

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Naiani Menezes da Silva

**ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ACTINOBATÉRIAS FRENTE A
DIFERENTES A ÓLEOS VEGETAIS**

Porto Alegre

2016

NAIANI MENEZES DA SILVA

ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ACTINOBATÉRIAS FRENTE A
DIFERENTES A ÓLEOS VEGETAIS

Trabalho de Conclusão apresentado como requisito para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências biológicas.

Orientação: Prof^a Dr . Sueli Teresinha Van Der Sand

Porto Alegre

2016

“Quem acredita sempre alcança”

Renato Russo

ARTIGO CIENTÍFICO:

Trabalho de conclusão em Ciências Biológicas elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Biociências.

Atividade lipolítica de actinobactérias frente a diferentes a óleos vegetais

Naiani Menezes da Silva ^{1*}, Sueli Teresinha Van Der Sand ²

¹**Acadêmico do curso de Ciências Biológicas.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 900500-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

² **Docente Orientador.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 900500-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: nani.mz@gmail.com

RESUMO

Actinobactéria é um grupo de bactérias Gram positivas, geralmente filamentosas que produz uma vasta gama de metabólitos secundários. Seu principal habitat é o solo, onde representam mais de 30 % da microbiota, participando de maneira importante na decomposição da matéria orgânica. São ótimos produtores de enzimas extracelulares capazes de degradar moléculas complexas. Essas enzimas, principalmente as lipases, vêm se apresentando como alternativa para degradação de óleos e gorduras e, por isso, têm sido utilizadas em vários segmentos biotecnológicos. As maiores aplicações das lipases se encontra na fabricação de detergentes, pois facilitam a solubilização dos lipídeos em água. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade lipolítica de isolados de actinobactéria provenientes de solo impactado com resíduos petroquímicos frente a diferentes temperaturas de incubação e óleos vegetais. Para o estudo de produção enzimática foram utilizados 13 isolados que apresentaram crescimento em ágar nutriente. A hidrólise dos diferentes óleos foi observada sob a luz ultravioleta com comprimento de onda de 350 nm. Todos os 13 isolados apresentaram atividade lipolítica variando conforme a temperatura e substrato utilizados. Os isolados foram capazes hidrolisar os óleos girassol e soja em todas as temperaturas testadas. Para o óleo de canola a temperatura máxima de hidrólise foi de 45°C. Os demais óleos foram hidrolisados por menos de 60 % dos isolados em sua temperatura ótima de crescimento. Estes resultados deixam claro que a atividade lipolítica depende intimamente da temperatura de incubação e do tipo de substrato utilizado.

Palavras – chave: Actinobactéria; atividade lipolítica, lipases; biorremediação.

ABSTRACT

Actinobacteria are a group of Gram-positive bacteria, with a typically filamentous growth which produces a wide variety of secondary metabolites. Its main habitat is the soil, where they represent more than 30% of the microbiota. They play a major role in the decomposition of organic matter producing extracellular enzymes capable of degrading complex molecules. These enzymes, particularly lipases, have been presented as alternatives to degradation of oils and fats, therefore, have been used in many biotechnological sectors. The major application of lipases is the manufacture of detergents since they facilitate the solubilization of lipids in water. The aim of this study was to evaluate the lipolytic activity of actinobacteria isolated from soil contaminated with petrochemical waste across different incubation temperatures and vegetable oils. For the enzymatic production, 13 isolates were used. Hydrolysis of the different oils has been observed under ultraviolet light with a wavelength of 350 nm. All 13 isolates showed lipolytic activity, varying according to the temperature and substrate used. Isolates were able to hydrolyze sunflower and soy oil in all temperatures assayed. For canola oil the hydrolysis happens at the maximum temperature of 45 ° C. Other oils were hydrolyzed by less than 60% of the isolates at their optimum temperature. These results clearly show that the lipolytic activity intimately depends on upon the incubation temperature and the type of substrate used.

Keywords: Actinobacteria; lipolytic activity, lipases; bioremediation.

INTRODUÇÃO

Actinobactéria é um grupo de bactérias Gram positivas, geralmente filamentosas que produz uma vasta gama de enzimas extracelulares, como celulasas, amilases, lipases entre outras (Duarte, 2012). Seu principal habitat é o solo, onde representa mais de 30 % da microbiota, participando de maneira importante na decomposição da matéria orgânica (Kennedy 1999). O gênero mais abundante é o *Streptomyces* representando mais de 90% das actinobactérias presentes no solo (Xu *et al.* 1996).

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases e seus substratos naturais são os triglicerídeos. Seu modo de ação se assemelha muito ao das esterases, porém, sua atividade é muito aumentada na interface polar/apolar e apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa (Pastore *et al.* 2003). As lipases são normalmente estáveis em soluções aquosas, neutras à temperatura ambiente e em sua maioria apresentam atividade ótima entre 30 e 40°C. Entretanto, o termo estabilidade depende muito da origem sendo as lipases de origem microbiana as mais estáveis (Castro *et al.* 2004).

Lipases são utilizadas na indústria de alimentos, no desenvolvimento de aromas e na maturação de queijos, na indústria oleoquímica (hidrólise de óleos, gorduras e síntese de biosurfactantes) e no tratamento de resíduos oleosos da indústria de couro e papel (Carvalho *et al.* 2005, Pastore *et al.* 2003, Carvalho 2012).

Entretanto, a maior aplicação industrial das lipases se encontra na fabricação de detergentes. Elas são utilizadas como aditivos nos detergentes, pois facilitam a solubilização dos lipídeos em água (Hasan *et al.* 2006, Pandey *et al.* 1999).

As lipases que fazem parte dos detergentes devem atender alguns requisitos: ter baixa especificidade de substrato, ser resistentes a altas temperaturas e pH elevado,

possuir resistência aos danos causados pelas enzimas tensoativas (proteases, muito utilizadas em detergentes) (Castro *et al.* 2004, Hasan *et al.* 2006, Sharma *et al.* 2001).

Um estudo realizado por Silva (2014) com actinobactéria isolados de *landfarming*, mostrou que conforme a temperatura do sistema aumentava maior era o número de isolados positivos. Isso indica que tais isolados são capazes de produzir lipases a altas temperaturas, consequentemente tais lipases são termoestáveis.

Outro ponto importante dos organismos produtores de lipases é sua utilização na biorremediação. A biorremediação consiste em um processo de descontaminação por microrganismos autóctones ou alóctones, podendo ser realizada através de bioaugmentação, bioestimulação ou atenuação natural monitorada (Muteca 2012). A técnica de bioaugmentação consiste na introdução de microrganismos cultivados para degradar cadeias de hidrocarbonetos dentro de um sistema natural contaminado. O processo de bioestimulação consiste em introduzir nutrientes adicionais na área contaminada, incentivando o crescimento dos microrganismos capazes de degradar os poluentes do meio promovendo o aumento da população microbiana e consequentemente, uma degradação mais rápida do contaminante. Na atenuação natural monitorada, a degradação do poluente orgânico presente no solo ocorre sem adequação de qualquer condição ambiental, onde a desestruturação do poluente é realizada pelos micro-organismos nativos do local, devido à adaptação destes à presença do contaminante (Andrade 2010, Muteca 2012).

Dentre os processos em que a biorremediação é usada está o *landfarming*, que consiste na aplicação do resíduo na superfície do solo, de modo a reduzir as concentrações dos constituintes do petróleo por meio da biodegradação microbiana. O espalhamento do material oleoso contaminante sobre o solo e a incorporação na camada arável, também denominada camada reativa, afeta diretamente e de modo diferenciado,

os microorganismos responsáveis pela biodegradação. A biodegradação microbiana, que é o mecanismo primário de eliminação dos poluentes orgânicos do ambiente compõe a base deste tratamento, sendo de grande importância a manutenção de uma comunidade microbiana heterotrófica ativa. Para o melhor funcionamento do *landfarming* se faz necessário à adição de nutrientes, especialmente fósforo, nitrogênio e potássio, pois o aumento da concentração de carbono orgânico no solo aumenta a demanda de nutrientes pelos microorganismos (de Paula *et al.* 2006, Silva 2009). Além disso, podem ser feitas outras adequações no solo que incluem a adição de água para aumentar a umidade, e a adição de óxidos de cálcio e/ou magnésio para corrigir o pH. Em geral, ocorre maior degradação de hidrocarbonetos em solo de pH neutro, pois são as bactérias os principais agentes da biodegradação (Mphekgo & Cloete, 2004). A aeração do solo é viabilizada através de arado acoplado a trator (MARIN *et al.*, 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade lipolítica de isolados de actinobactérias provenientes de solo impactado com resíduos petroquímicos frente a diferentes temperaturas de incubação e óleos vegetais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Os Isolados utilizados são oriundos de uma célula de *landfarming* do Sistema Centralizado de Controle de Resíduos do Polo Petroquímico do Sul (SICECORS). A SICECORS, desde 1986, recebe resíduos petroquímicos da companhia Petroquímica do Sul, atual Braskem, localizada no município de Triunfo/RS. Todas as amostras pertencem a coleção de culturas do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) /UFRGS. A coleta, o isolamento e a identificação das

amostras por características morfológicas, taxonômicas foram realizadas por Duarte (2012). Todos os isolados pertencem ao gênero *Streptomyces* e estavam conservados em meio inclinado ágar amido caseína (ACA) (amido 1%, caseína 0,03%, KNO₃ 0,2%, NaCl 0,2%, K₂HPO₄ 0,02%, MgSO₄ 0,005%, FeSO₄ 0,001%, CaCO₃ 0,002%, e ágar 1,5%) a 4°C.

Recuperação das Amostras

Oitenta e cinco isolados foram inoculados em caldo nutriente (0,5% peptona, 0,3% extrato de carne), pois posteriormente será usado o meio ágar nutriente para a análise dos resultados, e incubados sob agitação constante á uma temperatura de 30°C e rotação de 100 rpm por 10 dias. Posteriormente as culturas foram semeadas pela técnica de esgotamento, em placas contendo ágar nutriente (0,5% peptona, 0,3% extrato de carne, ágar 1,5%). Os 13 isolados que apresentaram melhor crescimento em ágar nutriente foram selecionados para o estudo. Após a recuperação os isolados foram mantidos em ágar amido caseína sob refrigeração (4°C) para estudos posteriores de atividade enzimática.

Atividade Lipolítica

A atividade lipolítica foi observada em ágar nutriente modificado, contendo 0,1% de rodamina a 5% e 2,5% de óleo vegetal (amendoim, canola, castanha do Pará, girassol, oliva e soja). O meio base foi previamente resfriado para a adição do óleo esterilizado por filtração utilizando membrana de 0,22µm. Os isolados foram inoculados e incubados nas temperaturas de 50°C, 45°C, 40°C, 35°C e 30°C, sendo todos os ensaios realizados em duplicata. A hidrólise dos óleos foi observada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 350 nm. Os isolados com capacidade de hidrolizar os óleos apresentam halos de cor alaranjada ao redor e/ou sobre as colônias. Isso acontece devido

à presença de rodamina B no meio de cultura, que emite fluorescência laranja na presença de ácidos graxos resultantes da hidrólise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade lipolítica

Todos os isolados apresentaram atividade lipolítica em pelo menos dois dos óleos testados, variando conforme o tipo de óleo e a temperatura analisada (Figuras 1 e 2)



Figura 1: Hidrólise do óleo de soja à temperatura de 50°C após 14 dias de incubação.



Figura 2: Hidrólise do óleo de girassol á temperatura de 35°C após 14 dias de incubação

Comparando os óleos testados observou-se que o óleo de soja foi hidrolisado em todas as temperaturas testadas, na temperatura de 50°C, 100% dos isolados apresentaram atividade lipolítica. À temperatura 45°C 76,9 % dos isolados hidrolisaram o óleo de soja a 40°C, 69,2% e a 35°C, 92,3% dos isolados (Figura 3).

Para a hidrólise do óleo de girassol observou-se que, a medida que a temperatura de crescimento aumentava um número maior de isolados era capaz de hidrolisar o óleo. Na temperatura de 35°C, 38,46% dos isolados foram positivos para a reação, á 50°C 100% dos isolados hidrolisaram o óleo de girassol. O óleo de canola apresentou, assim como o de girassol, um aumento no número de isolados positivos a medida que aumentava a temperatura de incubação. Porém, na temperatura de 50°C nenhum isolado foi capaz de hidrolisar o óleo de canola (Figura 3). Na hidrólise do óleo de castanha do Pará os isolados apresentaram temperatura ótima de incubação a 40°C com 61,53% dos isolados positivos. No meio de cultura, suplementado com óleo de amendoim, somente três isolados apresentaram atividade lipolítica a 35°C. Para a hidrólise do azeite de oliva a maior atividade ocorreu a 35°C, mas também se observaram isolados positivos a 40°C (Figura 3).

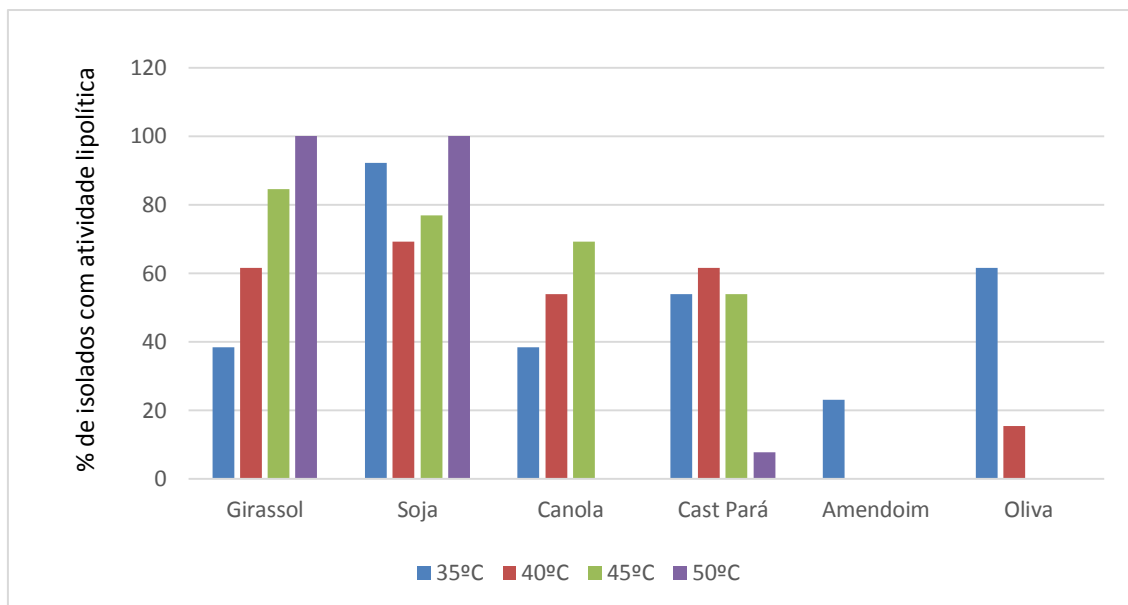


Figura 3: Porcentagem de isolados positivos para atividade lipolítica frente a diferentes óleos vegetais e temperaturas de incubação n= 13.

Os resultados mostram que a atividade lipolítica está intimamente ligada à temperatura de incubação e ao tipo de substrato utilizado. Abbas *et al.* (2002), estudando a lipase de *Mucor* sp. observaram que esta era mais ativa no intervalo de 30 a 45°C, sendo a temperatura ótima de 35°C. Rashid *et al.* (2001) observaram em seus ensaios que a 35°C foi a temperatura ótima para a atividade lipolítica de lipases produzidas por *Pseudomonas* sp. Entretanto, a temperatura ótima para atividade lipolítica varia muito entre as espécies produtoras das enzimas. Duza & Mastan (2014), por exemplo, estudaram isolados de *Achromobacter xylosoxidans* (TS2MCN) e *Bacillus thuringiensis* (TS11BP) produtores de lipase e observaram que a melhor atividade dessas enzimas ocorreu à 45°C. Da mesma forma Rahman *et al.* (2005) e Chakraborty & Raj (2008) estudando atividade lipolítica *Pseudomonas* sp. e *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 também observaram como temperatura ótima 45° C . Carvalho (2012) observou que a lipase produzida pela linhagem de *Bulkholderia cepacea* O19 apresentou melhor atividade á temperaturas superiores á 65 °C.

No presente trabalho, nenhum dos isolados apresentou 100% de eficiência, ou seja, foi positivo ao mesmo tempo para todas as temperaturas e óleos testados (Tabela 1). Os isolados que melhor hidrolisaram os óleos testados foram o 3.4 e o 2.8 degradando todos os óleos na maioria das temperaturas testadas. À temperatura de 35°C o isolado 3.4 degradou todos os óleos e a 40 e 45°C não degradou os óleos de oliva e amendoim e a 50°C somente degradou os óleos de soja e girassol. O isolado 2.8 degradou todos os óleos á 35°C (com exceção do óleo de oliva), a 40 e 45°C não degradou os óleos de oliva e amendoim e á 50°C hidrolisou os óleos de soja girassol e castanha do Pará. O isolado 2.1 foi o que teve menor atividade lipolítica hidrolisando apenas o óleo de soja á 45 e 50°C, e o óleo de girassol á 50°C (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade lipolítica por diferentes isolados frente aos diferentes óleos e temperaturas testados.

Óleo/Isolado	Oliva			Soja			Castanha			Girassol			Canola			Amendoim			
	35°C	40°C	45°C	35°C	40°C	45°C	35°C	40°C	45°C	35°C	40°C	45°C	35°C	40°C	45°C	35°C	40°C	45°C	50°C
1.16	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2.1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2.10	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2.11	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2.13	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2.2	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
2.4	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2.8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3.3	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3.4	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3.7	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4.1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4.2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+) Atividade lipolítica positiva; (-) atividade lipolítica negativa (Is) Isolado

A composição dos óleos pode ter contribuído para as diferenças nos resultados obtidos. Ácidos graxos insaturados de cadeia longa são conhecidos por aumentarem a produção de lipases (Ghosh *et al.*, 1996). Um estudo realizado por Wang *et al.* (2008) demonstrou que a capacidade do óleo de oliva de induzir a produção de lipase pode estar relacionada com a sua composição, constituída em mais de 70% por ácido oleico. Neste trabalho a melhor atividade lipolítica não foi observada no óleo de oliva, e sim nos óleos de soja e girassol. Os óleos de girassol e soja contém uma pequena fração na sua composição do ácido tetradecadécico, o que pode ter contribuído para a melhor hidrólise destes óleos. Já nos óleos de amendoim e oliva, que foram aqueles para os quais o menor número de isolados apresentou atividade lipolítica o ácido tetradecadécico não está presente. Além disso, os óleos de amendoim e oliva possuem em sua composição um teor maior de ácidos graxos insaturados com uma dupla ligação (Fonseca & Gutierrez) (Tabela 2). Isso indica que as lipases produzidas pelos isolados neste trabalho tem preferência por ácidos graxos de cadeia mais curta e por ácidos graxos insaturados com maior número de duplas ligações.

Tabela 2: Composição em ácidos graxos dos óleos vegetais (% em peso, do total dos ácidos graxos)

Óleos Vegetais						
Ácido Graxo (1)	Oliva	Milho	Girassol	Soja	Algodão	Amendoim
14:00	-	-	0,08	0,2	0,8	-
16:00	14,23	14,03	8,36	11,35	20,13	11,42
18:00	3,41	3,33	5,03	4,15	3,1	2,82
20:00	0,58	1	0,43	0,15	0,2	2,33
22:00	-	-	-	-	-	2,08
Total Saturados	18,26	18,36	13,9	15,85	24,23	18,65
14:01	-	-	0,04	-	-	-
16:01	2,52	0,2	0,05	0,05	1,43	-
18:01	71,1	35,08	27,65	25,3	22,86	41,69
18:02	6,76	44,4	56,3	50,6	50,16	38,46
18:03	1,36	1,96	2,06	8,2	1,32	1,17
Total Insaturados	81,74	81,64	86,1	84,15	75,77	81,32

(1) número de átomos de carbono : número de duplas ligações

No Brasil óleo de soja é o mais consumido tanto para fins alimentares quanto para produção de biodiesel. A produção total, em 2015, óleo de soja segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE 2016) foi de 8074 toneladas, e dessas, 6521 toneladas é destinado ao consumo doméstico.

Em um estudo realizado por Tomazi *et al.* (2014) em Ijuí – RS mostrou que os valores médios estimados de óleo comestível descartado podem alcançar 10 mil litros semanais ou 520 mil litros anuais sendo 67% deste volume descartado inadequadamente no ambiente. Se aplicarmos os resultados dos autores ao resto do país teremos aproximadamente 4369 toneladas de óleo de soja sendo descartados inadequadamente por ano no Brasil. Por este motivo torna-se necessária a biorremediação.

A produção de lipases com amplas faixas de termoestabilidade é de extrema importância tanto para as aplicações industriais quanto para os processos de biorremediação. Na aplicação industrial essa estabilidade é importante, pois muitos

processos utilizam faixas extremas de temperatura (Messias *et al.* 2011). Na biorremediação não acontece o contrario, visto que as temperaturas nesse processo também variam muito de acordo com a localidade. Os solos do Brasil tem temperatura média de 25° á 30°C, o que favorece o metabolismo das bactérias mesofílicas (Andrade *et al.* 2010). Entretanto, no estado do Rio Grande de Sul as temperaturas médias variam entre 15 e 18°C, com mínimas de até -10°C e máximas de 40°C (Atlas sócio econômico do Rio grande do Sul). Portanto as bactérias utilizadas nos processos de biorremediação devem estar adaptadas á esse tipo de condição. Nerurkar *et al.* (2013) observaram em seus estudos que a lipase de *Bacillus sonorensis* exibia atividade máxima em condições alcalinas e mantinha-se estável ao longo de um intervalo de temperatura desde 0 até 60°C.

CONCLUSÕES

A maior parte dos isolados conseguiu hidrolisar os diversos tipos de substratos em diferentes temperaturas, o que indica que o gênero *Streptomyces* é um bom produtor de lipase e tem potencial para ser utilizado na produção em larga escala nos segmentos industriais e na biorremediação. Entretanto maiores estudos devem ser realizados a fim de confirmar esses resultados.

PERSPECTIVA

Como perspectiva desse projeto será analisada quantitativamente a produção das enzimas dos isolados 3.4 e 2.8, que foram os que apresentaram melhores resultados qualitativos e adicionalmente pretende – se otimizar o cultivo para a produção da lipase e proceder com sua caracterização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus, pois sem ele nem meu respirar seria possível. A minha professora e orientadora, Dra. Sueli Van Der Sand, por toda paciência, dedicação e por em nenhum momento ter desistido de mim. Aos meus Pais, pelo encorajamento amor incondicional, dedicação, ensinamentos, suporte e compreensão. E a todos os colegas do laboratório 323 pela paciência e dedicação em me ensinar as rotinas do laboratório e ajuda com os experimentos. Muito Obrigada á todos

REFERÊNCIAS

Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais
<<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE>> (acesso em agosto de 2016)

ABBAS, H., HIOL, A., DEYRIS, V. & COMEAU, L. 2002. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from Palm fruit. *Enzime and Microbial Technology*, 31: 968-975.

ANDRADE, J. A., AUGUSTO F. e JARDIM, I. F. 2010 Biorremediação de solos contaminados por Petróleo e seus derivados. *Eclética Química*. 35(3) 17-43.

CASTRO, H.F, MENDES, A.A., SANTOS, J.C. & AGUIAR, C. L. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27: 146-156.

CARVALHO, L. C. T. 2012 *Produção de lipases e biosurfactantes por bactérias isoladas de solo contaminado com óleo vegetal residual*. Dissertação de Mestrado

(Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

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

CHAKRABORTY, K. & RAJ, P. R. 2008. An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and characterization. *Food chemistry*, 109: 727-736.

DE PAULA, A.M., SOARES, C.R.F.S., SIQUEIRA, J.O., 2006, “Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de landfarming de resíduos petroquímicos”, *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 10 (2): 448-455.

DUARTE, M. W. 2012. *Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo: produção de metabolitos secundários por actinomicetos de solo*. 109 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DUSA, M. B. & MASTAN, S. 2014. Optimization of Lipase Production from *Bacillus thuringiensis* (TS11BP), *Achromobacter xiloxidans* J2 (TS2MCN) - Isolated from Soil sediments near oilseed farm. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(2): 66-76.

Estado do Rio Grande do Sul, Atlas sócio econômico
<<http://www.atlassocioeconomico.rs.gov.br>> (acesso em agosto de 2016)

- FONSECA, H. & GUTIERREZ, L. E. 1974. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais. *Anais da ESALQ* . 31:485-490.
- GHOSH, P. K., SAXENA, T. K., GUPTA, R., YADAV, R. P. & DAVIDSON, S. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Science progress*, 79:119-157.
- HASAN, F., SHAH, A. A. & HAMEED. A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:325-251.
- KENNEDY, A. C. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74:65-76
- MARIN, J.A., HERNANDEZ, T., GARCIA, C., 2005, “Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity”, *Environmental Research*, 98(2):185-95.
- MESSIAS, J. M., DA COSTA, B. Z., DELIMA, V. M. G., GIESE, E. C., DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M. 2011. Lipases microbianas: produção , propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas Tecnológicas*, 32(2): 213-234.
- MUTECA, F. L. L. 2012. *Estudo da biorremediação de solo impactado por óleo cru*. 114 f. Dissertação de Mestrado em Ciências. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: 2012.
- MPHEKGO, P. M., CLOETE, T.E., 2004, “Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?”, *Environmental Science & Bio/Technology*, 3: 349-360.

- NERURKAR, M., JOSHI, M., PARITI, S. & ADIVAREKAR, R. 2013. Application of lipase from Marine Bacteria *Bacillus sonorensis* as an Additive in Detergent Formulation. *Journal on Surfactants and Detengents*, 16(3): 435 – 443.
- PASTORE, G. M., COSTA, V.S.R., KOBLITZ, M. G. B. 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(2): 135-140.
- PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., KRIEGER, N. & SOCCOL, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28:119-131.
- RAHMAN, R. N. Z. R. A., BAHARUM, S. N., BASRI, M. & SALLEH, A. B. 2005. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Analytical Biochemistry*, 341: 267:274.
- RASHID, N., SHIMADA, Y., EZAKI, S., ATOMI, H. & IMANAKA, T. 2001. Low temperature lipase from psychrotropic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Applied and environmental microbiology*, 67: 4064-4069.
- SHARMA R., CHISTI Y. & BANERJEE U. C. 2001. Production, purification characterization, and aplications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627 – 662.
- SILVA, L. J. 2009. *Processo de Landfarming para Tratamento de Resíduos Oleoso*. 91 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SILVA, R. F. 2014 *Atividade lipolítica de actinomicetos provenientes de solo impactado com resíduos petroquímicos frente a diferentes óleos vegetais*. 22 f. Trabalho

de conclusão de curso em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

TOMASI, K., FERNANDES, S. B. V., LUCHESE, O. A., UHDE, L. T. & BUSNELLO, M B, 2014 Perfil de Consumo e Descarte de Óleo Comestível no Município de Ijuí-Rs. *Revista Contexto & Saúde, Ijuí*. 14 (27): 54-64.

WANG, D., YAN, X. & SHAN, T. 2008. Effects of oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochemical Engineering Journal*, 41:30-37

XU, L. H., LI, Q. R. & JIANG, C.L. 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Applied and environmental Microbiology*. 62(1): 244-248.