



**Tatiana de Mattos Kerber**

**Planejamento Experimental e Avaliação Metrológica da  
Produção de Lipases por *Yarrowia lipolytica***

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Metrologia para Qualidade e Inovação da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Metrologia.

Orientadora: Fatima Ventura Pereira Meirelles  
Co-orientadora: Gisela Maria Dellamora Ortiz

Rio de Janeiro  
Abril de 2007



**Tatiana de Mattos Kerber**

**Planejamento Experimental e Avaliação Metrológica da  
Produção de Lipases por *Yarrowia lipolytica***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Metrologia, Qualidade e Inovação do Centro Técnico Científico da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Aprovada pela Comissão Examinadora e homologada pela Coordenação Setorial de Pós-Graduação, formalizado pelas respectivas assinaturas.

**Comissão Examinadora:**

**Profa. Dra. Fatima Ventura Pereira Meirelles**

Orientadora  
Departamento de Química  
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

**Profa. Dra. Gisela Maria Dellamora Ortiz**

Co-Orientadora  
UFRJ – Faculdade de Farmácia

**Profa. Dra. Elisabeth Costa Monteiro**

Programa de Pós-Graduação em Metrologia (PósMQI)  
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

**Prof. Dr. Ricardo Queiroz Aucélio**

Departamento de Química  
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

**Prof. Dr. Edmar das Mercês Penha**

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**Prof. José Eugênio Leal**

Coordenador Setorial de Pós-Graduação do  
Centro Técnico Científico (PUC-Rio)

Rio de Janeiro, 18 de abril de 2007.

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autora e das orientadoras.

### **Tatiana de Mattos Kerber**

Graduou-se em Química Industrial na PUC-Rio em 2004. Atua como Gerente da Qualidade do Laboratório de Caracterização de Fluidos do Departamento de Engenharia Mecânica da PUC-Rio.

### Ficha Catalográfica

Kerber, Tatiana de Mattos

Planejamento experimental e avaliação metrológica da produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* / Tatiana de Mattos Kerber ; orientadores: Fatima Ventura Pereira Meirelles, Gisela Maria Dellamora Ortiz. – 2007.

162 f. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Metrologia para a Qualidade e Inovação) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Inclui referências bibliográficas.

1. Metrologia – Teses. 2. Biometrologia. 3. Lipase. 4. *Yarrowia lipolytica*. 5. Planejamento experimental. 6. D-optimal. 7. Incerteza de medição I. Pereira-Meirelles, Fatima Ventura. II. Dellamora-Ortiz, Gisela Maria. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Metrologia para a Qualidade e Inovação. III. Título.

CDD:389.1

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, sem o qual minha vida e tudo o que está a ela relacionado não teriam sentido, e aos meus avós, Almir e Maria Stella, pelo amor, carinho e atenção a mim dedicados ao longo dos saudosos anos em que convivemos juntos nesta vida.

## **Agradecimentos**

As minhas orientadoras, Fatima e Gisela, pela orientação, pelo apoio, pela competência científica e profissional transmitida e pela confiança em mim depositada.

A Fatima, um agradecimento especial, por ter sido mais do que orientadora, pela amizade, pelo carinho, pela paciência, pela constante atenção e principalmente pela dedicação e interesse na realização deste trabalho.

Ao meu querido Felipe, pelo seu amor, pela sua compreensão, por acreditar no meu potencial e por me ajudar a crescer como pessoa e como profissional.

A minha mãe, Fátima, e as minhas irmãs, Anna Karina e Suzana, pelo amor e carinho em todas as horas.

Aos meus sogros, Sérgio e Adelina, pelo apoio e incentivo de sempre.

Aos amigos Rosângela e Wanderley, os quais carinhosamente deram origem a toda essa caminhada.

Ao Professor Paulo Roberto de Souza Mendes pela valiosa contribuição no meu percurso desde a graduação.

Ao Professor Maurício Frota pelo apoio no decorrer do curso.

A Professora Paula Fernandes de Aguiar, do Instituto de Química da UFRJ, pelo auxílio nos cálculos e interpretação dos resultados.

À Márcia Ribeiro, secretária do Pós MQI/PUC - Rio, pela atenção e ajuda sempre que solicitada.

Aos funcionários do Laboratório de Biocorrosão e aos técnicos dos Laboratórios de Química Geral, Carlos e Charles, pela atenção e pelo empréstimo de alguns equipamentos utilizados neste trabalho.

Aos professores que participaram da Comissão Examinadora.

A todos os amigos e familiares que, de uma forma ou de outra, me estimularam a prosseguir trabalhando.

## Resumo

Kerber, Tatiana de Mattos; Pereira-Meirelles, Fatima Ventura; Dellamora-Ortiz, Gisela Maria. **Planejamento Experimental e Avaliação Metrológica da Produção de Lipases por *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro, 2007. 162p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Metrologia. Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação (Pós-MQI), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

**Objetivo:** Otimização da produção de lipases por células de *Yarrowia lipolytica*, através do planejamento experimental e avaliação dos aspectos metrológicos envolvidos no processo. **Motivação:** Embora existam muitos trabalhos na literatura que relatem a produção de lipases por microrganismos, poucos abordam a otimização do processo através do planejamento experimental e nenhum deles considera o rigor metrológico e a estimativa da incerteza de medição. **Contextualização:** As enzimas lipases serão objeto de estudo por apresentarem grande versatilidade de aplicações e por serem produzidas por muitos microrganismos. As leveduras, no entanto, apresentam inúmeras vantagens operacionais sobre os demais microrganismos e entre elas foi selecionada uma cultura de *Yarrowia lipolytica*, isolada no Brasil. A produção de lipases depende de muitas variáveis, como temperatura, pH, concentração da fonte de carbono e nitrogênio, inóculo, entre outras. Nos processos de fermentação, onde há interação entre estas variáveis e a influência de cada uma é importante, é essencial estabelecer um método que considere estas interações, e otimize as condições experimentais para obtenção de melhores resultados. A confiabilidade metrológica do processo é de fundamental importância uma vez que diferenças significativas nos resultados são evidenciadas, principalmente em escala industrial. **Metodologia:** Dez experimentos foram planejados através do método D-optimal nos quais foram variadas as concentrações da fonte de carbono, da fonte de nitrogênio e de inóculo. A estimativa da incerteza de medição da atividade lipásica foi feita com base nas recomendações do Guia para Expressão da Incerteza de Medição (GUM) e do Guia CG 4 publicado pela EURACHEM. **Resultados:** A maior atividade lipásica obtida foi de 4815 U/L (80,3  $\mu$ kat/L) com incerteza expandida de 137 U/L (2,3  $\mu$ kat/L), nas seguintes condições: 0,5% de óleo de oliva (fonte de carbono), 0,7% de peptona (fonte de nitrogênio) e 10 mg/mL de inóculo. Em termos de produtividade volumétrica, tais condições forneceram o valor de 69,28 U/L h. **Conclusões:** Com estes resultados, foi

possível concluir que a utilização do planejamento D-optimal favoreceu a produção em agitador de frascos, já que foi atingida uma atividade lipásica superior às alcançadas anteriormente por outros autores sem otimização, em frascos agitados (2700 U/L) ou em fermentador (4240 U/L). Sugere-se a produção de lipases por células de *Yarrowia lipolytica*, nas condições citadas acima, com vistas à obtenção de materiais de referência certificados, desde que estudos posteriores de purificação e estabilidade da lipase obtida sejam feitos.

## **Palavras-chave**

Biometrologia; Lipase; *Yarrowia lipolytica*; Planejamento experimental; D-optimal; Incerteza de medição.

## Abstract

Kerber, Tatiana de Mattos; Pereira-Meirelles, Fatima Ventura; Dellamora-Ortiz, Gisela Maria. **Experimental design and metrological evaluation of lipase production by *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro, 2007. 162p. M.Sc. Dissertation - Programa de Pós-Graduação em Metrologia. Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação (Pós-MQI), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

**Objective:** Optimization of lipase production by *Yarrowia lipolytica* cells through experimental design and evaluation of metrological aspects related to process. **Motivation:** Although several published papers are found describing lipase production by microorganisms, few of them refer to process optimization through experimental design and none of them refer to metrological evaluation and the estimate of the uncertainty in measurement. **Context:** Microbial lipases are an important group of biotechnologically valuable enzymes that present widely diversified catalytic properties. The interest in production of these versatile enzymes increased significantly, due to the vast amplitude of their industrial applications. There are many microorganisms able to produce lipases, but yeasts present some operational advantages compared to other microorganisms, and for this reason a strain of *Yarrowia lipolytica* was used in this work. A serie of factors, individually or in association, can affect production of such substances leading to different levels of product concentration and productivity. Empirical studies have been traditionally used to determine the effect of these factors on process parameters. A possible approach is to vary one factor while keeping the other at a constant level, but this approach is time consuming, does not include the interaction effects among variables, and does not necessarily lead to optimized results. Nowadays, different strategies are employed to optimize production parameters. These strategies not only allow process optimization but can also establish the dependent and independent variables. **Methodology:** Ten experiments were planned with the D-optimal design in which concentrations of inoculum, carbon source and nitrogen source were changed. The estimate of the uncertainty in measurement of the lipase activity was developed based on the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) and on the Guide CG 4 published by EURACHEM. **Results:** The highest lipolytic activity obtained was 4815 U/L (80,3  $\mu$ kat/L) with an expanded uncertainty of 137 U/L (2,3  $\mu$ kat/L), under the following conditions: 0.5% of olive oil (carbon source),



0.7% of peptone (nitrogen source) and 10 mg/mL of inoculum. In terms of volumetric productivity, these conditions provided 69.28 U/L h. **Conclusions:** It is possible to conclude that the D-optimal design usage enhanced lipase production in shaken-flasks. Moreover the activity obtained in this work was higher than others previously reported with the same microorganism, without experimental design, in shaken-flasks (2700 U/L) or even in bench-fermenter (4240 U/L). The production of lipases by *Yarrowia lipolytica* cells aiming the classification as certified reference material can be recommended after further purification and stability studies.

### **Keywords**

Biometrology; Lipase; *Yarrowia lipolytica*; Experimental design; D-optimal; Uncertainty in measurement.

## Sumário

1. Introdução: contexto e motivação	19
2. Conceitos teóricos e revisão bibliográfica	23
2.1. Conceitos metrológicos	23
2.2. Fundamentos de metrologia	28
2.2.1. Metrologia química	31
2.2.2. Biometrologia	33
2.2.3. Estimativa da incerteza de medição	37
2.2.3.1. Avaliação do Tipo A da incerteza padrão	39
2.2.3.2. Avaliação do Tipo B da incerteza padrão	39
2.2.3.3. Determinação da incerteza padrão combinada	40
2.2.3.4. Fator de abrangência e número de graus de liberdade efetivos	40
2.2.3.5. Determinação da incerteza expandida	41
2.3. Células de <i>Yarrowia lipolytica</i>	41
2.4. Lipases	43
2.4.1. Definição, estrutura e características	43
2.4.2. Aplicações	45
2.4.3. Produção e purificação	50
2.4.3.1. Fermentação	52
2.4.3.2. Produção de lipases por <i>Yarrowia lipolytica</i>	55
2.4.3.3. Purificação	56
2.4.4. Detecção e medição da atividade lipásica	58
2.5. Planejamento experimental	62
3. Objetivos	66
3.1. Objetivos gerais	66
3.2. Objetivos específicos	66
4. Materiais e métodos	67
4.1. Materiais	67
4.1.1. Vidrarias	67

4.1.2. Equipamentos	69
4.2. Reagentes	69
4.3. Planejamento experimental	70
4.4. Microrganismo	72
4.5. Meios de cultura	72
4.5.1. Meios sólidos	72
4.5.2. Meios líquidos	72
4.6. Produção da enzima	73
4.7. Purificação do óleo de oliva	76
4.8. Determinação do índice de acidez do óleo de oliva	76
4.9. Métodos analíticos	76
4.9.1. Quantificação do crescimento celular	76
4.9.2. Determinação da atividade lipásica	77
4.10. Estimativa da incerteza de medição da atividade lipásica	77
4.10.1. Incerteza padronizada da concentração em quantidade de matéria da solução de NaOH	79
4.10.2. Incerteza padronizada do volume de NaOH adicionado	81
4.10.3. Incerteza padronizada do tempo	82
4.10.4. Incerteza padronizada do volume de amostra	82
5. Resultados e discussão	83
5.1. Curvas de calibração das vidrarias	83
5.2. Avaliação da melhor metodologia para a obtenção das repetições da quantificação do crescimento celular	84
5.3. Avaliação do número de repetições necessárias para determinação da atividade lipásica	86
5.4. Perfis de crescimento celular e de atividade lipásica	86
5.5. Efeitos das concentrações iniciais da fonte de carbono, da fonte de nitrogênio e do inóculo sobre a produção de lipases	100
5.6. Planejamento experimental para a produção de lipases de <i>Yarrowia lipolytica</i>	104
5.7. Estimativa da incerteza de medição da atividade lipásica	109
6. Conclusões	111

7. Perspectivas futuras	113
8. Referências bibliográficas	114
9. Apêndice	125
9.1. Certificados de calibração	125
9.2. Recomendações para calibração, verificação e manutenção de equipamentos	151
9.2.1. Calibração e verificações de calibração	151
9.2.2. Verificação de desempenho	152
9.2.3. Manutenção	154
9.3. Curvas de calibração das vidrarias	156

## Lista de Figuras

Figura 2.1 - Estrutura Metrológica Internacional	29
Figura 2.2 - Hierarquia do Sistema Metrológico	30
Figura 2.3 - Esquema representativo da hierarquia de materiais de referência para a transferência de exatidão nas medições de enzimas	37
Figura 2.4 - Reação da ação catalítica de lipases	43
Figura 2.5 - Representação esquemática das reações catalisadas por lipases	44
Figura 2.6 - Estrutura da lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
Figura 2.7 - Mecanismo de produção de lipases por células de <i>Yarrowia lipolytica</i>	57
Figura 4.1 - (a) Agitador de frascos utilizado em todos os cultivos. (b) Frascos Erlenmeyers contendo os meios inoculados	74
Figura 4.2 - Diagrama do processo de produção de lipases	75
Figura 4.3 - Diagrama de causa e efeito com as componentes da incerteza da atividade lipásica	78
Figura 5.1 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 8, certificado VOL- 013/06	84
Figura 5.2 - Esquema para determinação do desvio padrão da quantificação do crescimento celular. (a) desvio padrão do instrumento, (b) desvio padrão da diluição	85
Figura 5.3 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 0,7% de peptona e 2,2% de inóculo (Experimento 1). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	88
Figura 5.4 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 0,2% de peptona e 10% de inóculo (Experimento 2). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	89
Figura 5.5 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 1,2% de peptona e 0,5% de inóculo (Experimento 3). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	90

Figura 5.6 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 0,5% de óleo de oliva, 1,2% de peptona e 2,2% de inóculo (Experimento 4). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	92
Figura 5.7 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 0,2% de peptona e 0,5% de inóculo (Experimento 5). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	93
Figura 5.8 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 1,2% de peptona e 10% de inóculo (Experimento 6). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	94
Figura 5.9 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 0,5% de óleo de oliva, 0,2% de peptona e 10% de inóculo (Experimento 7). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	95
Figura 5.10 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 0,5% de óleo de oliva, 0,2% de peptona e 0,5% de inóculo (Experimento 8). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	96
Figura 5.11 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 0,5% de óleo de oliva, 0,7% de peptona e 10% de inóculo (Experimento 9). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	97
Figura 5.12 - Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio contendo 3,0% de óleo de oliva, 0,82% de peptona e 4,6% de inóculo (Experimento 10). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular	98
Figura 5.13 - Curvas de nível da superfície de resposta da atividade lipásica máxima contra a concentração de carbono ( $\xi_1$ ) e nitrogênio ( $\xi_2$ ) com a concentração de inóculo fixa em 0,5 mg/mL	105
Figura 5.14 – Curvas de nível da superfície de resposta da atividade lipásica máxima contra a concentração de carbono ( $\xi_1$ ) e nitrogênio ( $\xi_2$ ) com a concentração de inóculo fixa em 2,2 mg/mL	106
Figura 5.15 – Curvas de nível da superfície de resposta da atividade lipásica máxima contra a concentração de carbono ( $\xi_1$ ) e nitrogênio ( $\xi_2$ ) com a concentração de inóculo fixa em 10 mg/mL	106
Figura 9.1 - Certificado de calibração VOL- 004/06 para o balão volumétrico de 25 mL nº de identificação 3	125

Figura 9.2 - Certificado de calibração VOL- 007/06 para o balão volumétrico de 50 mL nº de identificação 1	126
Figura 9.3 - Certificado de calibração VOL- 003/06 para o balão volumétrico de 50 mL nº de identificação 2	127
Figura 9.4 - Certificado de calibração VOL- 005/06 para o balão volumétrico de 50 mL nº de identificação 3	128
Figura 9.5 - Certificado de calibração VOL- 008/06 para o balão volumétrico de 50 mL nº de identificação 4	129
Figura 9.6 - Certificado de calibração VOL- 006/06 para o balão volumétrico de 50 mL nº de identificação 5	130
Figura 9.7 - Certificado de calibração VOL- 011/06 para o balão volumétrico de 100 mL nº de identificação 1	131
Figura 9.8 - Certificado de calibração VOL- 012/06 para o balão volumétrico de 100 mL nº de identificação 3	132
Figura 9.9 - Certificado de calibração VOL- 010/06 para o balão volumétrico de 100 mL nº de identificação 4	133
Figura 9.10 - Certificado de calibração VOL- 024/06 para o balão volumétrico de 250 mL nº de identificação 3	134
Figura 9.11 - Certificado de calibração VOL- 009/06 para o balão volumétrico de 1000 mL nº de identificação 2	135
Figura 9.12 - Certificado de calibração VOL- 094/06 para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 3	136
Figura 9.13 - Certificado de calibração VOL- 020/06 para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 5	137
Figura 9.14 - Certificado de calibração VOL- 014/06 para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 6	138
Figura 9.15 - Certificado de calibração VOL- 013/06 para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 8	139
Figura 9.16 - Certificado de calibração VOL- 017/06 para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 9	140
Figura 9.17 - Certificado de calibração VOL- 016/06 para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 10	141
Figura 9.18 - Certificado de calibração VOL- 022/06 para a pipeta graduada de 2 mL nº de identificação 3	142

Figura 9.19 - Certificado de calibração VOL- 093/06 para a pipeta graduada de 2 mL nº de identificação 5	143
Figura 9.20 - Certificado de calibração VOL- 021/06 para a pipeta graduada de 2 mL nº de identificação 6	144
Figura 9.21 - Certificado de calibração VOL-018/06 para a pipeta graduada de 5 mL nº de identificação 8	145
Figura 9.22 - Certificado de calibração VOL- 092/06 para a pipeta graduada de 5 mL nº de identificação 9	146
Figura 9.23 - Certificado de calibração VOL- 015/06 para a pipeta graduada de 10 mL nº de identificação 5	147
Figura 9.24 - Certificado de calibração VOL- 019/06 para a pipeta graduada de 10 mL nº de identificação 7	148
Figura 9.25 - Certificado de calibração VOL- 095/06 para a pipeta graduada de 20 mL nº de identificação 3	149
Figura 9.26 - Certificado de calibração VOL- 023/06 para a bureta de 25 mL nº de identificação 1	150
Figura 9.27 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 3, certificado VOL- 094/06	156
Figura 9.28 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 5, certificado VOL- 020/06	156
Figura 9.29 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 6, certificado VOL- 014/06	157
Figura 9.30 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 9, certificado VOL- 017/06	157
Figura 9.31 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 10, certificado VOL- 016/06	158
Figura 9.32 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 2 mL nº de identificação 3, certificado VOL- 022/06	158
Figura 9.33 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 2 mL nº de identificação 5, certificado VOL- 093/06	159
Figura 9.34 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 2 mL nº de identificação 6, certificado VOL- 021/06	159
Figura 9.35 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 5 mL nº de identificação 8, certificado VOL- 018/06	160



Figura 9.36 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 5 mL	160
nº de identificação 9, certificado VOL- 092/06	
Figura 9.37 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 10 mL	161
nº de identificação 5, certificado VOL- 015/06	
Figura 9.38 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 10 mL	161
nº de identificação 7, certificado VOL- 019/06	
Figura 9.39 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 20 mL	162
nº de identificação 3, certificado VOL- 095/06	
Figura 9.40 - Curva de calibração para a bureta graduada de 25 mL	162
nº de identificação 1, certificado VOL- 023/06	

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Algumas aplicações comerciais de lipases microbianas	47
Tabela 2.2 - Algumas lipases microbianas disponíveis comercialmente	52
Tabela 2.3 - Métodos empregados para purificação e características de algumas lipases microbianas	59
Tabela 2.4 - Métodos empregados para detecção da atividade lipásica	61
Tabela 4.1 - Níveis empregados para os fatores C, N e I <sub>0</sub>	71
Tabela 4.2 - Planejamento dos experimentos através do método D-optimal	71
Tabela 4.3 - Composição dos meios líquidos utilizados para produção de lipases	72
Tabela 4.4 – Concentração inicial de células para cada experimento	73
Tabela 4.5 – Incertezas expandidas ( <i>U</i> ) de cada elemento do biftalato de potássio	81
Tabela 5.1 - Resultado da estimativa do desvio padrão para a quantificação do crescimento celular	86
Tabela 5.2 - Resultados da determinação do número de repetições necessárias para a determinação da atividade lipásica	87
Tabela 5.3 - Condições de cultivo e resultados obtidos para cada experimento	99
Tabela 5.4 - Efeito da concentração de óleo de oliva	100
Tabela 5.5 - Efeito da concentração de peptona	102
Tabela 5.6 - Efeito da concentração de inóculo	103
Tabela 5.7 - Valores dos resíduos para todos os experimentos	105
Tabela 5.8 - Parâmetros de produção de lipases por células de <i>Yarrowia lipolytica</i>	108
Tabela 5.9 – Incertezas expandidas estimadas para a atividade lipásica	109