de energia ou transformação em produtos de valor agregado, é uma abordagem promissora que contribui para a redução de resíduos destinados a aterros sanitários e para a economia circular (Pelizer *et al.*, 2007).

3.2 Enzimas microbianas na degradação de resíduos industriais

As enzimas microbianas desempenham um papel fundamental na degradação de resíduos industriais, tornando-os uma parte importante da tecnologia verde. Essas enzimas são produzidas por microorganismos, como bactérias, fungos e leveduras, e possuem a capacidade de catalisar reações químicas específicas (Alencar *et al.*, 2020).

Uma das vantagens das enzimas microbianas é a sua alta especificidade. Cada enzima

tem a capacidade de reconhecer e interagir com um substrato específico, acelerando a sua decomposição ou transformação em produtos mais simples. Essa seletividade das enzimas permite um processo mais eficiente e controlado de degradação dos resíduos industriais, evitando a formação de subprodutos indesejáveis (Zimmer *et al.*, 2009).

Fungos, como por exemplo a *Trichoderma reesei*, são fonte valiosa de celulases e xilanases usadas na indústria de papel e celulose, onde degradam a lignocelulose em matéria-prima (Almeida, 2012). Além disso, o fungo *Aspergillus niger* produz enzimas como amilases e pectinases, que encontram aplicação em processos de produção de alimentos, como na extração de sucos de frutas e na produção de amido modificado (Gomes *et al.*, 2011).

A bactéria *Bacillus subtilis* produz enzimas como proteases, amilases e lipases, que encontram aplicação na indústria de detergentes, onde são eficazes na remoção de manchas de proteína, amido e lipídios (Alves *et al.*, 2018). Por outro lado, *Pseudomonas putida* é uma bactéria conhecida por sua capacidade de degradar compostos orgânicos complexos, como hidrocarbonetos e compostos aromáticos. A produção de enzimas por *Pseudomonas putida* tem sido explorada em biorremediação, contribuindo para a degradação de poluentes industriais no solo e na água (Oliveira e Alves, 2013).

De acordo com Tan *et al.* (2014), a *Candida rugosa* é uma levedura e fonte de lipases amplamente utilizada em processos de síntese de ésteres e na produção de biodiesel. A ação das lipases de *Candida rugosa* ajuda a hidrolisar triacilgliceróis em ácidos graxos, um passo essencial na produção de biocombustíveis. Por outro lado, *Saccharomyces cerevisiae*, é uma levedura que além de sua aplicação na fermentação de alimentos e produção de álcool, também produz enzimas como invertases, usadas em processos de conversão de sacarose em glicose e frutose (Basso, 2011).

Além disso, existem várias aplicações práticas bem-sucedidas dessas enzimas na degradação de resíduos industriais. Por exemplo, no campo da biorremediação, bactérias como *Pseudomonas putida* têm sido utilizadas para limpar áreas contaminadas por hidrocarbonetos. A aplicação de celulases de *Trichoderma reesei* na indústria de papel resultou em processos mais eficientes e na redução do desperdício de matéria-prima. A produção de biodiesel a partir de óleos vegetais com lipases de *Candida rugosa* contribui para uma alternativa mais sustentável aos combustíveis fósseis.

Esses exemplos reforçam a importância das enzimas microbianas na degradação de resíduos industriais, destacando sua eficácia e versatilidade em várias aplicações industriais e ambientais. A contínua pesquisa e desenvolvimento nessa área são essenciais para explorar novas oportunidades e melhorar a eficiência desses processos.

3.2.1 Vantagens e desvantagens do uso das enzimas microbianas

A utilização de enzimas microbianas na degradação de resíduos industriais apresenta uma série de vantagens significativas. Em primeiro lugar, destaca-se a sustentabilidade ambiental desse método. Enquanto muitos processos tradicionais de tratamento de resíduos dependem de produtos químicos agressivos e frequentemente geram resíduos tóxicos, as enzimas trabalham em condições suaves de temperatura e pressão. Essa abordagem reduz substancialmente a pegada ecológica, minimizando a poluição ambiental e diminuindo os impactos negativos na saúde humana (Simões; Consoli, 2020).

Além disso, a eficiência das enzimas é notável. Elas são altamente eficazes em catalisar reações químicas específicas, acelerando a degradação de resíduos industriais de maneira precisa e controlada. Essa eficiência resulta em processos de tratamento mais rápidos, com menor formação de subprodutos indesejados, o que, por sua vez, otimiza o uso dos recursos empregados. Uma vantagem adicional do uso de enzimas microbianas é a capacidade de recuperar materiais valiosos dos resíduos industriais. Certas enzimas têm a habilidade de extrair metais preciosos ou recuperar compostos químicos de interesse, contribuindo para o conceito de economia circular. Nesse modelo, os resíduos são tratados como recursos valiosos, minimizando o desperdício e promovendo a sustentabilidade (Denti, 2021).

No entanto, é importante reconhecer que a utilização de enzimas microbianas na degradação de resíduos industriais também enfrenta desafios. Primeiramente, as enzimas podem ser sensíveis a variações nas condições ambientais, como temperatura e pH. Isso pode exigir a implementação de sistemas de controle mais rigorosos, o que pode aumentar os custos operacionais. Ademais, encontrar ou desenvolver cepas microbianas produtoras de enzimas adequadas para a degradação de resíduos específicos pode ser um desafio, especialmente no caso de resíduos complexos ou contaminados por substâncias químicas adversas. A busca por cepas eficazes pode ser demorada e dispendiosa em termos de tempo e recursos.

A competitividade econômica é uma consideração importante. Comparada aos métodos tradicionais de tratamento de resíduos, a utilização de enzimas microbianas pode enfrentar desafios econômicos, particularmente devido aos custos iniciais de pesquisa e à necessidade de infraestrutura adequada para a produção de enzimas em larga escala. A viabilidade econômica deve ser cuidadosamente avaliada para determinar se essa opção é a mais vantajosa em comparação com outros métodos de tratamento de resíduos (Zimmer *et al.*, 2009).

Em suma, as enzimas microbianas desempenham um papel importante na tecnologia verde, possibilitando a degradação e transformação de resíduos industriais de forma mais sustentável. Essa abordagem oferece benefícios ambientais, econômicos e sociais, promovendo a transição para uma economia mais verde e circular. A contínua pesquisa e inovação nessa área são fundamentais para aprimorar e expandir o uso dessas enzimas, impulsionando a gestão adequada e responsável dos resíduos industriais.

3.3 Lipases

Lipases são enzimas fundamentais que desempenham um importante papel na degradação de lipídios, e são encontradas em diversas fontes naturais. Muitos organismos em ambientes naturais produzem lipases como parte de seus sistemas de degradação de lipídios. Isso inclui bactérias comuns no solo, como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, que contribuem para a decomposição de lipídios presentes na matéria orgânica do solo (Messias *et al.*, 2011).

Além disso, ambientes aquáticos, como rios, lagos e oceanos, são o lar de microrganismos que produzem lipases. Bactérias marinhas e certas espécies de algas contribuem para a degradação de lipídios provenientes de organismos aquáticos ou de matéria orgânica transportada pela água (Roveda *et al.*, 2010).

Os tratos digestivos de animais, incluindo mamíferos como os seres humanos, também abrigam microrganismos que produzem lipases. Essas lipases são essenciais para auxiliar na digestão de gorduras e óleos presentes na dieta, desempenhando um papel vital na absorção de nutrientes. Essas diversas fontes naturais de lipases destacam a importância dessas enzimas em processos biológicos e ecológicos, bem como nas aplicações industriais. A compreensão da origem natural das lipases é fundamental para pesquisas relacionadas à seleção de cepas produtoras e ao desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas.

Claude Bernard foi um dos primeiros cientistas a investigar a fisiologia da digestão de gorduras no século XIX. Suas descobertas iniciais levaram a uma série de estudos subsequentes sobre a digestão de gorduras, incluindo a descoberta da lipase pelo químico francês Eugene Chevreul, desde então, a lipase tem sido objeto de intensa pesquisa em uma variedade de campos. Neste contexto, é importante entender a história e a evolução do estudo da lipase para apreciar completamente sua importância em diversas aplicações (Ferrarezi, 2011).

Com o avanço da biotecnologia, a lipase começou a ser produzida em larga escala a partir de microrganismos como bactérias e fungos, permitindo sua utilização em diversas

indústrias. Desde então, a lipase tem sido objeto de estudo em vários campos, incluindo biologia molecular, bioquímica e biotecnologia (Souza, 2015).

Além disso, a lipase é usada na produção de medicamentos e produtos cosméticos, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e regenerativas na pele. Na indústria de detergentes, a lipase é usada para ajudar a remover manchas de gordura e óleo de tecidos e superfícies. Com o avanço da biotecnologia, há cada vez mais empresas produzindo lipases em escala industrial, o que tem contribuído para o desenvolvimento de novas aplicações para essa enzima (Garrido *et al.*, 2018).

Ademais, de acordo com Garrido (2018), atualmente a lipase é utilizada na produção de biodiesel a partir de óleos vegetais, sendo considerada um fator chave para a viabilidade desse tipo de combustível renovável. Além disso, a enzima também é empregada em processos de síntese de compostos químicos, como ésteres e polímeros.

Existem diferentes técnicas de fermentação utilizadas na produção de lipase, como fermentação submersa, fermentação em estado sólido e fermentação em batelada alimentada. A técnica mais utilizada é a fermentação submersa, que consiste em cultivar o microrganismo em meio líquido com agitação e aeração (Pinheiro *et al.*, 2008).

A produção de lipase por fermentação submersa é influenciada por vários fatores, como a cepa produtora, a composição do meio de cultivo e as condições de cultivo. Otimizar esses fatores pode aumentar a produtividade e a qualidade da enzima produzida. Esta técnica se mostra eficiente e escalável para a produção de lipase, sendo amplamente utilizada na indústria de biotecnologia. É uma técnica relativamente simples e de baixo custo, o que a torna uma opção atraente para a produção de enzimas em larga escala (Roveda *et al.*, 2010).

3.4 Produção de lipase por microrganismos

A produção de lipase por microrganismos envolve diversos processos, desde a seleção da cepa produtora até a extração e purificação da enzima produzida. A seguir, serão descritos os principais processos envolvidos na produção de lipase.

3.4.1 Seleção da cepa produtora

A etapa de seleção da cepa produtora de lipase é de vital importância no processo de produção de enzimas e desempenha um papel fundamental na determinação do sucesso e eficácia do processo. Para selecionar a cepa ideal, são necessárias considerações minuciosas, uma vez que a escolha inadequada pode impactar negativamente a produtividade e a qualidade

da lipase produzida. Esta fase requer uma análise cuidadosa e avaliação de diversos fatores (Bueno, 2012).

Primeiramente, a atividade enzimática é um dos principais critérios a serem considerados na seleção da cepa produtora. É crucial que a cepa escolhida exiba uma alta atividade enzimática, o que se traduzirá em uma maior produtividade da lipase. A atividade enzimática é uma medida da capacidade da cepa de produzir a enzima em quantidades suficientes para atender às necessidades da aplicação industrial (Garrido *et al.*, 2018).

Outro fator é a viabilidade da cepa em escala industrial. A cepa selecionada deve ser capaz de crescer e se reproduzir em larga escala, o que é essencial para um cultivo econômico e eficiente. Isso envolve a capacidade da cepa de se adaptar a condições de cultivo específicas e manter seu desempenho ao longo do tempo. Uma cepa que não possa ser ampliada com eficácia em condições industriais não será adequada para a produção de lipase em escala comercial (Souza, 2015).

A capacidade de adaptação da cepa às condições de cultivo também é um fator crítico na seleção. As condições de cultivo podem variar amplamente com base na aplicação e no processo industrial específico. Portanto, a cepa produtora deve ser capaz de se ajustar a essas condições variáveis, mantendo sua atividade enzimática e produtividade em níveis ótimos. A adaptabilidade da cepa é essencial para garantir que o processo de produção de lipase seja robusto e confiável em ambientes industriais em constante mudança.

3.4.2 Preparo do meio de cultura

A etapa de preparo do meio de cultura é de suma importância no processo de produção de lipase, pois fornece os nutrientes essenciais necessários para o crescimento e desenvolvimento da cepa produtora. A seleção criteriosa dos componentes do meio de cultura é um fator determinante para garantir que a cepa atinja seu potencial máximo de produção de lipase (Gonçalves, 2007).

Em relação às fontes de carbono, a escolha é um aspecto crítico. Em seus estudos, Cortez, Castro e Andrade (2017) destacam que a maioria das cepas produtoras de lipase pode utilizar açúcares, como glicose ou sacarose, como fonte de carbono esses açúcares são prontamente metabolizados pelos microrganismos, fornecendo a energia necessária para a biossíntese da enzima. No entanto, em algumas cepas, especialmente aquelas especializadas na produção de lipase, os óleos vegetais podem ser a preferência. Isso ocorre porque os óleos são substratos mais adequados para estimular a produção de lipase, dada sua afinidade por lipídios.

Portanto, a escolha da fonte de carbono depende da cepa utilizada e de seu comportamento metabólico específico.

As fontes de nitrogênio são vindas de componentes como extratos de levedura, caseína ou peptona são frequentemente utilizados. Roveda *et al.* (2010) destacam a importância da seleção adequada de fontes de nitrogênio, uma vez que afeta a produção de lipase. Isso ocorre porque essas fontes de nitrogênio fornecem aminoácidos e outros nutrientes que podem influenciar diretamente a expressão dos genes relacionados à síntese da enzima. Portanto, a escolha cuidadosa desses componentes é essencial para otimizar a produção de lipase.

Além disso, outros fatores, como o pH e a concentração de sais, também desempenham um papel na eficácia do meio de cultura. O pH adequado deve ser mantido para atender às necessidades metabólicas da cepa produtora de lipase. Variações no pH podem afetar negativamente o crescimento e a produtividade da cepa. A concentração de sais, como fosfatos e sulfatos, deve ser monitorada, pois pode impactar o equilíbrio osmótico e os processos bioquímicos da cepa.

3.4.3 Inoculação

A etapa de inoculação desempenha um papel de destaque no processo de produção de lipase, uma vez que marca o ponto de partida para o crescimento e a produção da enzima pela cepa selecionada. Para assegurar o sucesso dessa fase, é preciso determinar a quantidade adequada de células a serem inoculadas no meio de cultura. Um equilíbrio preciso deve ser mantido, uma vez que a inoculação em excesso ou insuficiente pode impactar negativamente a qualidade da lipase gerada (Roveda *et al.*, 2010).

Além da quantidade de células, a manutenção de condições ideais no meio de cultura é fundamental para o crescimento eficiente da cepa produtora de lipase. Reinehr *et al.* (2014) ressaltam a importância de fazer o controle da temperatura, geralmente mantida entre 25 e 37 °C, e a regulação adequada do pH, variando conforme a cepa utilizada. A agitação do meio de cultura desempenha um papel essencial na homogeneização da mistura, garantindo a distribuição uniforme de nutrientes para as células. O período de incubação do meio de cultura é outro parâmetro a ser considerado, variando de acordo com a cepa e as condições de cultivo, geralmente durando de alguns dias a algumas semanas. Durante essa fase, ocorre o crescimento celular e a produção da lipase.

3.5 Aplicações da lipase

A lipase é uma enzima extremamente versátil, com ampla aplicação em diferentes setores da indústria. Uma das principais aplicações da lipase é na indústria alimentícia. Essa enzima é amplamente utilizada na produção de queijos, onde é responsável por acelerar a maturação e melhorar a textura e sabor do produto. A lipase também é utilizada na produção de óleos e gorduras alimentícias, onde é utilizada para hidrolisar os triacilgliceróis em ácidos graxos livres, melhorando a qualidade dos óleos e aumentando sua estabilidade (Colla *et al.*, 2012).

Na indústria farmacêutica, a lipase tem aplicação em processos de síntese de moléculas bioativas, como ésteres de ácidos graxos, ésteres de sacarose e aminoácidos. A enzima também é utilizada na produção de medicamentos, como emulsificantes e surfactantes. Na indústria cosmética, a lipase é utilizada na produção de sabonetes e cremes, onde é responsável por hidrolisar as gorduras e melhorar a textura e o aroma dos produtos (Rocha *et al.*, 2022).

A lipase também é utilizada na indústria de detergentes, onde é utilizada para remover manchas e sujeiras de roupas e tecidos.

Por fim, a lipase tem uma aplicação promissora na produção de biocombustíveis. A enzima é utilizada para hidrolisar os triacilgliceróis presentes em óleos vegetais, produzindo ácidos graxos que podem ser transformados em biodiesel. A utilização de lipases em processos de produção de biocombustíveis tem sido considerada uma alternativa mais eficiente e econômica em relação aos processos químicos tradicionais (Baratto *et al.*, 2018).

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Microrganismos

As espécies microbianas utilizadas neste estudo, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, foram obtidas a partir do acervo do Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Francisco Beltrão. Para garantir a sua viabilidade e atividade, essas espécies foram armazenadas em condições de refrigeração, mantidas a uma temperatura constante de 4 °C. Os microrganismos foram acondicionados em tubos de ensaio que contêm meios de cultura específicos, cuidadosamente selecionados para atender às necessidades de cada grupo microbiano. O principal propósito de manter os microrganismos sob refrigeração é a preservação de sua integridade e capacidade de crescimento ao longo do tempo, garantindo assim o seu desempenho durante as etapas subsequentes do processo de produção de lipase.

4.2 Reativação das culturas microbianas

A reativação das culturas microbianas foi realizada em condições estritamente assépticas para garantir a pureza das amostras. Para a reativação de bactérias, foi utilizado o meio de cultura conhecido como Caldo Nutriente.

Inicialmente, adicionou-se 1% (m/v) do inóculo contendo as bactérias ao meio de cultura correspondente. Em seguida, o meio de cultura foi homogeneizado para garantir a dispersão uniforme dos microrganismos. Realizou-se a incubação em câmara incubadora com agitação orbital, conhecida como shaker, a uma temperatura de 37 °C. A agitação foi feita a 100 rpm e o período de incubação foi de 24.

Após o período de incubação, as alíquotas do inóculo foram transferidas de forma asséptica utilizando alças de platina para meios de cultura sólidos específicos. Para bactérias foi empregado o meio de cultura Plate Count Ágar (PCA). Nesses meios de cultura sólidos, foram realizadas estrias compostas para promover o crescimento de colônias isoladas.

As placas de Petri contendo as estrias compostas foram incubadas em condições adequadas de temperatura. As placas foram colocadas em uma estufa bacteriológica a 37°C. As incubações tiveram duração de 48 horas.

Após o período de incubação, as colônias isoladas que se desenvolveram nas placas foram selecionadas e utilizadas para os testes enzimáticos específicos. Esse processo de reativação e isolamento das culturas garante que apenas os microrganismos desejados, livres de

contaminação, sejam utilizados nos experimentos subsequentes.

4.3 Bioensaios para a determinação da atividade enzimática

O teste qualitativo de atividade de lipases em meio com o corante rodamina B foi realizado em placas de Petri seguindo o método modificado de Kouker e Jaeger (1987). Nesse método, as lipases são enzimas responsáveis pela quebra de lipídios, e a atividade dessas enzimas pode ser avaliada utilizando o corante rodamina B, que é sensível à ação das lipases. Quando as lipases estão ativas e presentes no meio de cultura, elas catalisam a hidrólise dos lipídios presentes, liberando ácidos graxos que reagem com o corante rodamina B, resultando em uma mudança de cor na placa de Petri.

O meio de cultura utilizado foi composto por rodamina B a uma concentração de 0,001% (m/v), caldo nutriente (8 g/L), NaCl (4 g/L), ágar (10 g/L) e óleo de soja a 2,5% (m/v). As culturas microbianas em condição de cultura axênica (livres de contaminação) foram inoculadas individualmente no centro de cada placa de Petri contendo o meio de cultura. Em seguida, as placas foram incubadas em temperatura de 37 °C por 48 horas.

Após o período de incubação, as placas foram analisadas sob luz ultravioleta. A presença de fluorescência alaranjada nos meios de cultura quando expostos à luz ultravioleta indicará uma reação enzimática, caracterizada pela ativação interfacial. Essa fluorescência é resultado da ação das lipases presentes nos microrganismos sobre a rodamina B, que é um substrato para essa enzima.

Para garantir a confiabilidade dos resultados, os testes foram realizados em triplicata.

4.4 Protocolo para armazenamento dos microrganismos em temperatura de 4 °C

O armazenamento dos microrganismos em temperatura de 4 °C é um protocolo comumente utilizado para manter a viabilidade e a estabilidade das culturas microbianas a curto prazo. Esse método é amplamente adotado em laboratórios de microbiologia e instituições de pesquisa para conservar as culturas por um período limitado, geralmente de algumas semanas a alguns meses, porém, caso seja necessário armazenar as culturas por períodos mais longos, é recomendado o uso de outros métodos, como a conservação em nitrogênio líquido ou em freezer a -80°C (Sola, 2011).

Para o armazenamento dos microrganismos em temperatura 4 °C, é necessário preparar adequadamente os meios de cultura específicos para cada grupo microbiano. Os

microrganismos são cultivados nesses meios de cultura em tubos de ensaio ou frascos adequados e incubados em temperatura adequada para seu crescimento e metabolismo.

Após o período de incubação, os microrganismos são transferidos para a temperatura de 4 °C, geralmente em geladeiras dedicadas para essa finalidade. Essas geladeiras são mantidas em condições controladas, com temperatura estável e livre de contaminação

5 RESULTADOS

5.1 Reativação das Culturas Microbianas

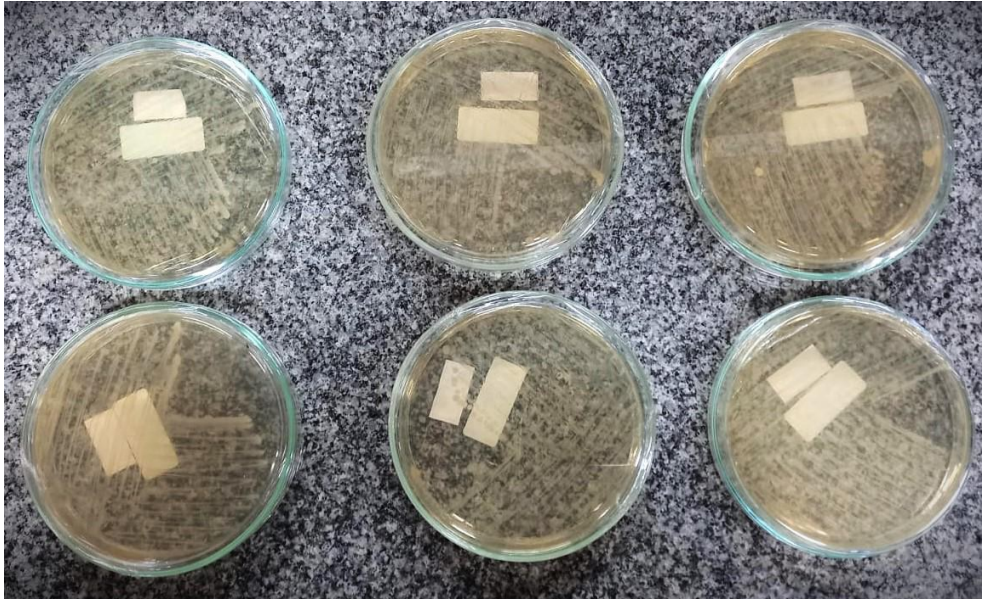
Os resultados da reativação das culturas microbianas mostraram uma resposta altamente positiva ao protocolo. Após o período de incubação delineado, foi possível observar um crescimento robusto e vigoroso nas placas de Petri, indicando a restauração bem-sucedida da atividade metabólica dos microrganismos.

As estrias compostas efetuadas nos meios de cultura sólidos revelaram colônias isoladas distintas, cada uma exibindo características morfológicas específicas. No meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), reservado para as leveduras, as colônias apresentaram um crescimento notável, destacando-se pela sua aparência única. De maneira similar, para as bactérias, o crescimento vigoroso foi observado no meio de cultura Plate Count Ágar (PCA), evidenciando a adaptação e revitalização bem-sucedida desses microrganismos.

As incubações sob condições de temperatura específica – 37 °C para bactérias – proporcionaram ambientes ideais para o desenvolvimento das culturas. Após 48 horas de incubação, as colônias isoladas foram meticulosamente selecionadas para os subseqüentes testes enzimáticos específicos, consolidando a confiabilidade dos microrganismos reativados.

Em seguida, serão apresentadas imagens das placas de petri, evidenciando visualmente os resultados obtidos durante o processo de reativação. As imagens da Fotografia 1 oferecem uma representação visual clara do crescimento e desenvolvimento das culturas.

Fotografia 1 - Reativação das culturas microbianas



Fonte: Autoria própria (2023)

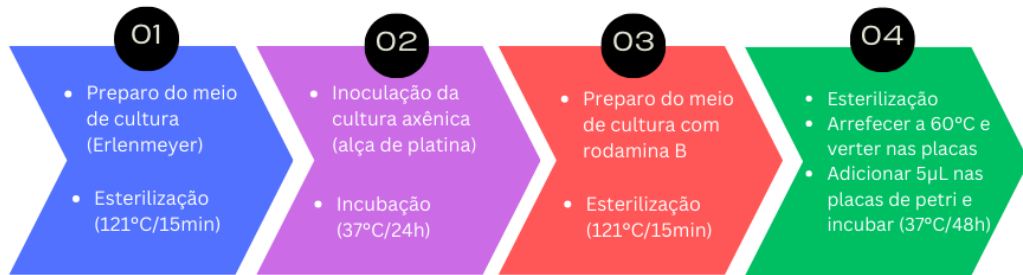
Essa etapa crítica do processo foi conduzida com sucesso, confirmando a viabilidade das culturas, bem como sua capacidade de se desenvolverem e manterem sua atividade metabólica essencial, preparando-as de maneira ideal para as análises subsequentes.

O sucesso da reativação das culturas é de grande importância, pois impacta diretamente os resultados dos ensaios subsequentes, especialmente aqueles relacionados à atividade enzimática. Cepas de microrganismos saudáveis e ativas são cruciais para a produção de enzimas, que desempenham um papel significativo em várias aplicações biotecnológicas e industriais.

5.2 Bioensaios com rodamina B

Para oferecer uma visão abrangente do processo dos testes qualitativos, foi criado um fluxograma (Figura 2) simplificado do método de Kouker e Jaeger (1987) utilizado no bioensaio para a determinação da atividade enzimática.

Figura 2 - Método Koukler e Jeager modificado

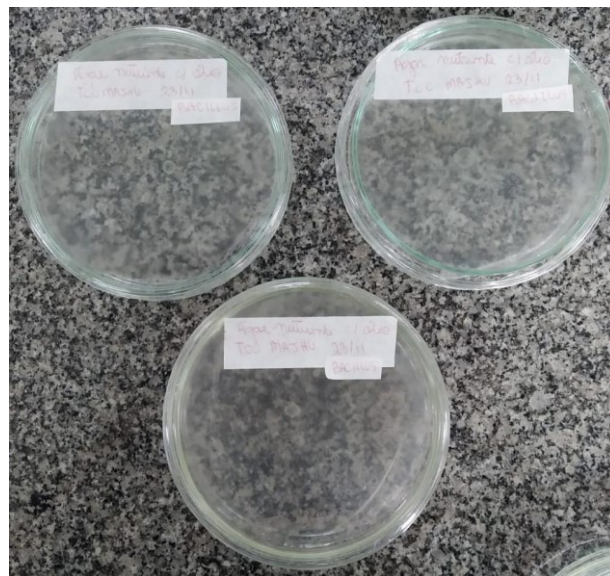


Fonte: Autoria própria (2023)

De acordo com as condições experimentais e com base nos resultados verificou-se que, apesar do método de Koukler e Jeager (1987) ser considerado específico para detectar lipases e ser reconhecido pela sua eficácia,, a atividade lipolítica das bactérias testadas não foi evidenciada.

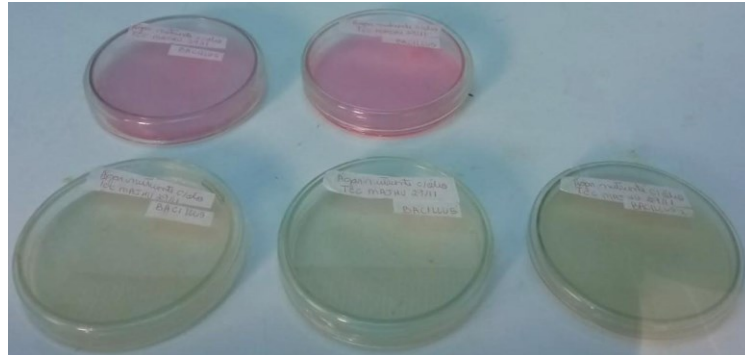
A fotografia 2 com concentração de rodamina B de 0,001% (m/v) mostra o crescimento de *Bacillus sp.* entretanto, não foi evidenciada a atividade lipolítica representada por halos fluorescentes. A fotografia 3 com concentração de rodamina B de 0,1% (m/v), mostra a coloração rosa do meio de cultura mais intensa, mas não evidencia o crescimento de *Bacillus sp.* o que leva a acreditar que provavelmente a rodamina B em concentrações de 0,1% inibe o seu crescimento.

Fotografia 2 - Produção de lipase por *Bacillus sp.* com concentração de 0,001%(m/v)



Fonte: Autoria Própria (2023).

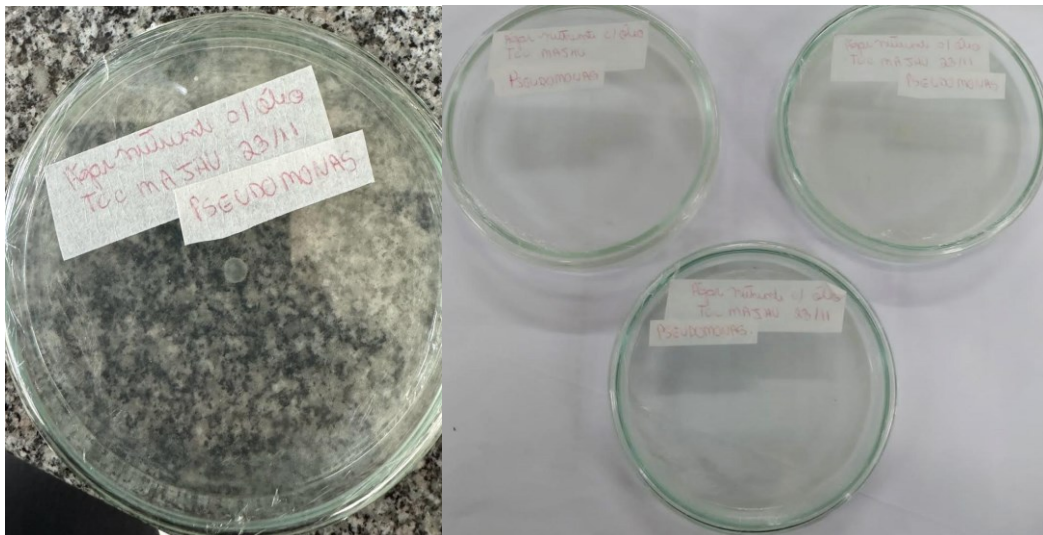
Fotografia 3 - Placas de Petri com rodamina B em concentração de 0,1% (m/v) e 0,001%(m/v)



*placas de coloração rosa referem-se à concentração de 0,1% (m/v) e as mais claras de 0,001% (m/v)
Fonte: Autoria Própria (2023).

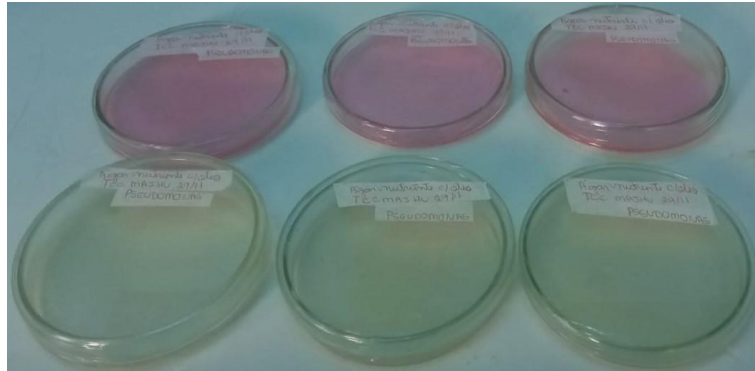
A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* apresentada na Fotografia 4 com concentração de rodamina B de 0,001% (m/v) mostra seu crescimento, entretanto, também não foi evidenciada a atividade lipolítica. A fotografia 6 com concentração de rodamina B de 0,1% (m/v), mostra a coloração rosa do meio de cultura, mas não evidencia o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, o que indica que provavelmente a rodamina B em concentrações de 0,1% também inibe o seu crescimento.

Fotografia 4- Produção de lipase por *P. aeruginosa* com concentração de 0,001% (m/v)



Fonte: Autoria Própria (2023).

Fotografia 5 - Produção de lipase por *P. aeruginosa* com concentração de 0,001% (m/v) e 0,1% (m/v)

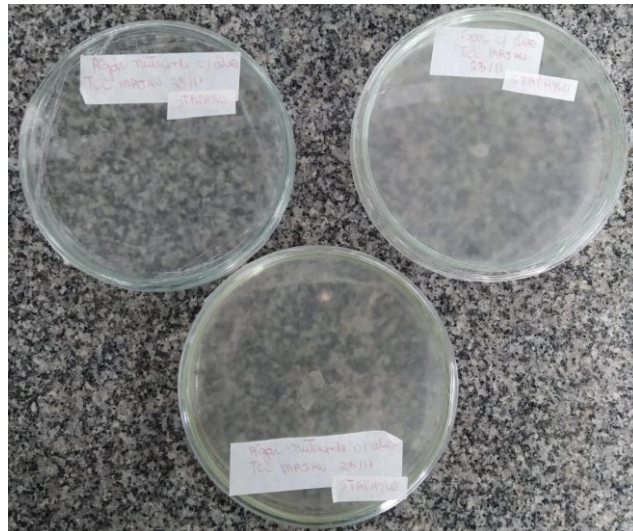


*placas de coloração rosa referem-se à concentração de 0,1% (m/v) e as mais claras de 0,001% (m/v)

Fonte: Autoria Própria (2023).

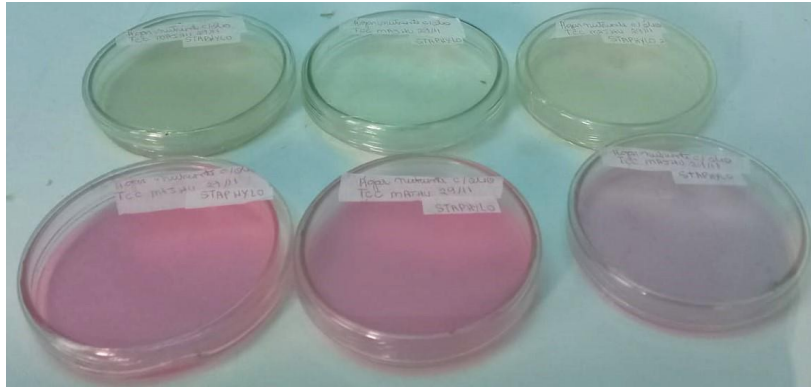
A cepa de *Staphylococcus aureus* apresentada na Fotografia 6 com concentração de rodamina B de 0,001% (m/v) mostra seu crescimento, entretanto, igualmente não foi evidenciada a atividade lipolítica. A fotografia 7 com concentração de rodamina B de 0,1% (m/v), mostra a coloração do meio de cultura mais intensa, mas não evidencia o crescimento de *Staphylococcus aureus*, o que indica que provavelmente a rodamina B em concentrações de 0,1% também inibe o seu crescimento.

Fotografia 6 - Produção de lipase por *S. aureus* com concentração de 0,001% (m/v)



Fonte: Autoria Própria (2023).

Fotografia 7 - Produção de lipase por *S. aureus* com concentração de 0,001% (m/v) e 0,1% (m/v)



*placas de coloração rosa referem-se à concentração de 0,1% (m/v) e as mais claras de 0,001% (m/v)

Fonte: Autoria Própria (2023).

De acordo com os resultados apresentados pode-se inferir que a ausência de atividade lipolítica nas bactérias testadas pode ser atribuída a diversos fatores, destacando-se considerações metabólicas, nutricionais e genéticas.

A concentração de 0,001% de rodamina B, utilizada como indicador na detecção de atividade enzimática, pode não ter sido suficiente para expressar a atividade lipolítica. Além disso, também a quantidade de óleo de soja pode não ter sido uma boa fonte de carbono para as cepas testadas.

De acordo com Ghori, Iqbal e Hameed (2011), a produção de lipase pode ser altamente dependente das condições de cultivo, incluindo a presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Logo, a falta de halos fluorescentes nos bioensaios pode refletir a necessidade de otimização das fontes nutricionais no meio de cultura para induzir a expressão da lipase.

Segundo Gonçalves de Goulart (2021), a bactéria *P. aeruginosa* pode apresentar variações significativas em seu genoma, impactando a expressão de enzimas específicas. É sabido que as variações de genomas ocorrem também em outras espécies microbianas, principalmente quando ocorre a reprodução sexuada, onde há troca de material genético. Portanto, é importante reconhecer que diferentes cepas de uma mesma espécie bacteriana podem apresentar variações genéticas significativas. Essas variações, possivelmente presentes nas cepas bacterianas testadas, podem impactar diretamente a expressão da lipase, resultando na ausência da atividade lipolítica observada nos bioensaios.

5.3 Protocolo de armazenamento dos microrganismos

O protocolo para o armazenamento de microrganismos a 4°C compreendeu uma série de passos, destinados a assegurar a preservação eficaz das culturas microbianas. Inicialmente, é essencial definir o meio de cultura específico para prover os nutrientes essenciais ao crescimento dos microrganismos. A subsequente inoculação dos microrganismos nos meios de cultura, realizada em placas de petri e tubos de ensaio adotando práticas assépticas rigorosas e condições ideais de tempo e temperatura, proporcionando um ambiente propício para o crescimento e a multiplicação dos microrganismos, foi executada com precisão, assegurando um cultivo axênico.

Após o período de incubação, as culturas bacterianas foram preparadas para o armazenamento em temperatura de 4°C. Para tal, adicionou-se o glicerol (40%) nos tubos de ensaio e escolheu-se a geladeira designada para armazenamento de culturas microbianas do laboratório de microbiologia da UTFPR.

Após esse procedimento as culturas ficarão viáveis por períodos maiores que 30 dias, fazendo-se necessário o monitoramento da temperatura da geladeira. Para assegurar a viabilidade das culturas bacterianas, é importante fazer a repicagem desses microrganismos para meios de cultura novos de tempos em tempos, de acordo com a necessidade.

6 CONCLUSÃO

A reativação das culturas microbianas foi bem-sucedida, evidenciando crescimento robusto nas placas de Petri e a restauração eficaz da atividade metabólica dos microrganismos. A seleção de colônias isoladas consolidaram a confiabilidade dos microrganismos, preparando-os adequadamente para análises subsequentes.

Nos bioensaios com rodamina B, apesar da especificidade do método de Kouker e Jaeger (1987) para detectar lipases, as bactérias *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* não apresentaram atividade lipolítica o que pode ser atribuída a diversos fatores, destacando-se características metabólicas, nutricionais e genéticas. A sensibilidade às concentrações de rodamina B sugere a necessidade de otimização, enquanto considerações metabólicas e nutricionais influenciam os resultados.

Quanto ao protocolo de armazenamento dos microrganismos, a escolha cuidadosa de meios de cultura, a inoculação asséptica e o armazenamento a 4°C foram eficientes. A possibilidade de armazenamento prolongado e a necessidade de repicagem periódica garantem a continuidade das culturas para estudos futuros.

Para a continuidade desta pesquisa, sugere-se uma abordagem multifacetada. Primeiramente, a otimização dos bioensaios com rodamina B, considerando diferentes concentrações do indicador e variações nas fontes de carbono, pode esclarecer as razões subjacentes à ausência de atividade lipolítica observada. A investigação mais aprofundada das condições de cultivo, incluindo a variação de nutrientes, temperatura e tempo, pode revelar informações importantes para a expressão da lipase. Além disso, a análise genética das cepas bacterianas pode oferecer uma compreensão mais detalhada das variações genéticas que podem influenciar a atividade lipolítica. Paralelamente, a aplicação dessas culturas reativadas em contextos biotecnológicos específicos, como produção de enzimas, pode ampliar a relevância prática desses microrganismos. Essas abordagens combinadas podem contribuir para uma compreensão mais abrangente e aplicável dos microrganismos estudados, destacando caminhos potenciais para avanços significativos em aplicações industriais e biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ABNT NBR 10004. Norma Brasileira nº 10004, de 2004. Resíduos Sólidos: Classificação. Rio de Janeiro, RJ, Disponível em: <https://analiticaqmresiduos.paginas.ufsc.br/files/2014/07/Nbr-10004-2004-Classificacao-De-Residuos-Solidos.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- ALENCAR, Viviane do Nascimento e Silva et al. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: uma alternativa promissora e sustentável na produção de enzimas por microrganismos. In: CIAGRO, 27., 2020, Recife. CIAGRO 2020. Recife: Ciagro, 2020. p. 1-16.
- ALMEIDA, Maria Clara de Oliveira e. **Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variabile* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos**. 2012. 145 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina – Ufsc, Florianópolis, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/100563>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- ALVES, K. C. S. et al. Bacillus subtilis: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia, Online**, v. 7, n. 2, p. 15-23, jan. 2018. Disponível em: <http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2018/05/v7-n2-b15-b23-2018.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- BARATTO, C. M.; ALMEIDA, C. A. de; DEBASTIANI, P. **Otimização do cultivo de microrganismos produtores de lipase para aplicação na produção de biodiesel**. Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE), [S. l.], 2018. Disponível em: <https://periodicos.unoesc.edu.br/siepe/article/view/18670>. Acesso em: 28 jun. 2023.
- BASSO, T. Ol. **Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva**. 2011. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.87.2011.tde-14092011-153623>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- BORKAR, P. S. et al. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* srt 9. **Brazilian Journal Of Microbiology**. India, p. 358-366. mar. 2009.
- COLLA, L. M. et al. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista Ciatec – Ufpf**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 1-14, jan. 2012. Disponível em: <https://repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/4491/Aplica%c3%a7%b5es%20e%20produ%c3%a7%a3o%20de%20lipases%20microbianas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 7 maio 2023.
- DENTI, A. F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Perspectiva**, Erechim, v. 45, n. 165, p. 97-110, set. 2021.
- DEUS, R. M., BATTISTELLE, R. A. G., & SILVA, G. H. R. (2015). Resíduos sólidos no Brasil: contexto, lacunas e tendências. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 20(4), 685–698. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522015020040129347>
- DEUS, R. M.; BATTISTELLE, Rosane Aparecida Gomes; SILVA, Gustavo Henrique Ribeiro. Resíduos sólidos no Brasil: contexto, lacunas e tendências. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 685-698, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

<http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522015020040129347>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUARIA. 102: Coleções de culturas microbianas no sistema nacional de pesquisa agropecuária. Brasília - Df: Giscard Matos, 2003. 41 p.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H.. PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CLONAGEM E APLICAÇÃO DE ENZIMAS LÍTICAS. *Quim. Nova*, Campinas - Sp, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

GARRIDO, J. V. M. L. et al. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase e otimização da produção enzimática. *Scientia Plena*, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1-9, 23 jul. 2018. Associação Sergipana de Ciência. <http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2018.064207>.

GHORI, M. I.; IQBAL, M. J.; HAMEED, A. Characterization of a novel lipase from bacillus sp. Isolated from tannery wastes. *Brazilian Journal Of Microbiology*. Islamabad, Pakistan., p. 22-29, 2011.

GOMES, Jonaina et al. **Efeito das condições de cultivo na produção de pectinases por *Aspergillus niger* ATCC 9642**. In: SIMPÓSIO DE ALIMENTOS, 7., 2011, Passo Fundo - Rs. Engenharia de Alimentos. Passo Fundo - Rs: [S.I.], 2011. v. 7, p. 1-7.

GONÇALVES, B. S.; GOULART, N. S. S. **Principais aspectos da *Pseudomonas aeruginosa* – revisão bibliográfica**. 2021. 25 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas - Modalidade Médica, da Escola de Ciências Médica, Farmacêuticas e Biomédicas, Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia – Go, 2021.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [S.L.], v. 64, n. 6, p. 763-781, 1 jun. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>.

HASAN, F. et al. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme And Microbial Technology*, Islamabad, Pakistan, p. 235-251, out. 2005.

JACOBSEN, T.; POULSEN, O. M. Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biochimica Et Biophysics Acta*, [s. l], v. 1, n. 11, p. 96-102, mar. 1995.

MATES, A.; SUDAKEVITZ, D. Produção de Lipase por *Staphylococcus aureus* sob Várias Condições de Crescimento, *Journal of Applied Bacteriology*, Volume 36, Edição 2, 1 de junho de 1973, Páginas 219–226, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1973.tb04094.x>

MARTINS, P. A. **Lipases microbianas: prospecção, produção e aplicação**. 2021. 290 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.repositorio.unb.br/handle/10482/41941>. Acesso em: 05 jun. 2023.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, [S.I.], v. 32, n. 2, p. 213-234, jan. 2013. Disponível em: DOI: 10.5433/1679-0375. Acesso em: 10 nov. 2023.

MLADENOSKA, I. Isolamento e purificação de lipases de *Geotrichum Candidum* cultivado em Resíduos de Óleo de Girassol como Fonte de Carbono. *Transações de Engenharia Química*, República da Macedônia, p. 49-54, dez. 2014.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, [s. l], v. 1, n. 1, p. 9-24, jan. 2009. Semestral. Disponível em: http://ojs.rpqsenai.org.br/index.php/rpq_n1/article/view/83/70. Acesso em: 10 jun. 2023.

OLIVEIRA, D. M.. **Atividade de enzimas proteolíticas de diferentes espécies microbianas**. 2017. 34 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2017. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/11433/1/FB_COEAM_2017_2_01.pdf. Acesso em: 10 maio 2023.

OLIVEIRA, J. V. G. Comparação do potencial da enzima lipase frente a catalisadores homogêneos na reação de transesterificação para produção de biodiesel. **Revista Integralização Universitária**, Palmas, v. 13, n. 21, p. 158-171, jul. 2019.

OLIVEIRA, R. M.; ALVES, F. Diversidade Microbiana Utilizada na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Derivados. **Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, [S.L.], v. 3, n. 5, p. 1-14, 30 jun. 2013. Instituto Metodista Izabela Hendrix. <http://dx.doi.org/10.15601/2238-1945/pcnb.v3n5p1-14>.

PELIZER, L. H. et al. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal Of Technology Management & Innovation** © Jotmi Research Group. Chile, p. 118-127. jan. 2007.

PRAXEDES, L. S. et al. A participação dos catalisadores biológicos na otimização de processos industriais. **Meta**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 407-413, jan. 2016. Anual. Disponível em: <https://www.seer.dppg.cefetmg.br/index.php/revistadameta/article/view/885/719>. Acesso em: 10 jun. 2023.

QUEISSADA, D. D.; SILVA, J. A. Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 271, 9 abr. 2020. Lepidus Tecnologia. <http://dx.doi.org/10.14295/holos.v20i2.12378>. Disponível em: <https://holos.emnuvens.com.br/holos/article/view/12378/8288>. Acesso em: 05 jun. 2023.

RABBANI, M., BAGHERINEJAD, M. R., SADEGHI, H. M., SHARIAT, Z. S., ETEMADIFAR, Z., MOAZEN, F., RAHBARI, M., MAFAKHER, L., ZAGHIAN, S. Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44(4), 1113–1119. 2013 <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000400013>

REINEHR, C. O., RIZZARDI, J., SILVA, M. F., OLIVEIRA, D. D., TREICHEL, H., COLLA, L. M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions. **Química Nova**, 37(3), 454–460, 2014. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140077>

ROCHA, A. C. P.; ROCHA, A. S.; SILVEIRA, R. L.; OLIVEIRA, M. M. C.; KATO, K. C.; BENASSI, V. M. Lipases na indústria farmacêutica: estudo de revisão sobre sua aplicação na síntese de fármacos. **Ciências Farmacêuticas Integrada Ao Processo de Cuidado em Saúde** 2, [S.L.], p. 140-152, 18 maio 2022. Atena Editora. <http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.07022180512>.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por

diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 126–131, jan. 2010.

SACCO, L. P.. **Potencial de isolados bacterianos para uso em processos biotecnológicos e agroindustriais**. 2017. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2017.

SHARMA, R. et al. Produção, purificação, caracterização e aplicações de lipases. **Biotechnology Advances**, Palmerston North, Nova Zelândia, p. 627-662, jan. 2001.

SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JONES JUNIOR, J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 103-110, fev. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000100019>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gS7t9QZV77mjSt4qLwwYCLf/?lang=pt>. Acesso em: 10 jun. 2023.

SIMÕES, C. M. F.; CONSOLI, K. Potencial das enzimas microbianas para a indústria. In: Anais do CONIGRAN 2020 - Congresso Integrado UNIGRAN Capital. Anais.Campo Grande(MS) UNIGRAN Capital, 2020. Disponível em: <<https://www.even3.com.br/anais/conigran2020/246899-POTENCIAL-DAS-ENZIMAS-MICROBIANAS-PARA-A-INDUSTRIA>>. Acesso em: 13/06/2023 23:16

SOLA, M. C. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade**. 2011. 34 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia, A Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/semi2011_Marilia_Cristina_2.pdf. Acesso em: 19 maio 2023.

SOUSA, B. R. et al. Técnicas de obtenção, manutenção e reativação de culturas microbianas. **Journal Of Medicine And Health Promotion**. Paraíba, p. 827-842. out. 2017. Disponível em: <https://jmhp.fiponline.edu.br/pdf/cliente=13-d21211d9f51ce138ae00e1cf0d867379.pdf>. Acesso em: 06 maio 2023.

SOUZA, O C. **Produção de lipases por culturas de *Trichosporon* da micoteca urm: seleção, produção, purificação e aplicação enzimática**. 2015. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia de Fungos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.L.], v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 5 dez. 2012. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n6p2267>.

TAN, Z. et al. Production of Biodiesel Catalyzed by *Candida rugosa* Lipase at Interface of w/o Microemulsion System. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], p. 1704-1711, jan. 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140165>.

ZIMMER, K. R. et al. **Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico**. 2009. 15 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/b24a/c73ee0d6f28ab4b99580f49a8a70b5cb85c7.pdf>. Acesso em: 20 maio 2023.