

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
CUTINASES PRODUZIDAS EM DIFERENTES
MEIOS DE CULTIVO POR *Fusarium
oxysporum* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ENANTIOSSELETIVO DESTAS ENZIMAS**

PAULA SPERANZA
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. GABRIELA ALVES MACEDO
Orientadora

Profa. Dra. PATRÍCIA DE OLIVEIRA CARVALHO
Co-Orientadora

Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos

CAMPINAS-SP
2010

PAULA SPERANZA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
CUTINASES PRODUZIDAS EM DIFERENTES
MEIOS DE CULTIVO POR *Fusarium
oxysporum* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ENANTIOSSELETIVO DESTAS ENZIMAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do
título de Mestre em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS-SP
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

Sp36c Speranza, Paula
Caracterização bioquímica de cutinases produzidas em diferentes meios de cultivo por *Fusarium oxysporum* e avaliação do potencial enantiosseletivo destas enzimas / Paula Speranza. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Gabriela Alves Macedo
Co-orientador: Patricia de Oliveira Carvalho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cutinase. 2. *Fusarium oxysporum*. 3. Caracterização. 4. Enantiosseletividade. 5. Isoenzimas. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Biochemical characterization of cutinase produced in different growth medium by *Fusarium oxysporum* and evaluation of enantioselective potencial of these enzymes

Palavras-chave em inglês (Keywords): Cutinase, *Fusarium oxysporum*, Characterization, Enantioselectivity, Isoenzymes

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gabriela Alves Macedo

Luciana Francisco Fleuri

Eliana Setsuko Kamimura

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de mestrado defendida em ____/____/____ por Paula Speranza e aprovado pela comissão julgadora em ____/____/____

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
DCA/FEA/Unicamp
Orientadora

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
DQB/IBB/UNESP

Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura
ZEA/FZEA/USP

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
DEA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
DCA/FEA/Unicamp

Quem não se movimenta, não sente as correntes que o prendem.

Rosa Luxemburgo

Ao Newton, aos meus pais e ao meu irmão.

AGRADECIMENTOS

À profa. Gabriela, pelo apoio, carinho e ensinamentos ao longo do mestrado.

À profa. Patrícia por disponibilizar o cromatógrafo e pela ajuda na realização das análises.

À banca examinadora pelas correções e sugestões.

Ao Newton, pelo amor, carinho, amizade e por alegrar os meus dias.

Aos meus pais e ao meu irmão, que me possibilitaram chegar até aqui.

À Thalita e a Aline, queridas parceiras de bancada.

À Eliana (DEPAN) e ao Fabiano (DCA) pela ajuda, paciência e ensinamentos durante as etapas de eletroforese e cromatografia.

Ao prof.Nilo, um dos anjos da minha vida.

À família Yamazato, pelo grande carinho.

À profa. Hélia, pelos ensinamentos.

As pessoas muito especiais dos laboratórios de bioquímica de alimentos e bioaromas, que me auxiliaram inúmeras e exaustivas vezes durante a execução deste trabalho: Ana Cristina, Ana Luiza, Bia, Camilo, Carina, Cristiano, Danielle, Evandro, Fábio, Fran, Haroldo, Joelize, Juliana, Marcela, Márcio, Patrícia, Priscila B., Priscila H., Valdeci, Vânia, Viviane e Zé.

Aos amigos, Beatriz, Daniela, Gislaine, Nilo Kim, Patrícia e Tatiana.

À CAPES pela bolsa de estudos e a UNICAMP – FEA por me acolher desde a graduação.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. JUSTIFICATIVAS.....	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4.1. CUTINASE	4
4.1.1. Classificação	4
4.1.2. Caracterização bioquímica	8
4.1.3. Aplicações.....	12
4.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	14
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
5.1. MATERIAIS	18
5.1.1. Reagentes	18
5.1.2. Equipamentos	19
5.1.3. Outros materiais	19
5.2. MÉTODOS	19
5.2.1. Micro-organismo.....	19
5.2.2. Meios de cultivo para fermentação.....	20
5.2.3. Produção das cutinases brutas	20
5.2.4. Determinação da atividade enzimática das cutinases brutas	20
5.2.5. Determinação da quantidade de proteínas.....	21
5.2.6. Caracterização bioquímica das cutinases brutas	21
5.2.6.1. Efeito da temperatura na atividade das cutinases brutas	21
5.2.6.2. Efeito da temperatura na estabilidade das cutinases brutas	22

5.2.6.3. Efeito do pH na atividade das cutinases brutas.....	22
5.2.6.4. Efeito do pH na estabilidade das cutinases brutas.....	22
5.2.6.5. Efeito da concentração do substrato na atividade das cutinases brutas	23
5.2.6.6. Efeito da adição de diferentes sais minerais em diferentes concentrações na atividade das cutinases brutas	23
5.2.6.7. Reações de hidrólise de substratos sintéticos.....	23
5.2.6.8. Efeito de solventes orgânicos na estabilidade das cutinases brutas	24
5.2.6.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	24
5.2.7. Caracterização enantiosseletiva.....	26
5.2.7.1. Reações de esterificação enantiosseletiva das cutinases brutas	26
5.2.7.2. Cromatografia em camada delgada para a determinação de formação de éster	26
5.2.7.3. Caracterização enantiosseletiva das cutinases brutas	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CUTINASES BRUTAS	28
6.2. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS DAS CUTINASES BRUTAS	30
6.3. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CUTINASES BRUTAS.....	31
6.3.1. Efeito da temperatura na atividade das cutinases brutas.....	31
6.3.2. Efeito da temperatura na estabilidade das cutinases brutas	33
6.3.3. Efeito do pH na atividade das cutinases brutas.....	35
6.3.4. Efeito do pH na estabilidade das cutinases brutas	37
6.3.5. Efeito da concentração do substrato na atividade das cutinases brutas	39
6.3.6. Efeito da adição de diferentes sais minerais em diferentes concentrações na atividade das cutinases brutas	43
6.3.7. Reações de hidrólise em substratos sintéticos.....	48
6.3.8. Efeito de solventes orgânicos na estabilidade das cutinases brutas	50

6.3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida	53
6.4. CARACTERIZAÇÃO ENANTIOSSELETIVA.....	55
6.4.1. Cromatografia em camada delgada para determinação de formação de éster	55
6.4.2. Caracterização enantiosseletiva das cutinases brutas	61
7. CONCLUSÕES	66
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	76
ANEXO 1. CURVA PADRÃO DO <i>P</i> -NITROFENOL	76
ANEXO 2. CURVA PADRÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efeito da temperatura na atividade das cutinases brutas produzidas por <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes meios de cultivo por FES.....	32
Figura 2: Efeito da temperatura na estabilidade das cutinases brutas produzidas por <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes meios de cultivo por FES.	34
Figura 3: Efeito do pH na atividade das cutinases brutas produzidas por <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes meios de cultivo por FES.....	36
Figura 4: Efeito do pH na estabilidade das cutinases brutas produzidas por <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes meios de cultivo por FES.....	38
Figura 5: Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da cutinase produzida em farelo de trigo.	40
Figura 6: Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da cutinase produzida em casca de soja.	40
Figura 7: Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da cutinase produzida em farelo de arroz.	41
Figura 8: Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da cutinase produzida em torta de pinhão manso.....	41
Figura 9: Reação de hidrólise da cutinase em diferentes substratos	49
Figura 10 (a e b): Eletroforese SDS-PAGE em gel 12% das cutinases brutas	53
Figura 11: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido octanóico e (<i>R</i>)-2-octanol	56
Figura 12: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido octanóico e (<i>S</i>)-2-octanol	57
Figura 13: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido octanóico e (<i>R,S</i>)-2-octanol.....	58
Figura 14: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido hexanóico e (<i>R</i>)-2-octanol	59
Figura 15: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido hexanóico e (<i>S</i>)-2-octanol	60

Figura 16: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido hexanóico e (R,S)-2-octanol.....	61
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Micro-organismos produtores de cutinase.....	7
Tabela 2: Concentração do extrato bruto e Atividade Cutinolítica.....	28
Tabela 3: Atividade cutinolítica (U), Concentração de proteínas totais e Atividade específica (U_{esp}).....	30
Tabela 4: Valores de v_{max} e k_m para as cutinases brutas de <i>Fusarium oxysporum</i> produzida em diferentes meios de cultivo	42
Tabela 5: Efeito da adição de 1mM de diferentes sais minerais na atividade das cutinases brutas produzidas por <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes meios de cultivo	45
Tabela 6: Efeito da adição de 10 mM de diferentes sais minerais na atividade das cutinases brutas produzidas por <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes meios de cultivo	46
Tabela 7: Hidrofobicidade dos solventes orgânicos (log P).....	51
Tabela 8: Efeito dos solventes orgânicos na atividade das cutinases brutas.....	51
Tabela 9: Esterificação do (<i>R</i>) e (<i>S</i>)-2-octanol com ácido octanóico catalisada pelas cutinases em hexano a 30 °C e 168 horas de reação	62
Tabela 10: Esterificação do (<i>R,S</i>)-2-octanol com ácido octanóico catalisado pelas cutinases em hexano a 30 °C e 168 horas de reação.....	63
Tabela 11: Esterificação do (<i>R</i>) e (<i>S</i>)-2-octanol com ácido hexanóico catalisado pelas cutinases em hexano a 30 °C e 168 horas de reação	63
Tabela 12: Esterificação do (<i>R,S</i>)-2-octanol com ácido hexanóico catalisado pelas cutinases em hexano a 30 °C e 168 horas de reação.....	64

RESUMO

A cutinase (E.C. 3.1.1.74) é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações ésteres da cutina. A cutina é um biopolímero insolúvel em água, composto de ácidos graxos com C_{16} e C_{18} , e que está presente na superfície externa das partes aéreas das plantas. Estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar bioquimicamente cutinases produzidas por diferentes processos fermentativos, micro-organismos e meios de cultivo. As cutinases têm-se mostrado bastante estáveis em diferentes condições de análise. O conhecimento das condições ótimas de ação desta classe de enzimas, assim como dos fatores que afetam a sua atividade são de extrema importância para se compreender melhor a atuação e as alterações sofridas por estas enzimas em diferentes condições de estocagem e trabalho. Tendo em vista estas observações, o objetivo deste estudo foi caracterizar bioquimicamente e comparar as cutinases produzidas por *Fusarium oxysporum* em quatro meios de cultivo sólidos distintos, compostos por farelo de trigo, casca de soja, farelo de arroz e torta de pinhão manso. A caracterização de cada uma dessas enzimas mostrou que estas apresentam temperatura ótima entre 30 e 37°C, temperatura de estabilidade de 30°C para as enzimas produzidas em meios com de farelo de trigo e farelo de arroz e 37°C para as enzimas produzidas em meios com casca de soja e torta de pinhão manso. O pH ótimo de ação das quatro enzimas mostrou-se levemente alcalino, sendo igual a 8,0 nas enzimas produzidas em meios com farelo de trigo, casca de soja e farelo de arroz e 9,0 para a enzima produzida em meio com torta de pinhão manso. O pH em que as quatro enzimas foram mais estáveis foi igual a 6,0. As quatro enzimas apresentaram boa afinidade pelo substrato, com valores de constante cinética (k_m) que variaram de 0,25 a 0,65 mM. A enzima produzida em meio com casca de soja apresentou a maior velocidade máxima (v_{max}), 7,86 U/mL. A maioria dos sais minerais testados inativaram ou ativaram pouco as enzimas produzidas em meios com farelo de trigo, casca de soja e farelo de arroz, enquanto que a enzima produzida em meio com torta de pinhão manso foi bastante ativada na presença da maioria dos sais minerais. As enzimas de farelo de trigo, casca de soja e torta

de pinhão manso apresentaram maior especificidade por ésteres de cadeia carbônica média (*p*-nitrofenil caprilato), enquanto que a enzima produzida em meio com farelo de arroz apresentou maior especificidade por ésteres de cadeia curta (*p*-nitrofenil butirato). A enzima produzida em meio com torta de pinhão manso foi bastante ativa na presença de solventes orgânicos, especialmente o hexano. A eletroforese por SDS-PAGE mostrou uma banda de 27-30 kDa nas enzimas produzidas em meios com farelo de trigo, casca de soja e torta de pinhão manso. Em relação as suas propriedades enantiosseletivas, a enzima produzida em meio com casca de soja foi a que apresentou melhor resultado ($E=5,9$).

ABSTRACT

Cutinase (E.C. 3.1.1.74) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of esters bonds in cutin. Cutin is a biopolymer insoluble in water composed of fatty acids C₁₆ and C₁₈ and found in the outside surface of the plants' aerial parts. Studies have been conducted with the aim of biochemically characterizing the cutinases produced by different fermentation conditions, microorganisms and growth medium. Cutinases have proved to be very stable in different conditions of analysis. The knowledge of optimum conditions of this class of enzymes, as well as of the factors that affect their activity are very important in order to understand the action of such enzymes and the alterations they go through in different conditions of storage and use. Considering that, the objective of this study is to biochemically characterize and compare cutinases produced by *Fusarium oxysporum* in four different solid growth medium composed of wheat bran, soy rind, rice bran and *Jatropha curcas* seed cake. The characterization of each one of these enzymes showed that they present the optimum temperature between 30 and 37°C, stability temperature at 30°C for wheat bran and rice bran and 37°C for soy rind and *Jatropha curcas* seed cake. The optimum pH of action of the four enzymes was little alkaline: 8.0 for the enzymes produced by wheat bran, soy rind and rice bran and 9.0 for the enzyme produced by *Jatropha curcas* seed cake. The most stable pH for the four enzymes was 6.0. The four enzymes showed good affinity by the substrate, with values of k_m ranging from 0.25 to 0.65 mM. The enzyme produced in soy rind showed higher value of v_{max} 7.86 U/mL. Most of the tested mineral salts inactivated or activated just a little the enzymes produced by wheat bran, soy rind and rice bran, whereas the enzyme produced by *Jatropha curcas* seed cake was very activated in the presence of most of the mineral salts. The enzymes of wheat bran, soy rind and *Jatropha curcas* seed cake showed more specificity for medium-length carbonic chain esters (*p*-NPC), whereas the enzyme of rice rind showed more specificity for short-length chain esters (*p*-NPB). The enzyme of *Jatropha curcas* seed cake was very activated by the presence of organic solvents, especially hexane. The electrophoresis by SDS-PAGE showed a band of 27-30

kDa in the enzymes produced by wheat bran, soy rind and *Jatropha curcas* seed cake. Regarding enantioselectivity proprieties the enzyme produced in soy rind showed the best result ($E= 5.9$).

1. INTRODUÇÃO

As cutinases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações ésteres da cutina, sendo esta o principal componente da cutícula das plantas. A cutícula tem a função de proteger a planta do ambiente externo e está presente nas partes aéreas, como as folhas, flores, frutas e brotos. A cutina é um polímero insolúvel em água composto de ácidos graxos, usualmente com 16 ou 18 carbonos que contém até três grupos hidroxilas e está embebida em uma mistura complexa de lipídios apolares, chamados ceras (KOLATTUKUDY, 1985).

As cutinases além de degradar polímeros de cutina, hidrolisam rapidamente grande variedade de triacilgliceróis de cadeias curtas e longas. As cutinases representam uma ponte entre as esterases, as quais atuam em substratos solúveis em água, e as lipases, que exibem ativação interfacial, necessitando da interface água/óleo para a sua atividade. Este comportamento intermediário faz da cutinase objeto de muitos estudos sobre os diferentes aspectos de seu desempenho catalítico (BORREGUERA *et al.*, 2001).

As cutinases apresentam potencial de uso nas mais diferentes áreas, como nas indústrias de: derivados de leite e detergentes de uso doméstico hidrolisando a gordura (REGADO *et al.*, 2007; FLIPSEN *et al.*, 1998), alimentos e cosméticos na síntese de ingredientes como aromas (BARROS *et al.*, 2009), frutas e vegetais, aumentando a permeabilidade da superfície dos mesmos (AYROOKARAN *et al.*, 1991), farmacos na separação de enantiômeros (BORRREGUERO *et al.*, 2001; FRAGA, CARVALHO e MACEDO, 2009), tecidos melhorando a qualidade dos mesmos (DEGANI, GEPSTEIN e DOSORETZ, 2002; WANG, *et al.*, 2009), entre outras.

A fermentação em estado sólido apresenta grande potencial para a produção de enzimas. Ela pode ser especialmente interessante naqueles processos em que o extrato bruto obtido da fermentação pode ser diretamente utilizado como fonte da enzima (PANDEY *et al.*, 1999). A natureza do substrato empregado é um requisito importante que afeta o processo de fermentação em estado sólido e sua

seleção depende de vários fatores, principalmente relacionados ao custo e à disponibilidade (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

A caracterização bioquímica das enzimas identifica os parâmetros reais de utilização destes biocatalisadores com a finalidade de se obter processos com maior controle da qualidade e produtividade. Enzimas produzidas pelo mesmo micro-organismo em condições de cultivo diferentes podem apresentar comportamentos distintos e a identificação destas diferenças pode levar ao desenvolvimento de sistemas de produção ainda mais eficientes.

A procura por esterases mais robustas que ofereçam maior rendimento, é uma necessidade eminente das indústrias química, farmacêutica e de alimentos. As cutinases são estudadas há poucos anos e a literatura mostra resultados promissores neste sentido.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho visou caracterizar bioquimicamente cutinases obtidas por quatro meios sólidos de cultivo a fim de evidenciar as possíveis diferenças catalíticas das enzimas, quando produzidas em meios de composição distintas utilizando-se o mesmo micro-organismo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Produzir cutinase empregando *Fusarium oxysporum* em quatro meios sólidos compostos pelos subprodutos, farelo de trigo, casca de soja, farelo de arroz e torta de pinhão manso;

2.2.2. Semipurificar as cutinases obtidas por precipitação em sulfato de amônio;

2.2.3. Caracterizar bioquimicamente as cutinases quanto ao efeito da temperatura, pH, concentração do substrato, adição de sais minerais, tipo de substrato, solventes orgânicos e peso molecular;

2.2.4. Avaliar a enantiosseletividade destas enzimas na esterificação do álcool 2-octanol (racemato e enantiômeros puros) com os ácidos octanóico e hexanóico.

3. JUSTIFICATIVAS

Estudos anteriores, realizados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, indicaram que algumas características catalíticas das cutinases microbianas diferiam significativamente em função da composição do meio de cultivo em que eram produzidas. Os meios de cultivo utilizados foram compostos por farelo de trigo, casca de soja, farelo de arroz e meio líquido. As enzimas obtidas a partir destes meios foram testadas quanto à hidrólise e poder de separação de misturas racêmicas. Os resultados obtidos mostraram que as cutinases de *Fusarium oxysporum* além de ter boas características hidrolíticas, apresentam também boa capacidade de esterificação e que o meio de produção da enzima influencia na produção de isoenzimas com características diferentes, quando submetidas à mesma reação nas mesmas condições. Desta forma, a confirmação e caracterização destas diferenças, tornam-se imprescindíveis, a fim de se conhecer as melhores condições de estocagem e ação destas enzimas.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. CUTINASE

4.1.1. Classificação

As cutinases (E.C. 3.1.1.74) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações ésteres da cutina, sendo este o principal componente da cutícula das plantas. A cutícula tem a função de proteger a planta do ambiente externo e está presente nas partes aéreas, como as folhas, flores, frutas e brotos (MARTIN e JUNIPER, 1970).

A cutina é um polímero insolúvel em água composto de ácidos graxos usualmente com C₁₆ ou C₁₈ que contém até três grupos hidroxilas e está misturado em uma mistura complexa de lipídios apolares, chamados ceras. Estudos

utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa demonstraram que existem dois tipos de cutina com distribuição diferente de ácidos graxos. As plantas de crescimento rápido contêm predominantemente ácidos graxos de C_{16} , particularmente o dihidroxipalmitato como o principal constituinte da cutina. Já as plantas de crescimento lento apresentam a mistura de ácidos graxos de C_{16} e C_{18} como principal constituinte da cutina (WALTON e KOLATTUKUDY, 1972).

Há muito tempo se reconhece que a cutícula é a primeira barreira contra a entrada de agentes patogênicos nas plantas (KOLATTUKUDY e KÖLLER, 1983). A maioria dos fungos fitopatogênicos tem a capacidade de produzir cutinase, que degrada a cutina presente na cutícula das plantas, facilitando assim, o processo de penetração dos fungos (GEVENS e NICHOLSON, 2000). A degradação enzimática da cutina é um dos primeiros passos no processo de infecção das plantas pelos fungos (PURDY e KOLATTUKUDY, 1975). A espessura da cutícula varia muito em função da espécie e região da planta, estágio de desenvolvimento das diferentes partes desta planta e condições ambientais (KOLATTUKUDY, 1985).

A espessura da cutina, a sua idade e a sua composição química são fatores que determinam o ataque de determinados fungos nas plantas (GEVENS e NICHOLSON, 2000). O fungo *Venturia inaequalis*, um parasita comum em plantações de maçã, penetra apenas na cutícula de folhas de plantas jovens, onde a cutícula é relativamente fina, mas não consegue penetrar nas folhas mais velhas onde a cutícula é mais espessa (NICHOLSON *et al.*, 1973). Outros autores relataram que determinados compostos químicos produzidos pelas plantas, em momentos específicos de seu crescimento, podem impedir o desenvolvimento de alguns tipos de fungos que atacam a cutícula do algodão quando a planta é muito jovem ou quando ela está mais velha, já que na idade intermediária a planta apresenta a cutina compostos por alta concentração de ceras, ácidos da própria cutina, frações solúveis em etanol e frações solúveis em água, que impedem o crescimento destes micro-organismos (WANG e PINCKARD, 1973).

Esta claro que as cutinases possuem papel importante na penetração de superfícies intactas de plantas por certos fungos, baseado em estudos com inibidores químicos, anticorpos específicos para cutinase e uso de técnicas de biologia molecular (FETT *et al.*, 1992).

As cutinases pertencem ao grupo das hidrolases de éster carboxílico que são capazes de degradar polímeros de cutina, além de hidrolisar grande variedade de ésteres simples solúveis em água e triacilgliceróis insolúveis em água (LONGHI e CAMBILLAU, 1999). As cutinases são os menores membros da família das serinas hidrolases, que apresentam o sítio ativo composto pela tríade catalítica, serina, histidina e ácido aspártico (EGMOND e VLIEG, 2000). Elas representam uma ponte entre as esterases, que atuam em substratos solúveis em água, e as lipases, que exibem ativação interfacial e necessitam da interface água/óleo para a sua atividade. O sítio ativo das cutinases não é protegido por alça (tampa) hidrofóbica, a qual está caracteristicamente presente nas lipases. Este comportamento intermediário faz da cutinase objetivo de muitos estudos sobre os diferentes aspectos de sua performance catalítica (BORREGUERO *et al.*, 2001).

A subfamília das cutinases consiste em cerca de 20 membros, baseadas nas sequências de aminoácidos similares. Suas estruturas e dinâmica molecular são conhecidas em detalhes após extensivos estudos de cristalografia de raios X e ressonância nuclear magnética (EGMOND e VLIEG, 2000).

As cutinases podem ser produzidas por fungos, bactérias e plantas. Na Tabela 1 estão apresentados alguns micro-organismos produtores de cutinase.

Tabela 1: Micro-organismos produtores de cutinase (DUTTA, SEN e VEERANKI, 2009)

Fonte	Gênero	Espécie	Referência
Bactéria	<i>Streptomyces</i>	<i>scabies</i>	Longhi e Cambillau, 1999
		<i>acidiscabies</i>	Fett <i>et al.</i> , 1992
		<i>badius</i>	Fett <i>et al.</i> , 1992
	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	Sebastian, Chandra e Kolattukudy, 1987
		<i>mendocina</i>	Kim <i>et al.</i> , 2003
		<i>aeruginosa</i>	Fett <i>et al.</i> , 1992
	<i>Thermomonospora</i>	<i>fusca</i>	Fett <i>et al.</i> , 1999
	<i>Thermoactinomyces</i>	<i>vulgaris</i>	Fett <i>et al.</i> , 2000
Fungos	<i>Fusarium</i>	<i>solani pisi</i>	Purdy e Kolattukudy, 1975
		<i>oxysporum</i>	Pio e Macedo, 2007
		<i>roseum culmorum</i>	Gonçalves <i>et al.</i> , 1996
	<i>Colletotrichum</i>	<i>kahawae</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
		<i>gloeosporioides</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
	<i>Monilinia</i>	<i>fructicola</i>	Wang <i>et al.</i> , 2000
	<i>Venturia</i>	<i>inaequalis</i>	Trail e Koller, 1990
	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Trail e Koller, 1993
Pólen	<i>Tropaeolum</i>	<i>majus</i>	Mait <i>et al.</i> , 1979

No Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Macedo e Pio (2005) isolaram 400 cepas de fungos do solo e de plantas coletados de diferentes regiões do Brasil com o objetivo de verificar o potencial estereolítico destes fungos. As cepas selecionadas foram submetidas à fermentação em meio contendo cutina. A atividade lipolítica e cutinolítica destes fungos foram determinadas a fim de se diferenciar os fungos produtores de lipase dos produtores de cutinase. Dentre os micro-organismos avaliados, o que apresentou maior atividade cutinolítica foi identificado como *Fusarium oxysporum*.

O estudo de novas cutinases produzidas por diferentes micro-organismos e meios de cultivo, possibilita a obtenção de enzimas com características bioquímicas distintas. O estudo das características bioquímicas destas cutinases

permite o desenvolvimento de processos produtivos mais eficientes com menor custo.

4.1.2. Caracterização bioquímica

Estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de caracterizar bioquimicamente cutinases produzidas por diferentes processos fermentativos, micro-organismos e meios de cultivo. As cutinases têm se mostrado bastante estáveis em diferentes condições de análise. O conhecimento das condições ótimas de ação desta classe de enzimas, assim como dos fatores que afetam a sua atividade são de extrema importância para se compreender melhor a atuação e as alterações sofridas pela enzima em diferentes condições de trabalho e estocagem.

Chen *et al.* (2010) investigaram e compararam as propriedades bioquímicas de duas cutinases de *Thermobifida fusca*, que apresentam a estrutura de aminoácidos em 93% idênticas a de uma cutinase fúngica de *Fusarium solani pisi* recombinante. As cutinases bacterianas exibiram especificidade em vários substratos, dos quais podemos citar a cutina das plantas, poliésteres sintéticos, triacilgliceróis insolúveis em água e ésteres solúveis em água. Além disso, as duas isoenzimas da cutinase de *T. fusca* e da cutinase de *F. solani pisi* apresentaram comportamento cinéticos similares, no requerimento de íons metálicos e as três enzimas também não tiveram necessidade de ativação interfacial.

Kwon *et al.* (2009) caracterizaram duas cutinases recombinantes de *Fusarium solani* expressa em *Pichia pastoris*. Ambas as enzimas purificadas apresentam preferência por cadeias curtas de triacilgliceróis, quando submetidas ao método titulométrico de determinação de atividade enzimática. A massa molecular foi determinada por eletroforese SDS-PAGE e ambas as enzimas apresentaram massa molecular de aproximadamente 20-25 kDa. As temperaturas e pH ótimo de ação de ambas as enzimas estavam na faixa de 35 - 45°C e 8,0 - 10,0, respectivamente.

Liu *et al.* (2009) estudaram a reatividade, estabilidade e estrutura da cutinase de *Aspergillus oryzae* e as comparou com a cutinase de *Fusarium solani*. Duas principais diferenças na estrutura molecular da cutinase de *A. oryzae* foram comparadas com a cutinase de *F. solani*. Esta diferença na estrutura da cutinase de *A. oryzae* fez com que esta enzima apresentasse algumas diferenças em relação à cutinase de *F. solani*. A enzima de *A. oryzae* apresentou maior especificidade pelo substrato sintético *p*-nitrofenil valerato (*p*-NPV), enquanto que a cutinase de *F. solani* apresentou maior especificidade por *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA). Esta diferença possibilitou que a cutinase de *A. oryzae* hidrolisasse mais rapidamente o poliéster sintético policaprolactona, que apresenta cadeia carbônica maior.

Rubio *et al.* (2008), através de técnicas de melhoramento genético, isolaram e caracterizaram o gene ThCut1 expresso em *Pichia pastoris*. O gene ThCut1 mostrou similaridade com os genes das cutinases fúngicas e está presente no genoma do fungo *Trichoderma harzianum*. Diferentes substratos foram testados, utilizando-se o método espectrofotométrico, para a determinação da atividade cutinolítica total e específica. Foram testados os substratos *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA), *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB), *p*-nitrofenil valerato (*p*-NPV) e *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP). A enzima apresentou maior atividade total e específica com o *p*-NPA ($7,1 \pm 0,13 \mu\text{mol/min}$ e $2,84 \pm 0,13 \mu\text{mol/min}$ por mg proteínas, respectivamente) e os valores de atividade cutinolítica decresceram de acordo com o aumento do tamanho da cadeia.

Chen *et al.* (2008) compararam a temperatura ótima e de estabilidade, o pH ótimo e o tipo de substrato (*p*-NPB ou trioleína) de duas cutinases bacterianas e uma fúngica produzidas por fermentação líquida. As cutinases bacterianas avaliadas foram produzidas a partir de *Thermobifida fusca*, enquanto a cutinase fúngica foi produzida de *Fusarium solani pisi*. As três cutinases hidrolisaram trioleína (triacilglicerol insolúvel em água) e *p*-NPB (éster solúvel em água). As cutinases bacterianas apresentam temperatura ótima de 60°C em ambos os substratos avaliados, enquanto a cutinase fúngica apresentou temperaturas ótimas de 30°C para a trioleína e 40°C para o *p*-NPB. Em relação à estabilidade

térmica, as cutinases foram avaliadas nas temperaturas de 40 e 60°C. As cutinases bacterianas exibiram maior estabilidade, com atividade de mais de 80% após 160 horas de reação a 40°C e 50% após 40 horas a 60°C. O pH ótimo das três enzimas foi de aproximadamente 8,0 nos dois substratos testados. A cutinase fúngica foi significativamente menos estável, com atividades residuais de 50% após 85 horas a 40°C ou após 5 minutos a 60°C. Segundo os autores, as características bioquímicas das cutinases bacterianas e fúngicas apresentam similaridades em relação à especificidade do substrato e propriedades catalíticas.

Pio e Macedo (2007) caracterizaram bioquimicamente uma cutinase bruta de *Fusarium oxysporum* produzidas por fermentação líquida, em relação ao pH e temperatura de estabilidade. O efeito de sais minerais, indutores, solventes orgânicos e líquidos iônicos na atividade da enzima também foram estudados. A enzima permaneceu estável na faixa de temperaturas entre 30 e 50°C e pH entre 5,0 e 6,5. A maior atividade cutinolítica foi obtida na temperatura de 28°C e pH 6,0. A adição da maioria dos sais minerais aumentou a atividade da enzima, sendo o melhor resultado obtido na presença de 1 mM de K₂SO₄. Os solventes orgânicos na qual a enzima apresentou maior atividade foram hexano e isooctano.

Petersen *et al.* (2001) estudaram a estabilidade térmica da cutinase de *Fusarium solani pisi* em função do pH. Neste estudo, a estabilidade máxima da enzima ocorreu na faixa de pH entre 6,0 e 8,5; decaindo rapidamente em valores de pH abaixo de 6,0 e acima de 8,5. Com relação à temperatura, a faixa de maior estabilidade ocorreu entre 40 e 60°C. A maior atividade enzimática ocorreu em pH 8,5 e 57°C.

Liyanage *et al.* (1993) avaliaram cutinases produzidas por duas cepas geneticamente distintas de *Colletotrichum gloeosporioides* isoladas de citros. As massas moleculares das duas principais cutinases encontradas foram de 19 a 26 KDa e 21 a 24 KDa.

Trail e Koller (1993) purificaram e caracterizaram duas cutinases de fungos fitopatogênico *Alternaria brassicola*. Evidências observadas durante o trabalho indicaram que existe relação entre o pH ótimo de cutinases fúngicas e a

especificidade por determinados tecidos vegetais destes patógenos. Cutinases com pH ótimo ácido foram associados com patógenos de folhas e cutinases com pH ótimo alcalino foram associados com patógenos de tronco. *Alternaria brassicola* secreta dois tipos de cutinases e infecta a maioria dos tecidos. A cutinase A tem pH ótimo de 6,5 e a cutinase B apresentou pH ótimo de 8,5. Os pesos moleculares foram 23 kDa e 21 kDa, respectivamente.

Ertunga *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente duas espécies de cogumelos comestíveis, *Amanita vaginata* var. *vaginata* e *Tricholoma terreum* em relação à atividade estereolítica. Os extratos brutos de ambos os cogumelos apresentaram maior atividade na presença de *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) como substrato. O pH e temperatura ótimas foram de 8,0 e 30 °C, respectivamente, para ambas as enzimas. Os valores de v_m e k_m encontrados foram 14,2 U/L e 71 μ M para a enzima de *A. vaginata* var. *vaginata* e 34,6 U/L e 9,6 μ M para a de *T. terreum*, respectivamente. O pH de estabilidade apresentou-se constante entre 3,0 e 10,0 para ambas as enzimas. A atividade estereolítica dos extratos foi preservada na faixa de 10 e 40 °C e começou a decair na temperatura de 50 °C. A atividade enzimática foi inibida na presença dos íons metálicos Na^+ , Li^+ , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} e Cd^{2+} para *A. vaginata* var. *vaginata* e Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} e Al^{3+} para *T. terreum*. Todas as inibições ocorreram em diferentes graus e nenhum íon causou inibição total das enzimas.

Faiz *et al.* (2007) caracterizaram bioquimicamente uma nova cepa da bactéria termófila *Anoxybacillus gonensis* A4 em relação a atividade estereolítica. Foi observado que *A. gonensis* A4 produz uma esterase termoestável com peso molecular de 62 kDa. A enzima extracelular bruta foi caracterizada em termos de especificidade de substrato, pH e temperaturas ótimas e de estabilidade, parâmetros cinéticos e comportamento em relação à presença de íons metálicos. A esterase apresentou valores de v_m de 800 U/L e k_m de 176,5 μ M na presença do substrato *p*-NPB. A temperatura e pH ótimos encontrados foram de 60-80 °C e 5,5, respectivamente. Embora a atividade da enzima bruta não tenha sido significativamente alterada nas temperaturas de 30-70 °C por 1 hora, a atividade

da enzima foi totalmente inibida a 80°C neste mesmo período de tempo. O pH de estabilidade da enzima bruta foi 6,0.

4.1.3. Aplicações

As cutinases são enzimas com muitas possibilidades de aplicações industriais; trabalhos em diferentes áreas mostram que as cutinases são enzimas versáteis e apresentam resultados bastante promissores. Por ser uma enzima ainda pouco estudada, novas aplicações para esta classe de enzimas surgem frequentemente.

Barros *et al.* (2009) estudaram a síntese de etil ésteres de cadeia curta por cutinase de *Fusarium solani pisi* em meio com solvente orgânico (isooctano). Os ácidos graxos de cadeia curta fazem parte de um grande grupo de aromas naturais de interesse industrial. A cutinase apresentou alta seletividade para ácidos graxos de cadeia curta, especialmente os ácidos butírico (C₄) e valérico (C₅). O maior rendimento (97%) foi observado para a síntese de etil caproato, composto que faz parte dos aromas de maçã e abacaxi. Foi possível observar que a cutinase pode ser uma alternativa viável na produção de compostos de aromas naturais.

Wang *et al.* (2009) estudaram a utilização de cutinase de *Thermobifida fusca* WSH04, anterior à utilização de proteases, no pré-tratamento de lãs. Os dados obtidos demonstraram que a utilização da cutinase aumentou a molhabilidade da amostra devido ao descolamento parcial da camada lipídica externa. Este descolamento possibilitou o aumento da ação da protease, o que resultou em uma lã com maior molhabilidade, maior afinidade pelos corantes e a menor resistência do tecido de lã.

Degani, Gepstein e Dosoretz (2002) estudaram a capacidade da cutinase de *Pseudomonas mandocino* em aumentar a molhabilidade do algodão cru, proporcionando assim um algodão com maior facilidade de tingimento e acabamento. Este aumento da molhabilidade é devido à hidrólise específica da

estrutura da cutina presente na cutícula do algodão. Os autores testaram a utilização da cutinase sozinha e com a adição de pectinase. Os resultados demonstraram que a utilização sucessiva da cutinase e pectinase apresentaram efeito sinérgico, a cutinase causa um alargamento dos microporos, além de causar aberturas maiores na cutina do algodão. Estes efeitos puderam posteriormente, permitir a rápida penetração da pectinase no interior da camada de pectina do algodão.

Os inseticidas organofosforados são utilizados para o controle de pragas e permanecem no ambiente após o uso, causando vários problemas à saúde. Kim *et al.* (2005) estudaram a biodegradação e detoxicação do organofosforado malation utilizando cutinase de *Fusarium oxysporum* e esterase de *Candida cylindracea*. Os resultados demonstraram que a porcentagem de degradação do inseticida pela cutinase foi 60% da quantidade inicial durante os primeiros 30 minutos e cerca de 50% nos primeiros 15 minutos. Com o uso da esterase de levedura, cerca de 65% do malation permaneceu inalterado mesmo após 2 dias de tratamento. O principal produto formado com a utilização da cutinase foi o malation diácido (MDA), um produto não tóxico. A cutinase demonstrou excelente performance na degradação do MDA, sendo uma alternativa viável na degradação de inseticidas organofosforados.

Ayrookaran e Matthew (1990) estudaram a desidratação de frutas e vegetais que apresentavam a membrana superficial rígida. A utilização de cutinase na superfície destas frutas permitiu a degradação destas membranas e posterior drenagem da água presente no interior destes frutos e vegetais. Os produtos resultantes não só foram desidratados mais facilmente, como também puderam ser incorporados de substâncias no seu interior como edulcorantes, estabilizantes, conservantes, aromas, entre outros.

Devido à sua enantiosseletividade, algumas cutinases têm sido empregadas em vários processos de separação de enantiômeros por meio de hidrólise em meio aquoso ou de síntese em meio orgânico. A separação de enantiômeros na indústria de alimentos apresenta inúmeras aplicações, como na identificação de

alimentos e bebidas adulteradas, controle e monitoramento mais precisos do processo de fermentação, na avaliação e identificação de contaminantes microbianos e na avaliação mais precisa de alguns aromas e fragrâncias (ARMSTRONG, CHANG e LI, 1990).

Fraga, Carvalho e Macedo (2009) testaram o potencial enantiomérico de cutinases de *Fusarium oxysporum* produzidas em três diferentes meios sólidos de cultivo, farelo de trigo, farelo de arroz e casca de soja e um meio líquido, obtendo bons resultados para estas enzimas na resolução de alcoóis e fármacos racêmicos. Os resultados demonstraram a capacidade das cutinases na separação de misturas racêmicas.

Boersma *et al.* (2008) sintetizaram uma variante de lipase híbrida de *Bacillus subtilis* que não apresentava o sítio ativo protegido e a comparou com uma cutinase híbrida de *Fusarium solani* e uma esterase híbrida de *Penicillium purpurogenum* que também não apresentavam os sítios ativos protegidos por “tampa”. Segundo os autores, a composição de aminoácidos desta “tampa” que protege o sítio ativo da maioria das lipases afetam a especificidade e enantiosseletividade das mesmas. Desta forma, as enzimas que não apresentam esta proteção no sítio ativo parecem ser mais eficientes na separação de enantiômeros. Os resultados obtidos demonstraram que a cutinase apresentou enantiosseletividade superior às demais enzimas, com grande potencial de aplicação em separações enantioméricas. Porém estudos de otimização das condições de análise ainda devem ser feitos para viabilizar a utilização desta classe de enzimas nestas separações.

4.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como o processo de crescimento de micro-organismos sobre substrato sólido na ausência (ou quase ausência) de água livre circulante (CARRIZALES e JAFFE, 1986). A FES mostra-se como alternativa aos processos convencionais de fermentação, diferindo-se da fermentação submersa (FS) pela quantidade de água livre presente. A água livre,

no entanto, não parece ser o meio natural para maioria dos micro-organismos. Nem mesmo os micro-organismos marinhos preferem nadar na água livre do mar, visto que 98% dos micro-organismos isolados do meio marinho foram obtidos abaixo da superfície aquática em substratos sólidos (HÖLKER, HÖFER e LENZ, 2004).

Segundo Pandey, Soccol e Mitchell (2000) a FES não deve ser vista como tecnologia que simplesmente irá substituir a FS. A FS apresenta muitas características que a tornam um processo preferível no caso em que ambos, FES e FS, apresentam custos semelhantes. A maior homogeneidade no sistema de FS torna o processo mais fácil de controlar. A enorme quantidade de pesquisa em FES em nível laboratorial, para os mais variados produtos, comparativamente com o reduzido número de processos com FES explorados em nível comercial, é uma confirmação deste fato. Entretanto, para certos produtos como enzimas e alguns ácidos orgânicos, a FES apresenta-se reconhecidamente superior. Em consequência disso, apreciável quantidade de processos com FES começaram a ser operados industrialmente. Existe, portanto, a necessidade de desenvolvimento da FES como tecnologia, de tal forma a explorar todo o seu potencial.

As desvantagens mais significativas da FES apresentadas na literatura são: o uso de micro-organismos que crescem em baixos níveis de umidade, dificuldade para remoção do calor gerado pelo processo de respiração do micro-organismos, dificuldade na medida e controle dos níveis de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados, escassez de dados de engenharia e de projetos para fermentadores, necessidade de grande quantidade de inóculo e pré-tratamento do substrato (LONSANE *et al.*, 1992; PANDEY, 1991; GUTIERREZ-ROJAS e TORRES, 1992).

A natureza do substrato empregado é requisito importante que afeta o processo de FES e sua seleção depende de vários fatores, principalmente relacionados ao custo e à disponibilidade (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000). A utilização de subprodutos agroindustriais é vantajosa, pois, além de prover substrato alternativo, são de baixo custo e grande disponibilidade. O

substrato que oferece todos os nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo pode ser considerado substrato ideal. Entretanto alguns nutrientes podem estar em concentrações baixas ou mesmo ausentes. Nestes casos, é necessária a suplementação do substrato com fontes externas destes nutrientes (PANDEY *et al.*, 1999).

Os substratos sólidos devem servir tanto como fonte de nutrientes como apoio ao crescimento dos micro-organismos. No caso das bactérias e leveduras, o crescimento tende a ser apenas na superfície das partículas, enquanto que os bolores podem produzir hifas, que penetram abaixo da superfície das partículas, e hifas aéreas, que se estendem pelos inter espaços das mesmas (CASTILHO, MITCHELL e FREIRE, 2009). Neste processo, os fungos filamentosos apresentam vantagens potenciais por serem capazes de penetrar em substratos rígidos (RAMACHANDRAN *et al.*, 2004). O teor de umidade deve ser mantido suficientemente elevado de modo a alcançar os teores de atividade de água que não são limitantes para o crescimento microbiano, mas, ao mesmo tempo não deve exceder a capacidade de absorção de água do material sólido (CASTILHO, MITCHELL e FREIRE, 2009).

De acordo com a fonte utilizada pelos micro-organismos, os substratos podem ser divididos em três grupos: os que contêm amido, os que contêm celulose e lignocelulose e os que contêm açúcares solúveis como fonte de carbono. Dos substratos amiláceos, pode-se citar arroz, mandioca, farelo de trigo, farelo de arroz, sementes de milho e resíduos de batata doce. Em relação aos substratos celulósicos, encontra-se bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, de milho e de arroz. Dentre os substratos sólidos contendo açúcares solúveis, podem-se citar polpas de uva e beterraba doce, restos de abacaxi, polpa de café, casca de laranja e de manga, entre outros (MITCHELL *et al.*, 2000).

A FES apresenta grande potencial para a produção de enzimas. Ela pode ser especialmente interessante naqueles processos em que o extrato bruto obtido da fermentação pode ser diretamente utilizado como fonte da enzima. Este sistema de produção de enzimas oferece muitas vantagens em relação à FS, que incluem

maior produtividade volumétrica, maior concentração relativa de produtos, menor geração de efluentes e uso de equipamentos relativamente simples (PANDEY *et al.*, 1999).

Nos últimos anos a FES tem recebido mais atenção dos pesquisadores, desde que estudos com enzimas, aromas, corantes e outros ingredientes da indústria de alimentos, mostraram que a utilização da FES aumenta o rendimento ou melhora as características do produto quando comparado com a FS (COUTO e SANROMÁN, 2006).

Lipases bacterianas e fúngicas, assim como a maioria das enzimas de uso industrial, podem ser obtidas por fermentação em estado sólido (FES). Nagy *et al.* (2006) fizeram uma seleção de fungos filamentosos termófilos produtores de lipase e esterase por FES, utilizando farelo de trigo e óleo de oliva como fontes de carbono e indutores das enzimas. Os autores obtiveram como resultado extratos enzimáticos com alta enantiosseletividade para alcoóis racêmicos secundários.

Azeredo *et al.* (2007) observaram que a produção de enzimas por FES apresenta algumas vantagens, como a baixa produção de catabólicos que atrapalham a fermentação e maior estabilidade e produtividade das enzimas excretadas.

Fraga, Carvalho e Macedo (2009) testaram diferentes subprodutos e resíduos agroindústrias para a produção de cutinase de *Fusarium oxysporum* utilizando FES. Dos subprodutos testados os que apresentaram melhor resultados foram: farelo de trigo (27,5 U/mL), farelo de arroz (18,8 U/mL) e casca de soja (11,9 U/mL) após 72 horas de fermentação. A suplementação destes meios com carbono e minerais inibiu a produção da enzima.

Pio e Macedo (2007) otimizaram a produção de cutinase de *Fusarium oxysporum* utilizando fermentação líquida. O maior valor de atividade cutinolítica foi de 22,7 U/mL com o meio sendo suplementado com óleo de linhaça em substituição à cutina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. MATERIAIS

5.1.1. Reagentes

- Triton X-100 e Tetrahidrofurano (Merck), *p*-NPB, *p*-NPC, *p*-NPL e *p*-NPP (Sigma-Aldrich Brasil Co);
- Padrão de proteínas de baixa massa molecular para eletroforese (Bio-Rad);
- Meios de cultivo farelo de trigo (Natu's), casca de soja, farelo de arroz (indústrias de beneficiamento de grãos da região de Campinas) e torta de pinhão manso (subproduto da extração do óleo);
- Padrões para Cromatografia de camada delgada e Cromatografia gasosa: ácido octanóico, ácido hexanóico, (R)-2-octanol, (S)-2-octanol, (R,S)-2-octanol (Aldrich Chemical);
- Ácidos, bases e sais em geral.

5.1.2. Equipamentos

- Estufa Retilínea Fanem;
- Autoclave Phonex Modelo AV. 50;
- Agitador rotatório New Brunswick – série 25;
- Centrífuga Beckman modelo J2-21;
- Espectrofotômetro Beckman Coulter™ DU® 640;
- Banho de água termostaticado Micronal B12D;
- Phmêtro ISE meter modelo 710A;
- Equipamento para eletroforese Mini-Protean II com fonte PS 500XT Hoefer;
- Cromatógrafo gasoso Chrompack modelo CP 9001 equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna de separação do tipo CP-WAX 52 CB com 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm. Coluna quiral de β-ciclodextrina BETA DEX™ 120 com 60m x 0,25 mm x 0,25 µm, Supelco Inc.

5.1.3. Outros materiais

- Placas de sílica gel 10x10cm, Alugran Sil G/UV₂₅₄.

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Micro-organismo

A linhagem de fungo empregada neste trabalho foi a de *Fusarium oxysporum*, isolada a partir do solo da UNICAMP - Campinas-SP (MACEDO e PIO, 2005). Para a produção do fungo foi utilizado o meio *potato dextrose agar* (PDA). Após o crescimento foi adicionado vaselina ao tubo para melhor conservação do meio, a linhagem foi estocada a 4 °C e utilizada para a produção de cutinases em quatro diferentes meios de cultivo.

5.2.2. Meios de cultivo para fermentação

Os quatro diferentes subprodutos agroindústrias (farelo de trigo, casca de soja, farelo de arroz e torta de pinhão manso), utilizados como meios de cultivo para o micro-organismo foram triturados, submetidos à temperatura de 60°C por 24 horas e autoclavados a 121°C por 20 minutos antes de serem utilizados.

5.2.3. Produção das cutinases brutas

As cutinases foram produzidas nos quatro meios de cultivos sólidos. A composição destes meios já havia sido estudada e otimizada por Fraga, Carvalho e Macedo (2009). A cada *Erlenmeyer* de 250 mL foi adicionado 20g de meio de cultivo 1 (farelo de trigo), 2 (casca de soja), 3 (farelo de arroz) e 4 (torta de pinhão manso) e 20 mL de água destilada. Em seguida foi adicionada a cada *Erlenmeyer* com um tipo diferente de meio de cultivo, uma alíquota contendo $2,65 \times 10^7$ esporos de *Fusarium oxysporum* (contagem através de Câmara de Neubauer). Os frascos foram incubados em estufa a 30°C por 72 horas. Após a incubação, foi adicionado em cada frasco 100 mL de água destilada e os mesmos foram submetidos à agitação rotatória por 1 hora à temperatura ambiente e 100 rpm. A mistura foi filtrada em algodão e ao filtrado foi adicionado sulfato de amônio até 80% saturação. O precipitado foi separado por centrifugação por 15 minutos a 10°C e 7.100xg e dialisado com água destilada por 24 horas. A preparação foi então congelada e liofilizada, sendo denominada cutinase bruta.

5.2.4. Determinação da atividade enzimática das cutinases brutas

Foi preparado o substrato contendo; 1,74 mL de tetrahidrofurano, 0,1 mL de triton X-100; 9,8 µL de p-NPB e tampão fosfato 0,1M pH 7,2 até completar o volume de 50 mL (MACEDO e PIO, 2005). Uma alíquota de 3,43 mL deste substrato foi misturada a 0,07mL da solução enzimática em água destilada (5 mg/mL dos extratos liofilizados dos meios com farelo de trigo e casca de soja e 10 mg/mL dos extratos liofilizados dos meios com farelo de arroz e torta de pinhão

manso). Imediatamente após a mistura, a reação foi monitorada por 15 minutos à temperatura ambiente contra o branco (substituição da enzima pelo tampão fosfato). Após este período foi determinada espectrofotometricamente a hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) a 405 nm (KOLATTUKUDY, 1985). Os valores de absorbâncias medidas foram utilizados para o cálculo da atividade cutinolítica fazendo uso da equação da curva padrão do *p*-nitrofenol (Anexo 1). Uma unidade de atividade cutinolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter um μmol de *p*-NPB em *p*-NP em um minuto sob as condições especificadas.

5.2.5. Determinação da quantidade de proteínas

A quantidade de proteína presente em cada extrato liofilizado foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão de proteínas (Anexo 2).

5.2.6. Caracterização bioquímica das cutinases brutas

5.2.6.1. Efeito da temperatura na atividade das cutinases brutas

O efeito da temperatura na atividade de cada enzima foi determinado como descrito no item 5.2.4., utilizando-se as seguintes temperaturas de incubação: 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C e 75°C. Após o tratamento térmico as amostras foram resfriadas em banho de gelo. A atividade cutinolítica foi expressa em termos de atividade relativa (considerando 100% a maior atividade encontrada). Os experimentos foram realizados em duplicata

5.2.6.2. Efeito da temperatura na estabilidade das cutinases brutas

Tubos com cada uma das enzimas (5 mg/mL dos extratos liofilizados dos meios com farelo de trigo e casca de soja e 10 mg/mL dos extratos liofilizados dos meios com farelo de arroz e torta de pinhão manso) foram incubados com 1 mL de água destilada na faixa de temperatura de 25 °C à temperatura de ebulição durante 1 hora em banhos de água termostatizados. Após o tratamento térmico, a atividade cutinolítica foi determinada de acordo com o item 5.2.4., e expressa em termos de atividade relativa. Os experimentos foram realizados em duplicata

5.2.6.3. Efeito do pH na atividade das cutinases brutas

O efeito do pH na atividade de cada enzima foi testado na faixa de pH de 3,6 a 10,0. Os tampões utilizados foram: tampão acetato 0,1M a pH 3,6, 4,0, 5,0 e 5,6; tampão fosfato 0,1M a pH 6,0, 6,5 e 7,0; tampão Tris-HCl 0,1M a pH 8,0, 8,5 e 9,0 e tampão borato-NaOH 0,1M a pH 9,5 e 10,0. A atividade enzimática foi determinada como descrito no item 5.2.4., com a substituição do tampão fosfato 0,1M a pH 7,2 por cada um dos tampões descritos acima. A atividade cutinolítica foi expressa em termos de atividade relativa. Os experimentos foram realizados em duplicata

5.2.6.4. Efeito do pH na estabilidade das cutinases brutas

Tubos com cada uma das enzimas (5 mg/mL dos extratos liofilizados dos meios com farelo de trigo e casca de soja e 10 mg/mL dos extratos liofilizados dos meios com farelo de arroz e torta de pinhão manso) foram incubados com 1 mL de diferentes soluções tampões 0,1M na faixa de pH de 4,0 à 10,0 por 24 horas em banhos termostatizados na temperatura ótima de cada enzima. Os tampões utilizados foram: tampão acetato pH 4,0, 5,0 e 5,6; tampão fosfato pH 6,0, 6,5 e 7,0; tampão Tris-HCl pH 8,0, 8,5 e 9,0 e tampão borato-NaOH pH 9,5 e 10,0. Após este período, a atividade cutinolítica foi determinada de acordo com o item 5.2.4.,

e expressa em termos de atividade relativa. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.2.6.5. Efeito da concentração do substrato na atividade das cutinases brutas

O efeito da concentração do substrato na atividade das enzimas foi avaliado variando a quantidade de *p*-NPB adicionada à reação descrita no item 5.2.4. A faixa de variação do substrato foi de 0,56mM à 4,48mM. Os dados experimentais foram linearizados, conforme a equação de Lineweaver-Burk para a obtenção da velocidade máxima das reações (v_{\max}) e dos valores da constante cinética de Michaelis-Menten (k_m) de cada enzima (LINEWEAVER e BURK, 1934). Os experimentos foram realizados em duplicata

5.2.6.6. Efeito da adição de diferentes sais minerais em diferentes concentrações na atividade das cutinases brutas

A influência de diferentes sais minerais na atividade enzimática foi determinada utilizando-se o sistema de reação descrito em 5.2.4., com a adição dos seguintes sais nas concentrações de 1mM e 10mM: CaCl_2 , KCl , HgCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , K_2HPO_4 , NaNO_3 , FeSO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , K_2SO_4 , Na_2SO_4 , NaHSO_3 . Para cada teste, foi utilizado um branco, contendo o mesmo sal na mesma concentração. Uma amostra controle sem adição de sal foi utilizada para cada enzima. Os experimentos foram realizados em duplicata

5.2.6.7. Reações de hidrólise de substratos sintéticos

Foi testada a influência de diferentes substratos na atividade enzimática substituindo-se o *p*-NPB da reação descrita no item 5.2.4., pelos seguintes substratos: *p*-nitrofenil caprilato (*p*-NPC), *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) e *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP). Os experimentos foram realizados em duplicata

5.2.6.8. Efeito de solventes orgânicos na estabilidade das cutinases brutas

Para estudar a influência de solventes orgânicos na atividade enzimática, tubos com cada uma das enzimas (5 mg/mL dos extratos liofilizados dos meios com farelo de trigo e casca de soja e 10 mg/mL dos extratos liofilizados dos meios com farelo de arroz e torta de pinhão manso) foram incubados com 1 mL de diferentes solventes orgânicos por 1 hora na temperatura ótima de cada enzima. Após este período os solventes foram evaporados utilizando-se nitrogênio gasoso; a enzima foi ressuspensa com água destilada e a atividade cutinolítica foi determinada como descrito no item 5.2.4. Os solventes utilizados foram: acetona, metanol, etanol, butanol, propanol, hexano e octanol. Os resultados foram expressos em termos de atividade relativa (considerando 100% a atividade medida sem a adição de solvente orgânico). Os experimentos foram realizados em duplicata

5.2.6.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os extratos brutos produzidos e parcialmente purificados de acordo com a metodologia descrita no item 5.2.3., foram submetidos à eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) para a comparação das subunidades das proteínas de cada enzima. A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida 12% à temperatura ambiente de acordo com LAEMMLI (1970) e SVASTI e PANIJPAN (1977).

Preparação do gel de separação: em bquer de 10 mL foram misturados 3,4 mL de água destilada; 4 mL de solução Acrilamida/Bis (composto por 29,2 g de acrilamida e 0,8g de N,N'-metileno-bis-acrilamida em 100 mL de água destilada); 2,5 mL de solução tampão Tris-HCl (pH 8,8 e 1,5M); 0,1 mL de solução 0,1mL de dodecil sulfato de sódio (SDS); 10µL de solução TEMED (tetra – metil – etileno – diamino) e 50 µL de solução 10% de persulfato de amônio (m/v), completando o volume para 10mL.

Preparação do gel de empacotamento: em béquer de 10 mL foram misturados 6,1 mL de água destilada; 1,3 mL de solução Acrilamida/Bis (composta de 29,2 g de acrilamida e 0,8 g de N,N'-metileno-bis-acrilamida em 100 mL de água destilada); 2,5 mL de solução tampão Tris-HCl (0,5M, pH 6,8); 0,1 mL de solução 10% de (SDS); 10 µl de solução TEMED e 50 µl de solução 10% de persulfato de amônia, completando o volume para 10mL.

Tampão da amostra: em béquer de 10 mL foram misturados 3,4 mL de água destilada; 1,0 mL de solução tampão Tris-HCl (0,5M, pH 6,8); 1,6 mL de glicerol; 1,6 mL de solução 10% de SDS; 0,4mL de β - mercaptoetanol e 0,1 g de azul de bromofenol, completando o volume para 8mL.

Tampão para corrida: em béquer de 1000 mL foram misturados 15 g de Tris-base; 72 g de glicina e 5 g de SDS. Completou-se o volume com 1000 mL de água destilada. Antes da utilização foi feito a diluição tampão para corrida: água destilada na proporção 1:4 (v:v).

Padrões de proteínas: fosforilase b (97,4 kDa), soro albumina bovino (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

Corrida da amostra: os padrões e as amostras preparadas foram colocados em cada orifício do gel superior da placa em quantidades de aproximadamente 15 µl com auxílio de microseringa de 50 µl. A cuba vertical para eletroforese contendo a placa foi então conectada à fonte PS 500 XT. A corrida eletroforética foi feita com correntes de 120 V e o tempo de corrida foi de aproximadamente 2 horas. As proteínas foram coradas com Comassie brilhante G-250.

5.2.7. Caracterização enantiosseletiva

5.2.7.1. Reações de esterificação enantiosseletiva das cutinases brutas

A fim de se avaliar a capacidade de esterificação enantiosseletiva das enzimas, 40 mM do álcool 2-octanol (nas formas enantiomericamente pura e na forma racêmica) foram misturados a 40 mM do ácido octanóico ou hexanóico, em seguida adicionou-se 5 mg das enzimas brutas produzidas em farelo de trigo e casca de soja e 10 mg das enzimas brutas produzidas em farelo de arroz e torta de pinhão manso dissolvidas em 4 mL de hexano. Experimentos sem a adição das enzimas (branco) foram feitos a fim de se verificar a esterificação espontânea. As amostras foram incubadas à temperatura de 30 °C por 168 horas em agitador rotativo a 130 rpm. Após este período a capacidade de esterificação das enzimas foi avaliada utilizando-se cromatografia em camada delgada e posteriormente cromatografia gasosa, sendo que os enantiômeros, *R*-éster e *S*-éster foram quantificados por cromatografia gasosa em fase quiral.

5.2.7.2. Cromatografia em camada delgada para a determinação de formação de éster

A cromatografia em camada delgada foi feita em placas de sílica gel utilizando como fase móvel éter de petróleo: éter etílico: ácido fórmico na proporção 210: 90: 0,4 (v:v:v) à temperatura de 25 °C. As amostras e o branco foram aplicados em uma extremidade da placa na forma de uma pequena mancha com auxílio de uma micropipeta (4 µL). A placa foi colocada em uma cuba retangular de vidro saturada com a fase móvel. Após a corrida cromatográfica de 20 minutos, os compostos foram revelados utilizando-se vanilina sulfúrica (0,5 g de vanilina; 0,5mL de ácido sulfúrico e 9 mL de etanol), seguido de aquecimento em estufa a 100 °C. Após a revelação, foi possível detectar as diferentes zonas de acordo com a afinidade com a fase móvel.

5.2.7.3. Caracterização enantiosseletiva das cutinases brutas

A confirmação da capacidade de esterificação e enantiosseletividade das amostras catalisadas pelas enzimas de farelo de trigo e casca de soja foi feita utilizando-se cromatografia gasosa equipada com detector de ionização de chamas (FID). A porcentagem de esterificação (expressa como % conversão) alcançada pelas reações enzimáticas foi determinada utilizando-se a coluna CP-WAX 52 CB. A temperatura inicial da coluna foi de 50°C por 2 minutos, aumentando gradativamente 10°C por minuto até chegar à temperatura de 220°C, na qual permaneceu por 15 minutos. A temperatura do detector foi fixada em 250°C e a temperatura do injetor em 220°C. O gás de arraste empregado foi o hidrogênio na vazão de 1 mL por minuto em sistema de injeção split com razão de 1:100.

As formas enantioméricas dos ésteres produzidos na reação com as enzimas produzidas em farelo de trigo e casca de soja foram analisadas através do mesmo equipamento utilizando coluna quiral de fase estacionária de β -ciclodextrina BETA DEX. A temperatura inicial da coluna foi de 95°C por 30 minutos, aumentando gradativamente de 5°C por minuto até 220°C, na qual permaneceu por 30 minutos. As demais condições utilizadas foram as mesmas descritas acima. A quantidade relativa de cada enantiômero do éster (produto da reação) foi calculada a partir das áreas dos picos registrados.

A razão enantiomérica (E) das cutinases foi determinada a partir dos valores de conversão (c) e excesso enantiomérico do produto (ee_p), segundo método descrito por Chen *et al.* (1982) e equações 1 e 2.

Equação 1:
$$ee_p = [(S\text{-éster} - R\text{-éster}) / (S\text{-éster} + R\text{-éster})]$$

Equação 2:
$$E = \{ \ln [(1-c) \times (1+ee_p)] / \ln [(1-c) \times (1-ee_p)] \}$$

Sendo *S-éster* a quantidade do enantiômero *S-éster* formado na reação e *R-éster* a quantidade do enantiômero *S-éster* formado na reação.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CUTINASES BRUTAS

A atividade cutinolítica foi calculada como descrito no item 5.2.4. Na Tabela 2 estão ilustrados os valores da atividade cutinolítica (U/mL) das enzimas produzidas pelo micro-organismo *Fusarium oxysporum* nos quatro diferentes meios de cultivo.

Tabela 2: Concentração do extrato bruto e Atividade Cutinolítica

Substrato para produção das cutinases	Concentração do extrato bruto (mg/mL)	Atividade cutinolítica (U/mL)
Farelo de trigo	5	13,64
Casca de soja	5	18,88
Farelo de arroz	10	6,12
Torta de pinhão manso	10	7,29

Os resultados da Tabela 2 mostram que as enzimas produzidas nos quatro diferentes meios de cultivo apresentaram valores de atividade cutinolítica

significativos, em comparação com os dados da literatura, destacando-se as enzimas produzidas nos meios de cultivo com casca de soja (18,88 U/mL) e farelo de trigo (13,64 U/mL).

Fraga, Carvalho e Macedo (2009) produziram cutinases por FES utilizando o micro-organismo *Fusarium oxysporum* em três diferentes meios de cultivo: farelo de trigo, casca de soja e farelo de arroz. Dos três meios utilizados, a maior atividade cutinolítica foi da enzima produzida no meio de cultivo com farelo de trigo (15,5 U/mL), seguida da enzima produzida no meio com casca de soja (11,7 U/mL). A enzima produzida no meio de cultivo com farelo de arroz apresentou atividade de 10,5 U/mL. Estes resultados foram obtidos após 72 horas de fermentação.

Os resultados obtidos por Fraga, Carvalho e Macedo (2009) são semelhantes aos obtidos neste trabalho (Tabela 2). Estes resultados confirmam a capacidade dos meios de cultivo farelo de trigo, casca de soja e farelo de arroz para a produção de cutinases pelo fungo *Fusarium oxysporum*. A escolha do meio de cultivo torta de pinhão manso foi devido à disponibilidade deste subproduto, que é gerado após a extração do óleo para a produção de biocombustíveis. Este subproduto apresenta altos teores de nitrogênio, fósforo e potássio; além disso, embora não tenha sido o objetivo deste trabalho, a possibilidade de detoxificação deste resíduo pela cutinase seria muito interessante do ponto de vista ambiental. O valor da atividade cutinolítica obtida mostrou que este meio de cultivo, assim como os demais, é apropriado para o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* com posterior produção da cutinase.

Pio e Macedo (2007) produziram cutinases em meio líquido mineral suplementado com óleo de linhaça em substituição à cutina e obtiveram valor de atividade cutinolítica de 22,68 U/mL após 48 horas de fermentação. Os resultados obtidos utilizando FS são próximos aos obtidos neste trabalho, mostrando assim que a FES pode ser uma alternativa viável para a produção de cutinases.

Além das cutinases, outras enzimas como as lipases, podem ser produzidas por FES, com resultados muito semelhantes aos obtidos neste trabalho. Wolski *et*

al. (2009) caracterizaram parcialmente extratos enzimáticos de lipases produzidas por uma nova espécie de *Penicillium sp.* utilizando FS e FES. A atividade lipolítica obtida para cada enzima foi 11,28 U/mL e 15,17 U/mL, respectivamente. Os resultados, segundo os autores, demonstram o potencial da técnica de FES para a produção de enzimas, já que o valor de atividade lipolítica e o tempo de meia vida da enzima a 25 °C foi maior em comparação com a enzima produzida por FS.

6.2. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS DAS CUTINASES BRUTAS

A quantidade de proteínas presente em cada extrato bruto foi calculada como descrito no item 5.2.5. Na Tabela 3 esta apresentada os valores de concentração de proteínas e atividade específica de cada enzima.

Tabela 3: Atividade cutinolítica (U), Concentração de proteínas totais e Atividade específica (U_{esp})

Substrato para produção das cutinases	U/mL	Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ do extrato bruto)	U_{esp} (U/mg de proteínas)
Farelo de trigo	13,64	21,50	0,63
Casca de soja	18,88	18,57	1,01
Farelo de arroz	6,12	6,93	0,88
Torta de pinhão manso	7,29	28,37	0,26

A enzima com maior concentração de proteínas foi a produzida no meio de cultivo com torta de pinhão manso, seguida da enzima produzida no meio com farelo de trigo. A enzima com menor concentração de proteínas foi a produzida no meio com farelo de arroz (Tabela 3).

Fraga (2008) testou os resíduos agroindustriais farelo de trigo, casca de soja, farelo de arroz para a produção de cutinase de *Fusarium oxysporum* utilizando

FES e comparou com cutinase de *Fusarium oxysporum* produzida por fermentação líquida. Os valores de atividade específica das cutinases produzidas em farelo de trigo, casca de soja, farelo de arroz e por fermentação líquida foram: 0,08; 0,18; 0,15 e 0,11 U/mg de proteínas, respectivamente.

Rubio *et al.* (2008) através de técnicas de melhoramento genético, isolaram e caracterizaram o gene ThCut1 expresso em *Pichia pastoris*, que mostrou similaridade com os genes das cutinases fúngicas do fungo *Trichoderma harzianum*. Diferentes substratos foram testados, utilizando-se o método espectrofotométrico para a determinação da atividade cutinolítica total e específica. Foram testados os substratos *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA), *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB), *p*-nitrofenil valerato (*p*-NPV) e *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP). Destes substratos, o que a enzima apresentou maior atividade específica foi o *p*-NPA (2,84 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg proteínas, seguido do *p*-NPB (0,74 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg proteínas). O valor da atividade específica decresceu com o aumento do tamanho da cadeia do substrato.

6.3. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CUTINASES BRUTAS

6.3.1. Efeito da temperatura na atividade das cutinases brutas

O efeito da temperatura na atividade das cutinases brutas foi determinado como descrito no item 5.2.6.1. De acordo com a Figura 1, foi possível observar que a temperatura ótima de atividade das enzimas produzidas nos meios de cultivo com farelo de arroz e torta de pinhão manso foi de 30°C, enquanto que as enzimas produzidas nos meios de cultivo com farelo de trigo e casca de soja apresentaram temperatura ótima de 37°C. Na temperatura de 50°C a enzima produzida no meio de cultivo com torta de pinhão manso ainda apresentava 50% de sua atividade cutinolítica, enquanto que as demais enzimas apresentavam menos de 20% de suas atividades.

Os demais picos encontrados na enzima de torta de pinhão manso podem indicar a presença de isoformas da cutinase ou outras enzimas presentes no extrato bruto que também hidrolisam o *p*-NPB.

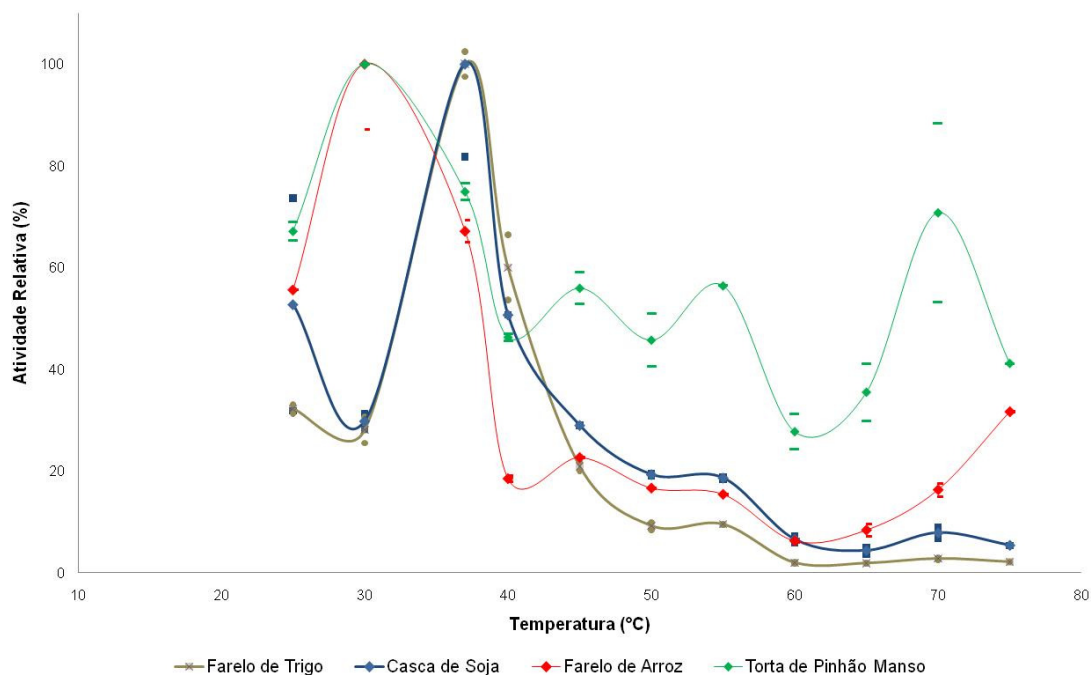


Figura 1: Efeito da temperatura na atividade das cutinases brutas produzidas por *Fusarium oxysporum* em diferentes meios de cultivo por FES.

Os valores de temperatura ótima encontrados para as quatro enzimas estão na faixa de 30 a 37°C e são coerentes com os valores da literatura. Segundo Bornscheuer *et al.* (2002) lipases e esterases apresentam temperatura ótima de atividade na faixa de 30 a 40°C.

Chen *et al.* (2008) compararam a temperatura ótima e o tipo de substrato, *p*-NPB e trioleína, de duas cutinases bacterianas e uma fúngica produzidas por fermentação líquida. As cutinases bacterianas apresentaram temperatura ótima de 60°C para ambos os substratos avaliados, enquanto a cutinase fúngica apresentou temperatura ótima de 30°C para o substrato trioleína e 40°C para o *p*-NPB.

Ertunga *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente duas espécies de cogumelos comestíveis, *Amanita vaginata* var. *vaginata* e *Tricholoma terreum* em relação à atividade estereolítica. Ambas as enzimas produzidas apresentaram temperatura ótima de atividade de 30 °C.

Kwon *et al.* (2009) caracterizaram 2 cutinases recombinantes de *Fusarium solani* expressas em *Pichia pastoris*. A temperatura ótima de ação de ambas as enzimas ficou na faixa de 35 a 45 °C.

Wolski *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente extratos enzimáticos de lipases produzidas por *Penicillium* sp., utilizando FES e FS. A caracterização dos extratos enzimáticos brutos obtidos mostrou uma atividade ótima de 15,17 U/mL na temperatura de 47 °C para a enzima produzida por FES e 11,28 U/mL na temperatura de 37 °C para a enzima produzida por FS.

6.3.2. Efeito da temperatura na estabilidade das cutinases brutas

O efeito da temperatura na estabilidade das cutinases brutas foi determinado como descrito no item 5.2.6.2. De acordo com a Figura 2 foi possível observar que as cutinases produzidas nos meios de cultivo com farelo de trigo e farelo de arroz apresentaram estabilidade na temperatura de 30 °C. Nas temperaturas de 25 °C e 40 °C estas enzimas apresentaram redução bastante significativa de suas atividades que foi ainda maior com o aumento da temperatura. A enzima produzida no meio com casca de soja apresentou estabilidade na faixa de 30 a 40 °C, sendo mais estável na temperatura de 40 °C após 1 hora. Na temperatura de 50 °C a enzima apresentava 30% de sua atividade. A enzima produzida utilizando-se o meio com torta de pinhão manso apresentou maior estabilidade térmica quando comparada com as demais enzimas, mantendo a atividade elevada (superior a 60%) na faixa de 30 a 50 °C após 1 hora, com maior atividade na temperatura de 40 °C. A enzima ainda manteve 55% de sua atividade na temperatura de 60 °C.

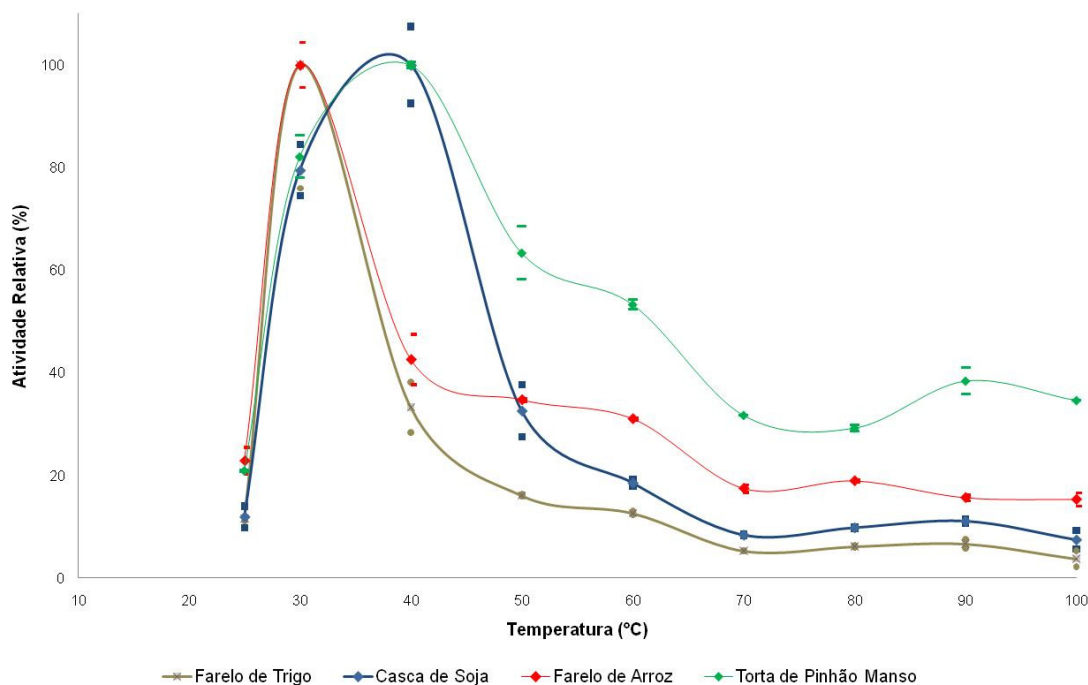


Figura 2: Efeito da temperatura na estabilidade das cutinases brutas produzidas por *Fusarium oxysporum* em diferentes meios de cultivo por FES.

As quatro enzimas apresentam comportamento semelhante em relação à temperatura de estabilidade, sendo todas relativamente estáveis na temperatura de 30°C. A enzima produzida no meio com torta de pinhão manso apresentou-se relativamente mais estável em temperaturas mais elevadas.

Comparando os resultados de temperatura ótima com os de estabilidade, é possível observar que a temperatura ótima das enzimas, de uma maneira geral, coincide com a faixa de estabilidade das mesmas.

Pio e Macedo (2007) caracterizaram bioquimicamente a cutinase bruta de *Fusarium oxysporum* produzidas por fermentação líquida em relação à temperatura de estabilidade. A enzima permaneceu estável na faixa de temperatura de 30 a 50°C após 1 hora, sendo mais estável a 30°C e com 80% de sua atividade na temperatura de 50°C.

Petersen *et al.* (2001) estudaram a estabilidade térmica da cutinase de *Fusarium solani pisi* em função do pH. A faixa de maior estabilidade térmica ocorreu entre 40 e 60°C. A maior atividade enzimática ocorreu em pH 8,5 e 57°C.

Chen *et al.* (2008) compararam a temperatura de estabilidade de duas cutinases de *Thermobifida fusca* e uma cutinase de *Fusarium solani pisi* produzidas por fermentação líquida. A estabilidade térmica das cutinases foi avaliada nas temperaturas de 40 e 60°C. As cutinases bacterianas exibiram maior estabilidade, com 80% de atividade após 160 horas de reação a 40°C ou 50% de atividade após 40 horas a 60°C. A cutinase fúngica foi significativamente menos estável, com atividades residuais de 50% após 85 horas a 40°C ou após 5 minutos a 60°C.

Wolski *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente extratos enzimáticos de lipases produzidas por *Penicillium* sp utilizando FES e FS. O extrato enzimático bruto obtido por FES apresentou maior estabilidade na temperatura de 25°C e o extrato enzimático bruto obtido por FS apresentou maior estabilidade na faixa temperatura de 25 a 35°C.

6.3.3. Efeito do pH na atividade das cutinases brutas

O efeito do pH na atividade das cutinases brutas foi determinado como descrito no item 5.2.6.3. De acordo com a Figura 3 foi possível verificar que a enzima produzida no meio de cultivo com farelo de trigo apresentou pH ótimo igual a 8,0, com atividade elevada (acima de 70%) na faixa de pH de 7,0 à 8,5. As enzimas produzidas em casca de soja e farelo de arroz, também apresentaram pH ótimo igual a 8,0. A enzima produzida no meio de cultivo em torta de pinhão manso apresentou pH ótimo igual a 9,0; no pH de 8,5 a enzima apresentou atividade menor que 60%.

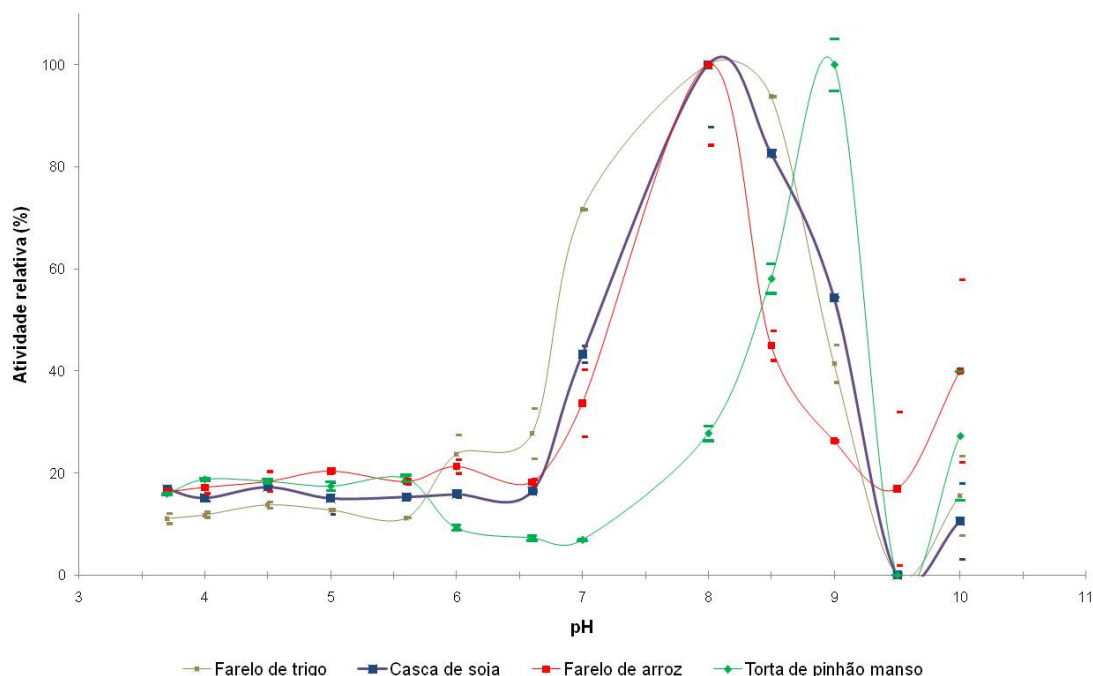


Figura 3: Efeito do pH na atividade das cutinases brutas produzidas por *Fusarium oxysporum* em diferentes meios de cultivo por FES.

As quatro enzimas apresentaram valores de pH ótimo levemente alcalino, que são similares aos valores encontrados na literatura. Das enzimas avaliadas a produzida em meio com torta de pinhão manso foi a que apresentou pH ótimo mais alcalino (9,0). Não se recomenda medir a atividade enzimática em valores de pH mais alcalinos pelo método espectrofotométrico, uma vez que hidrólise não enzimática do substrato pode ocorrer muito rapidamente (Kolattukudy, 1985).

Segundo Kolattukudy (1985) a maioria das cutinases fúngicas e bacterianas apresenta pH ótimo alcalino (pH=9,0). Destas, as cutinases bacterianas geralmente são mais resistentes a valores de pH mais elevados.

Ertunga *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente duas espécies de cogumelos comestíveis, *Amanita vaginata* var. *vaginata* e *Tricholoma terreum* em relação à atividade estereolítica. O pH ótimo de ação de ambas as enzimas foi igual a 8,0 na temperatura de 30 °C.

Chen *et al.* (2008) compararam o pH ótimo e o tipo de substrato (*p*-NPB ou trioleína) de duas cutinases de *Thermobifida fusca* e uma de *Fusarium solani pisi*

produzidas por fermentação líquida. O pH ótimo das três enzimas foi de aproximadamente 8,0 nos dois substratos testados.

Trail e Koller (1993) purificaram e caracterizaram duas cutinases de *Alternaria brassicola*. As duas cutinases apresentaram pH ótimo de 6,5 e 8,5, respectivamente.

Wolski *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente extratos enzimáticos de lipases produzidas por *Penicillium* sp., utilizando FES e FS. A caracterização dos extratos brutos obtidos mostrou pH ótima de 5,5 para a enzima produzida por FES e pH ótimo de 7,0 para a enzima produzida por FS.

6.3.4. Efeito do pH na estabilidade das cutinases brutas

O efeito do pH na estabilidade das cutinases brutas foi determinado como descrito no item 5.2.6.4. De acordo com a Figura 4, a enzima produzida no meio de cultivo com farelo de arroz apresentou estabilidade na faixa de pH de 4,5 a 7,0, mantendo mais de 60% de atividade, porém a maior estabilidade foi alcançada na faixa de 6,0 a 7,0. A enzima produzida no meio de cultivo com casca de soja apresentou estabilidade superior a 60% na faixa de pH de 5,0 a 8,5, porém a maior estabilidade foi no pH 6,0. A enzima produzida no meio de cultivo com torta de pinhão manso apresentou estabilidade na faixa de pH que variou de 6,0 a 7,0. A enzima menos estável em função do pH foi a produzida em meio de cultivo contendo farelo de trigo, apresentando estabilidade ao redor do pH 6,0.

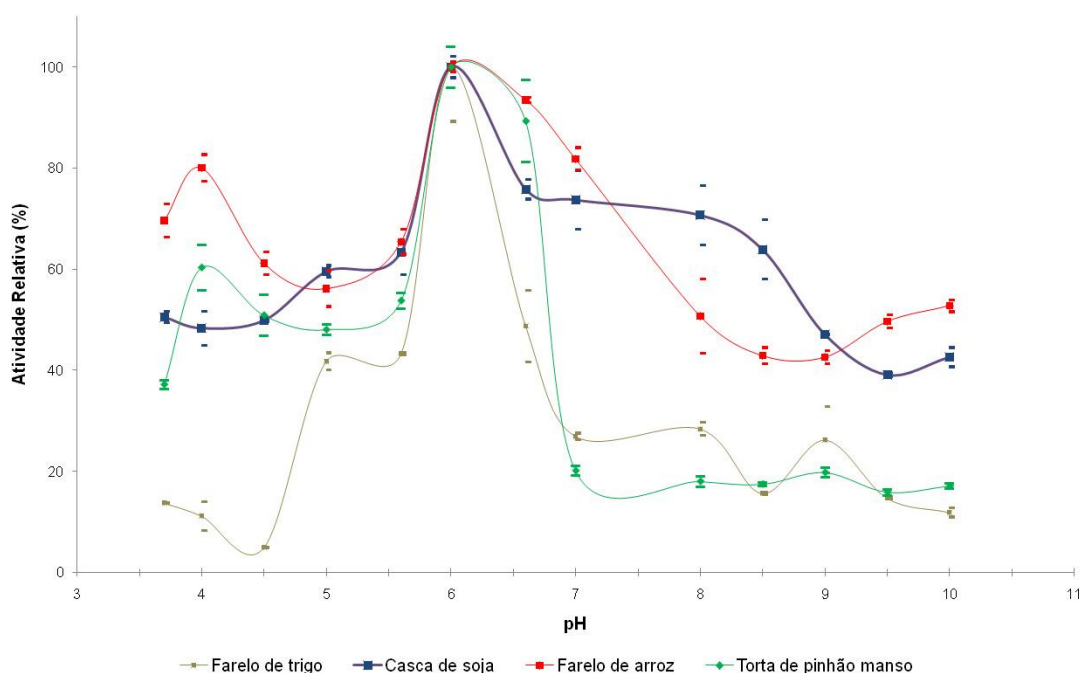


Figura 4: Efeito do pH na estabilidade das cutinases brutas produzidas por *Fusarium oxysporum* em diferentes meios de cultivo por FES.

As quatro enzimas apresentaram maior estabilidade no valor de pH 6,0. As enzimas produzidas em farelo de arroz e casca de soja apresentaram-se mais estáveis que as demais enzimas em valores de pH mais alcalinos.

As enzimas produzidas nos meios de cultivo com casca de soja e farelo de arroz permaneceram relativamente estáveis no pH ótimo destas enzimas, já as enzimas produzidas nos meios com farelo de trigo e torta de pinhão manso não apresentam boa estabilidade no pH ótimo destas enzimas.

Pio e Macedo (2007) caracterizaram bioquimicamente a cutinase bruta de *Fusarium oxysporum* produzida por fermentação líquida, em relação ao pH de estabilidade. A enzima permaneceu estável na faixa de pH entre 5,0 e 6,5 e a maior atividade foi obtida no pH 6,0.

Ertunga *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente duas espécies de cogumelos comestíveis, *Amanita vaginata* var. *vaginata* e *Tricholoma terreum* em

relação à atividade estereolítica. Ambas as enzimas apresentaram pH de estabilidade na faixa de 3,0 e 10,0.

Petersen *et al.* (2001) estudaram a estabilidade térmica da cutinase de *Fusarium solani pisi* em função do pH. Neste estudo, a estabilidade máxima da enzima ocorreu na faixa de pH entre 6,0 e 8,5; decaindo rapidamente nos valores de pH mais ácido e básico. Os autores ressaltaram que a estabilidade máxima é obtida na faixa que inclui o pl da enzima, o qual situa-se em 7,8.

Wolski *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente extratos enzimáticos de lipases produzidas por *Penicillium* sp., utilizando FES e FS. O extrato bruto obtido por FES apresentou maior estabilidade no pH 7,0 enquanto que o extrato enzimático bruto obtido por FS apresentou maior estabilidade na faixa de pH de 4,9 a 8,5.

6.3.5. Efeito da concentração do substrato na atividade das cutinases brutas

O efeito de diferentes concentrações de substrato na atividade cutinolítica de cada enzima foi determinado como descrito no item 5.2.6.5. A análise dos gráficos, concentração do substrato em função da velocidade da reação e posterior linearização dos valores utilizando a metodologia de Lineweaver-Burk possibilitaram os cálculos de $v_{\text{máx}}$ e k_m para cada enzima. Os gráficos de Lineweaver-Burk das enzimas produzidas nos meios com farelo de trigo, casca de soja, farelo de arroz e torta de pinhão manso estão nas Figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente. Os valores de $v_{\text{máx}}$ e k_m se encontram na Tabela 4.

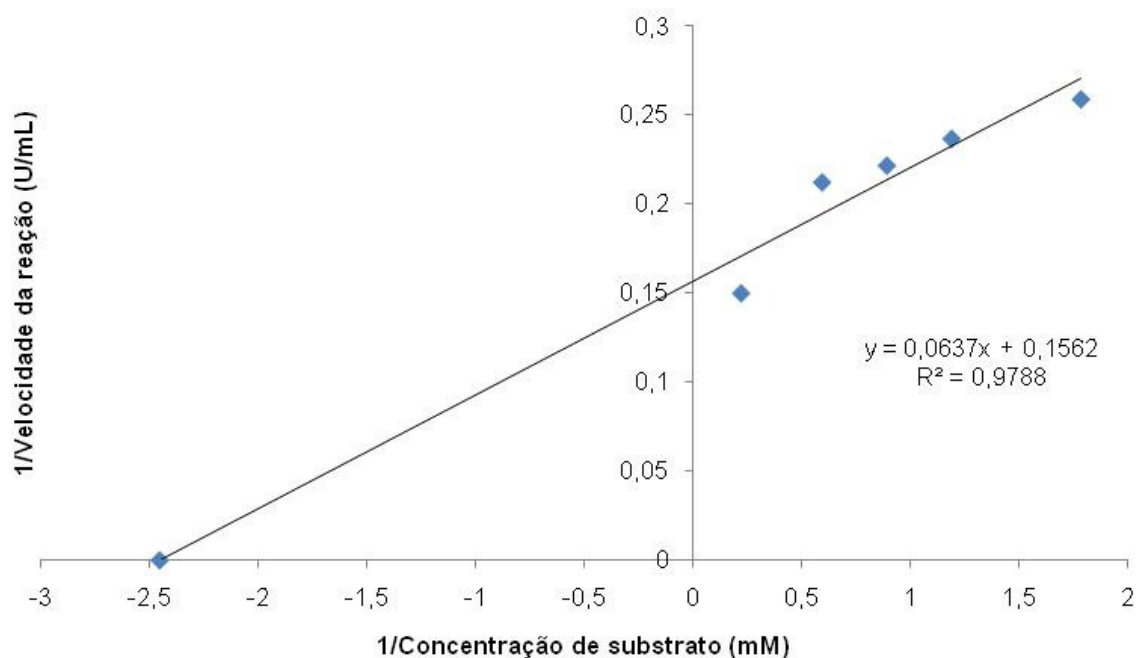


Figura 5: Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da cutinase produzida em farelo de trigo.

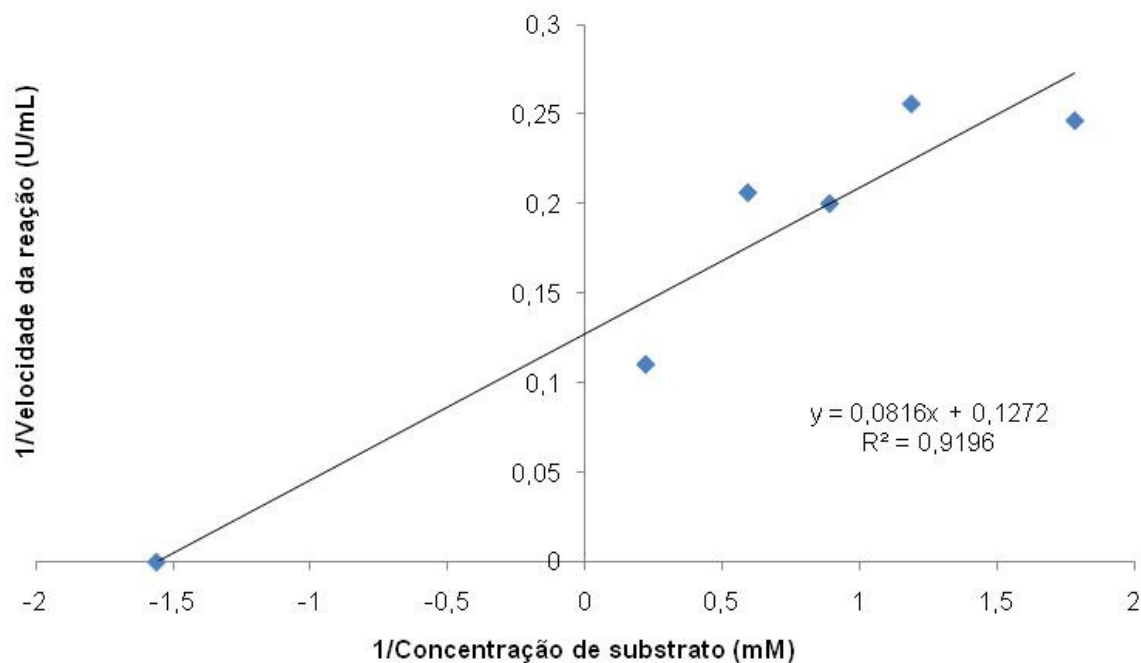


Figura 6: Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da cutinase produzida em casca de soja.

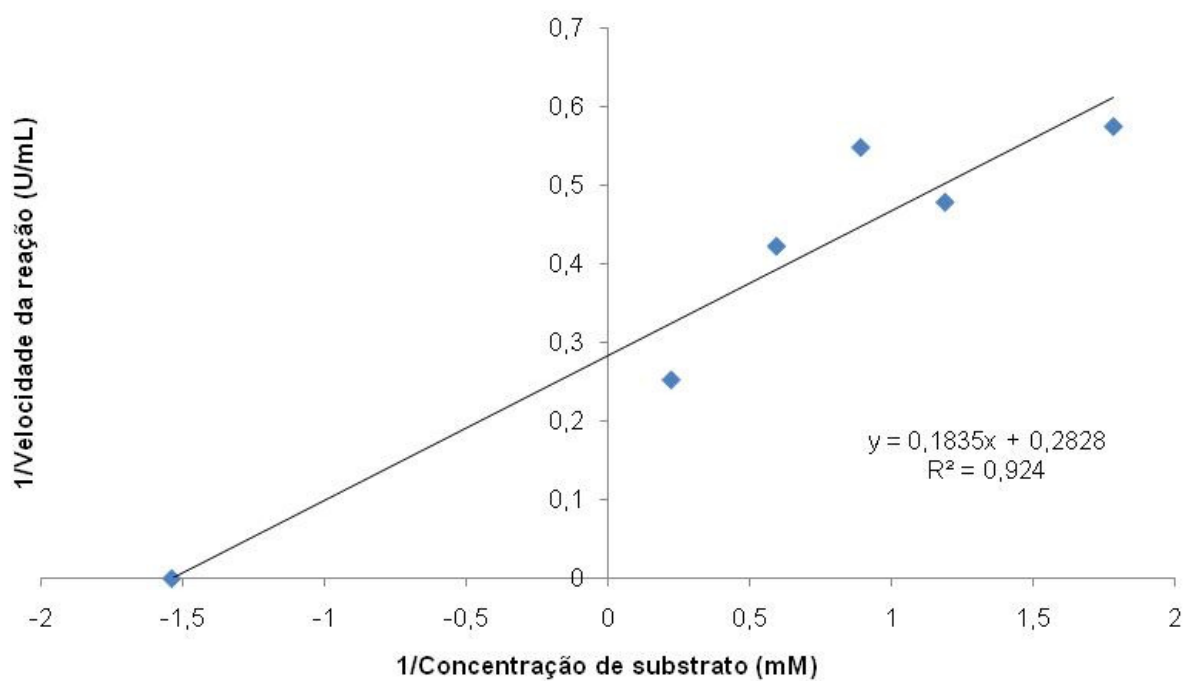


Figura 7: Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da cutinase produzida em farelo de arroz.

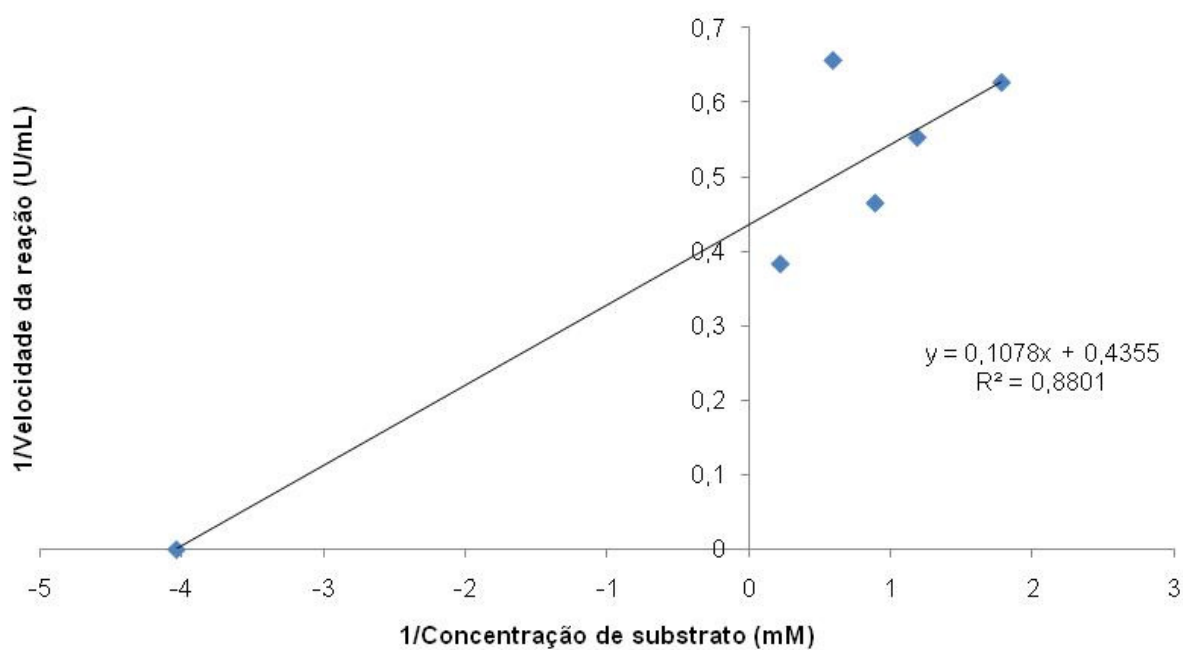


Figura 8: Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da cutinase produzida em torta de pinhão manso.

Tabela 4: Valores de v_{\max} e k_m para as cutinases brutas de *Fusarium oxysporum* produzida em diferentes meios de cultivo

Substrato para produção das cutinases	v_{\max} (U/mL)	k_m (mM)
Farelo de trigo	6,40 ^b	0,41 ^{ab}
Casca de soja	7,86 ^a	0,64 ^b
Farelo de arroz	3,53 ^c	0,65 ^b
Torta de pinhão manso	2,30 ^c	0,25 ^a

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que as amostras não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância.

O valor de v_{\max} indica a situação na qual a cutinase está toda na forma do complexo Enzima/Substrato (ES), indicando a saturação da enzima pelo substrato. Quanto maior o seu valor, maior a velocidade da reação. Os resultados demonstraram que a enzima produzida no meio com casca de soja apresentou velocidade de reação estatisticamente superior às demais enzimas, a enzima produzida em farelo de trigo apresentou velocidade de reação estatisticamente superior às enzimas produzidas em farelo de arroz e torta de pinhão manso ($p \leq 0,05$).

A constante de Michaelis-Menten (k_m) corresponde à concentração de substrato na qual a velocidade da reação enzimática é metade da velocidade máxima (v_{\max}) e quanto menor o valor de k_m maior a afinidade da enzima pelo seu substrato. Na Tabela 4 foi possível observar que as enzimas produzidas em farelo de trigo e torta de pinhão manso apresentaram os menores valores de k_m , com destaque para a enzima de torta de pinhão manso que apresentou valor de k_m estatisticamente inferior às enzimas de casca de soja e farelo de arroz ($p \leq 0,05$). Estes resultados mostram claramente que as características da enzima diferem em função do meio de produção.

Chen *et al.* (2010) investigaram e compararam as propriedades bioquímicas de duas cutinases de *Thermobifida fusca* e uma cutinase de *Fusarium solani pisi*

recombinante. Os resultados de k_m encontrados mostraram que a cutinase fúngica apresentou maior afinidade pelo substrato *p*-NPB ($k_m = 0,27\text{mM}$). As cutinases bacterianas apresentaram valores de k_m de 0,67 mM e 0,50 mM.

Trail e Koller (1993) purificaram e caracterizaram duas cutinases de *Alternaria brassicola*. A influência do tamanho da cadeia de ésteres de *p*-nitrofenil em relação à hidrólise foi avaliada. Os valores de v_{\max} para ambas as enzimas, decresceu com o aumento do tamanho da cadeia que variou de C_4 a C_{16} . Em relação aos valores de k_m , o tamanho da cadeia apresentou pouca influência em relação à atividade de ambas as enzimas. Para cada uma das enzimas os valores de V_{\max} e K_m em relação ao substrato *p*-NPB foram 16,9 $\mu\text{kat/mg}$ e 0,34 mM e 31,3 $\mu\text{kat/mg}$ e 0,28 mM, respectivamente.

6.3.6. Efeito da adição de diferentes sais minerais em diferentes concentrações na atividade das cutinases brutas

O efeito da adição de sais minerais na atividade das cutinases brutas foi determinado como descrito no item 5.2.6.6. Comparando-se os resultados de atividade cutinolítica para cada enzima em relação ao controle sem adição de sais minerais, foi possível verificar de maneira geral que as enzimas produzidas nos meios de cultivo com farelo de trigo, casca de soja e farelo de arroz foram inibidas ou levemente ativadas pela presença de sais minerais, embora a enzima produzida em farelo de trigo tenha sido significativamente ativada pela presença dos sais minerais ZnSO_4 e CoCl_2 na concentração de 1 mM ($p \leq 0,05$). O único sal que causou inibição total destas enzimas foi o HgCl_2 na concentração de 10 mM. A enzima produzida no meio de cultivo com torta de pinhão manso apresentou comportamento oposto às demais enzimas, sendo ativado pela maioria dos sais minerais. Destes, os que aumentaram significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade da enzima em relação ao controle foram os sais minerais MnSO_4 , CaCl_2 , ZnSO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 , CoCl_2 e KCl na concentração de 1mM e o sal FeSO_4 na concentração de 10mM. Esta enzima, assim como as demais, foi bastante inativada na presença de HgCl_2 em ambas as concentrações testadas (Tabelas 5

e 6).

A inativação das enzimas na presença de HgCl_2 indicam que os grupos -SH são essenciais para a atividade das enzimas (KADEMI, 2000). Os íons de mercúrio formam complexos fortes com os grupos -SH das enzimas, inativando-as.

O comportamento distinto, em relação à necessidade de sais minerais da enzima produzida em torta de pinho manso, pode ser atribuído às mudanças na estrutura protéica desta enzima ou devido ao próprio meio de cultivo, que pode ser deficiente nestes sais minerais.

Tabela 5: Efeito da adição de 1mM de diferentes sais minerais na atividade das cutinases brutas produzidas por *Fusarium oxysporum* em diferentes meios de cultivo.

Sais minerais [1mM]/Substrato	Atividade cutinolítica relativa (%)			
	Farelo de trigo	Casca de soja	Farelo de arroz	Torta de pinhão manso
Controle	100,00^{CD}	100,00^{AB}	100,00^A	100,00^{CD}
MnCl ₂	76,00 ^{DE}	86,16 ^{ABC}	65,27 ^{CD}	175,04^{AB}
CaCl ₂	24,39 ^F	32,74 ^{DE}	30,26 ^F	163,85^{AB}
NaHSO ₃	33,57 ^F	27,06 ^{DE}	34,45 ^{EF}	134,46 ^{BC}
NaNO ₃	28,99 ^F	22,56 ^{DE}	13,76 ^F	64,49 ^{DE}
ZnSO ₄	178,96^B	94,43 ^{AB}	77,21 ^{ABCD}	186,38^A
MgSO ₄	37,94 ^{EF}	41,72 ^{DE}	56,25 ^{DE}	126,15 ^{BC}
FeSO ₄	30,66 ^F	64,38 ^{BCD}	59,44 ^D	165,44^{AB}
Na ₂ SO ₄	20,95 ^F	42,88 ^{CDE}	25,16 ^F	108,15 ^{CD}
K ₂ HPO ₄	13,38 ^F	19,94 ^E	15,80 ^F	90,81 ^{CD}
K ₂ SO ₄	12,55 ^F	24,38 ^{DE}	17,64 ^F	96,21 ^{CD}
MnSO ₄	133,24 ^C	114,71 ^A	87,88 ^{ABC}	202,71^A
CoCl ₂	246,24^A	99,26 ^{AB}	92,23 ^{AB}	208,00^A
KCl	102,76 ^C	111,05 ^A	73,63 ^{BCD}	175,93^{AB}
HgCl ₂	7,05 ^F	12,00 ^E	15,00 ^F	24,63 ^E

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que as amostras não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância.

Tabela 6: Efeito da adição de 10 mM de diferentes sais minerais na atividade das cutinases brutas produzidas por *Fusarium oxysporum* em diferentes meios de cultivo

Sais minerais [10mM]/Substrato	Atividade cutinolítica relativa (%)			
	Farelo de trigo	Casca de soja	Farelo de arroz	Torta de pinhão manso
Controle	100,00^{AB}	100,00^A	100,00^A	100,00^{BCD}
MnCl ₂	69,87 ^{BCD}	97,29 ^A	74,87 ^{AB}	87,70 ^{BCD}
CaCl ₂	65,49 ^{BCD}	57,82 ^{ABCD}	61,52 ^{BC}	197,08 ^{AB}
NaHSO ₃	44,83 ^{BCDE}	26,95 ^{DE}	36,26 ^{CDE}	190,09 ^{AB}
NaNO ₃	11,12 ^{DE}	13,95 ^{DE}	12,99 ^{EF}	56,62 ^{CD}
ZnSO ₄	82,55 ^{BC}	79,87 ^{ABC}	62,61 ^{BC}	131,12 ^{ABCD}
MgSO ₄	50,47 ^{BCDE}	34,79 ^{CDE}	18,38 ^{DEF}	110,06 ^{ABCD}
FeSO ₄	33,79 ^{CDE}	37,11 ^{BCDE}	40,82 ^{CD}	226,90^A
Na ₂ SO ₄	14,11 ^{DE}	19,70 ^{DE}	17,75 ^{DEF}	93,29 ^{BCD}
K ₂ HPO ₄	24,43 ^{CDE}	33,20 ^{CDE}	22,83 ^{DEF}	89,66 ^{BCD}
K ₂ SO ₄	79,65 ^{BC}	47,15 ^{BCDE}	27,26 ^{DEF}	142,51 ^{ABCD}
MnSO ₄	156,80 ^A	101,25 ^A	83,98 ^{AB}	161,90 ^{ABC}
CoCl ₂	55,92 ^{BCDE}	42,73 ^{BCDE}	40,31 ^{CDE}	96,28 ^{BCD}
KCl	72,32 ^{BCD}	85,68 ^{AB}	68,70 ^B	164,64 ^{ABC}
HgCl ₂	ND ^E	ND ^E	ND ^F	39,56 ^D

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que as amostras não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância.

Pio e Macedo (2007) avaliaram a atividade da cutinase bruta de *Fusarium oxysporum* produzida em meio líquido com adição de sais minerais nas concentrações de 1 mM e 10 mM. A maior parte dos sais minerais testados na concentração de 1 mM apresentou efeito indutor na atividade da enzima, dos

quais se destacaram: CaCl_2 , FeSO_4 , MnSO_4 , CoCl_2 , K_2SO_4 e Na_2SO_4 . O único sal que inibiu a enzima na concentração de 1 mM foi o HgCl_2 . Na concentração de 10 mM, embora a indução da enzima pelos sais tenha sido menor, a maior parte deles também apresentou efeito positivo na sua atividade. Dentre os compostos que aumentaram a atividade enzimática destacam-se o K_2HPO_4 , CaCl_2 e NaNO_3 . Os sais minerais que causaram maior inibição da enzima nesta concentração foram: HgCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 e ZnSO_4 .

Chen *et al.* (2010) compararam duas cutinases de *Thermobifida fusca* e uma de *Fusarium solani pisi* recombinante. As enzimas foram produzidas em meios de cultivo suplementados com cutina de maçã. Para avaliar o efeito de diferentes íons metálicos na atividade das enzimas, as mesmas foram incubadas com cada um destes íons por 5 minutos, após este período a atividade esteárica foi determinada através da hidrólise do *p*-NPB. Os resultados demonstram que quando as enzimas foram incubadas com 1 mM dos íons metais divalentes, Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} ou Ca^{2+} , os mesmos não interferiram na atividade das enzimas, enquanto que os íons, Zn^{2+} , Fe^{2+} e Pb^{2+} , apresentaram efeito inibidor relativo na atividade das enzimas, especialmente as enzimas bacterianas. O íon Cr^{2+} inibiu quase que completamente as enzimas bacterianas, enquanto o íon Hg^{2+} inibiu completamente as três cutinases.

Ertunga *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente duas espécies de cogumelos comestíveis, *Amanita vaginata* var. *vaginata* e *Tricholoma terreum* em relação à atividade estereolítica. A atividade enzimática foi inibida na presença dos íons metálicos Na^+ , Li^+ , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} e Cd^{2+} para *A. vaginata* var. *vaginata* e Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} e Al^{3+} para *T. terreum*. Todas as inibições ocorreram em diferentes graus e nenhum íon causou inibição total das enzimas.

Faiz *et al.* (2007) caracterizaram bioquimicamente a cepa da bactéria termófila *Anoxybacillus gonensis* A4 em relação a atividade estereolítica. O efeito de vários íons metálicos na concentração de 1 mM na atividade da enzima foi testado. Foram testados íons monovalentes Na^+ , K^+ , divalentes Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} ,

Mn^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} e trivalente Cr^{3+} . Os resultados obtidos mostram que o único íon que ativou a enzima foi o K^{+} , enquanto os íons divalentes e trivalentes inibiram em diferentes razões a atividade da enzima, entretanto nenhum deles inibiu completamente a enzima.

6.3.7. Reações de hidrólise em substratos sintéticos

O efeito da adição de diferentes substratos com diferentes tamanhos de cadeia de ácido graxo na atividade enzimática foi determinado como descrito no item 5.2.6.7. Os resultados demonstraram que as enzimas produzidas nos meios de cultivo com farelo de trigo, casca de soja e torta de pinhão manso apresentaram maior especificidade para ácidos graxos de cadeia média (C_8), mas também apresentaram atividade elevada em ácidos graxos de cadeia curta (C_4). A enzima produzida no meio de cultivo com farelo de arroz apresentou maior especificidade para ácidos graxos de cadeia curta e boa atividade também em ácidos graxos de cadeia média. As quatro enzimas apresentaram baixa atividade cutinolítica nos ácidos graxos de cadeias maiores como o *p*-NPL, com 12 carbonos e o *p*-NPP com 16 carbonos. Pode-se verificar que as cutinase fúngicas apresentaram especificidade tanto para ácidos graxos de cadeia curta como para os ácidos graxos de cadeia média e que as enzimas produzidas pelos quatro meios de cultivo apresentaram perfil de especificidade semelhante, com magnitude de valores diferentes (Figura 9).

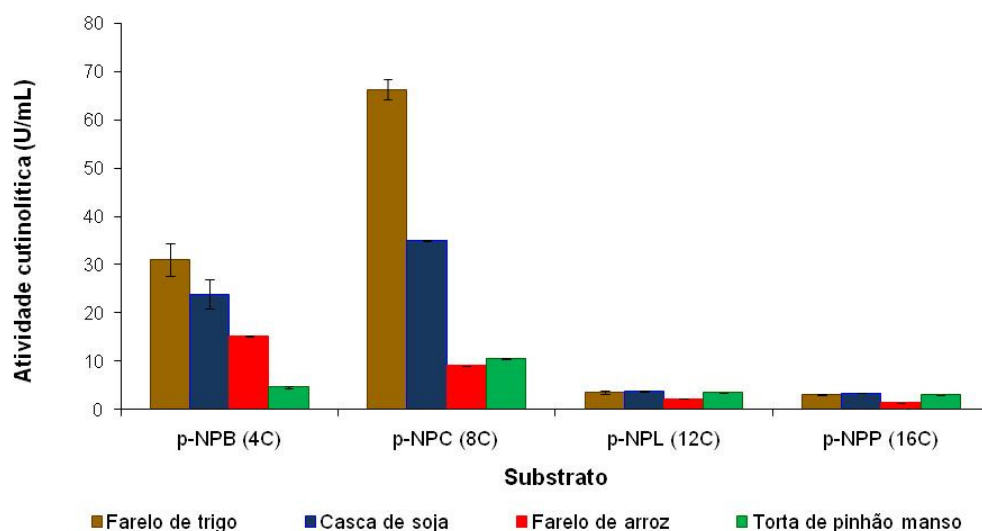


Figura 9: Reação de hidrólise da cutinase em diferentes substratos

Chen *et al.* (2010) compararam duas cutinases de *Thermobifida fusca*, e uma de *Fusarium solani pisi* recombinante em relação à especificidade por ésteres sintéticos com diferentes tamanhos de cadeia. Nas três enzimas a atividade cutinolítica foi significativamente maior no ácido graxo com 4 carbonos (*p*-NPB), quando comparado com o de 16 carbonos (*p*-NPP). Da mesma forma, a atividade das enzimas no triglicerídeo tributirina com 4 carbonos foi superior a trioleína com 18 carbonos. Foi possível concluir que as três enzimas apresentam preferência por ésteres de cadeia curta e que a cutinase fúngica foi a que apresentou maior atividade cutinolítica em todos os substratos avaliados.

Kwon *et al.* (2009) caracterizaram duas cutinases recombinantes de *Fusarium solani* purificadas. Ambas as enzimas apresentam preferência por cadeias curtas de triglicerídeos. O substrato tributirina com 4 carbonos foi o de maior especificidade pelas enzimas, seguido pelo substrato tricaprilina com 8 carbonos. O triglicerídeo no qual as enzimas apresentaram menor especificidade foi a trioleína com 18 carbonos, no qual as enzimas apresentaram redução da atividade de 90% comparados com a tributirina.

Rubio *et al.* (2008) isolaram e caracterizaram o gene ThCut1 expresso em *Pichia pastoris*, que mostrou similaridade com os genes das cutinases fúngicas do fungo *Trichoderma harzianum*. Foram testados os substratos *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA), *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB), *p*-nitrofenil valerato (*p*-NPV) e *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP). A enzima apresentou maior atividade total e específica para o *p*-NPA ($7,1 \pm 0,13 \mu\text{mol}/\text{min}$ e $2,84 \pm 0,13 \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteínas respectivamente), e os valores de atividade cutinolítica decresceram de acordo com o aumento do tamanho da cadeia.

6.3.8. Efeito de solventes orgânicos na estabilidade das cutinases brutas

O efeito da adição de solventes orgânicos na estabilidade das enzimas foi realizado como descrito no item 5.2.6.8. A polaridade do solvente orgânico é um fator de fundamental importância no comportamento das enzimas. Moléculas do solvente podem interagir com a enzima e influenciar seu estado de hidratação. O valor de log P do solvente é um parâmetro amplamente usado para descrever a polaridade dos solventes e seus possíveis efeitos na atividade enzimática, onde P é o coeficiente de partição de um composto no sistema bifásico octanol-água. Na Tabela 7 é apresentado o log de P dos solventes utilizados.

Tabela 7: Hidrofobicidade dos solventes orgânicos (log P) (FABER, 2004)

Solvente orgânico	Log P
Metanol	-0,76
Etanol	-0,24
Acetona	-0,23
Propanol	0,074
Butanol	0,80
Octanol	2,90
Hexano	3,50

Os valores de atividade cutinólítica das enzimas expostas aos solventes orgânicos estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Efeito dos solventes orgânicos na atividade das cutinases brutas

Solvente Orgânico/ Substrato	Atividade cutinólítica relativa (%)			
	Farelo de trigo	Casca de soja	Farelo de arroz	T. pinhão manso
Controle	100	100	100	100
Metanol	47,78	33,33	21,92	98,86
Etanol	35,08	23,27	16,56	78,20
Acetona	23,23	25,79	22,73	98,87
Propanol	28,42	23,14	16,92	102,15
Butanol	16,64	40,50	18,88	110,66
Hexano	43,24	70,94	65,75	158,24
Octanol	16,49	22,86	21,07	94,38

As enzimas produzidas nos meios de cultivo com farelo de trigo, casca de soja e farelo de arroz apresentaram-se pouco estáveis em solventes orgânicos.

Dos solventes orgânicos testados, as enzimas de casca de soja e farelo de arroz mostraram-se relativamente mais estável na presença do hexano, mantendo 71% e 66% respectivamente, de suas atividades comparadas com o controle. Já a enzima produzida no meio de cultivo com torta de pinhão manso mostrou-se bastante estável na presença de solventes orgânicos, sua atividade manteve-se alta em todos os solventes orgânicos avaliados, destacando-se o hexano, butanol e propanol. Os resultados obtidos sugerem que esta enzima é estável na presença de solventes orgânicos, sendo esta uma propriedade bastante interessante para aplicações industriais. O uso de solventes orgânicos em reações de biocatálise oferece algumas vantagens, como o aumento da solubilidade de substratos orgânicos insolúveis em água e capacidade de deslocar o equilíbrio termodinâmico de muitos processos para o caminho de síntese (KLIBANOV, 1997). Como exemplo pode-se citar as reações de esterificação e transesterificação para a produção de aromas (BARROS, *et al.*, 2010; HORII *et al.*, 2010), produção de biodiesel (BADENES, LEMOS e CABRAL, 2010) e na separação de enantiômeros (FRAGA, CARVALHO E MACEDO, 2009).

Chen *et al.* (2010) investigaram e compararam a estabilidade em solventes orgânicos de duas cutinases de *Thermobifida fusca* e uma de *Fusarium solani pisi* recombinante. Os resultados mostram que as cutinases bacterianas apresentaram boa estabilidade nos solventes orgânicos, etanol, acetona, n-hexano e dimetilsulfóxido com valores de atividade relativa próximos do controle. Já a cutinase fúngica apresentou pouca estabilidade nos solventes orgânicos avaliados, o maior valor obtido foi com o hexano, que embora tenha reduzido a atividade da enzima, ainda manteve 70% de sua atividade comparada com o padrão.

Pio e Macedo (2007) caracterizaram bioquimicamente uma cutinase bruta de *Fusarium oxysporum* produzida por fermentação líquida em relação ao efeito dos solventes orgânicos na estabilidade da enzima. Os melhores resultados foram obtidos na presença de n-hexano, isooctano, octanol, nonanol e decano. Todos estes solventes apresentam log P próximo a 4, isto é, são solventes bastante

apolares, proporcionando aumento na atividade da enzima de pelo menos 50%, comparada com a enzima sem a presença de solvente.

6.3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese ds cutinases brutas foi feita como descrito no item 5.2.6.9. Neste trabalho, a eletroforese por SDS-PAGE foi realizada com o objetivo de se comparar as frações de proteínas presentes em cada uma das cutinases brutas. Foi possível observar duas bandas protéicas em todos as cutinases brutas avaliados, com massas moleculares de aproximadamente 27-30 kDa e 42 kDa. A enzima produzida em torta de pinhão manso apresentou maior quantidade de frações protéicas, incluindo uma banda de aproximadamente 36 kDa. A enzima produzida em farelo de arroz, por apresentar quantidade muito elevada de amido, não foi possível ser avaliada por esta técnica (Figuras 10 e 11).

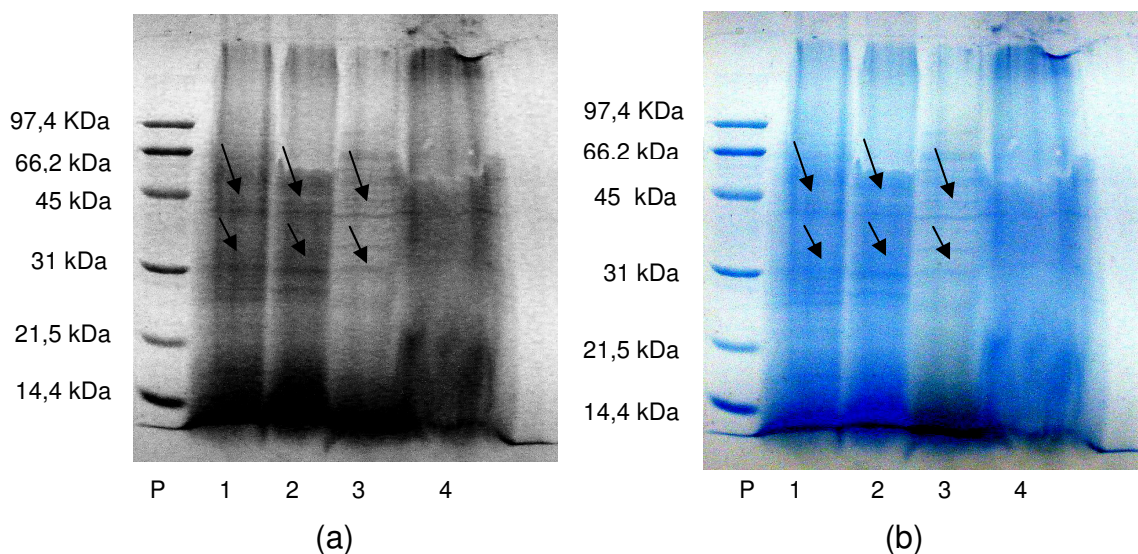


Figura 10 (a e b): Eletroforese SDS-PAGE em gel 12% das cutinases brutas

(P) padrão de baixa massa molecular, (1) enzima obtida do meio com farelo de trigo, (2) enzima obtida do meio com casca de soja, (3) enzima obtida do meio com torta de pinhão manso e (4) enzima obtida do meio com farelo de arroz

De acordo com os dados da literatura, foi possível concluir que a primeira banda observada (27-30 kDa) provavelmente se refere às cutinases, enquanto que as demais bandas são outras enzimas e proteínas presentes nos extratos brutos. Estes resultados indicam que de uma maneira geral, as cutinases brutas mesmo sendo produzidas em diferentes meios de cultivo, apresentam suas frações protéicas semelhantes.

As cutinases fúngicas apresentam massa molecular próximas de 25 KDa. A composição de aminoácidos das enzimas produzidas a partir de fungos parece ser muito similar. Algumas cutinases fúngicas apresentam na composição de aminoácidos um único grupo triptofano, um grupo metionina, um ou dois grupos histidinas e duas ou quatro grupos cisteínas, que estão envolvidos nas ligações disulfídicas (Kolattukudy, 1985).

Chen *et al.* (2010) investigaram as subunidades das massas moleculares de duas cutinases purificadas de *Thermobifida fusca* por SDS-PAGE. As cutinases apresentaram massas moleculares de 29 kDa. A massa molecular nativa de ambas as enzimas também foi determinada por cromatografia de filtração em gel e as mesmas apresentaram massa molar de 32 kDa. Portanto as duas cutinases apresentaram-se como proteínas monoméricas em solução.

Kwon *et al.* (2009) caracterizaram duas cutinases recombinantes de *Fusarium solani* em *Pichia pastoris*. A massa molecular foi determinada por eletroforese SDS-PAGE e ambas as enzimas apresentaram massa de aproximadamente 20-25 kDa.

Liyanage *et al.* (1993) avaliaram cutinases produzidas por duas cepas geneticamente distintas de *Colletotrichum gloeosporioides* isoladas de citros. A massa molecular das duas principais cutinases encontradas foi de 19 a 26 KDa e 21 a 24 KDa.

6.4. CARACTERIZAÇÃO ENANTIOSSELETIVA

6.4.1. Cromatografia em camada delgada para determinação de formação de éster

As reações de esterificação das cutinases brutas foram feitas como descrito nos itens 5.2.7.1. e 5.2.7.2. Os resultados preliminares indicam a formação do éster octanoato de octila (Figuras 12 e 13), quando a reação ocorreu em presença do ácido octanóico com os alcoóis (*R*) e (*S*)-2-octanol catalisada pelas quatro enzimas.

Quando se substituiu estes alcoóis pela forma racêmica, observou-se maior esterificação com as enzimas produzidas nos meios com farelo de arroz e torta de pinhão manso, mostrando que estas enzimas embora sejam capazes de esterificar, possivelmente apresentam baixa enantiosseletividade (Figura 14). Os resultados indicam que as enzimas produzidas nos meios com farelo de trigo e casca de soja são mais enantiosseletivas.

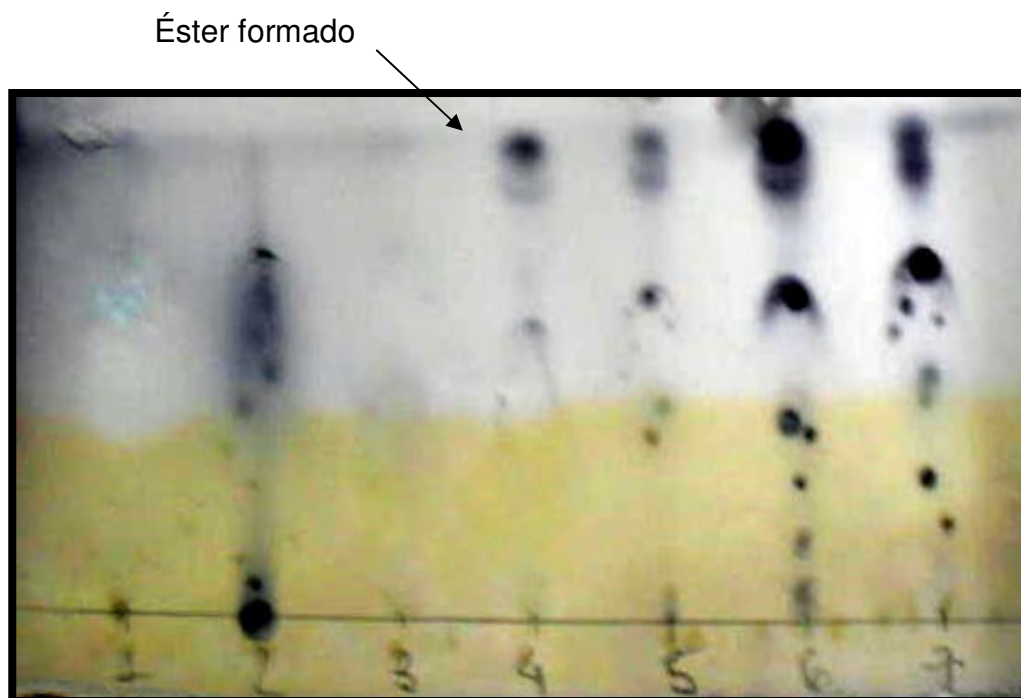


Figura 11: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido octanóico e (*R*)-2-octanol

1- Ácido octanóico, 2- (*R*)-2-octanol, 3- Branco, 4- Enzima produzida em meio com farelo de trigo, 5- Enzima produzida em meio com casca de soja, 6- Enzima produzida em meio com farelo de arroz, 7- Enzima produzida em meio com torta de pinhão manso

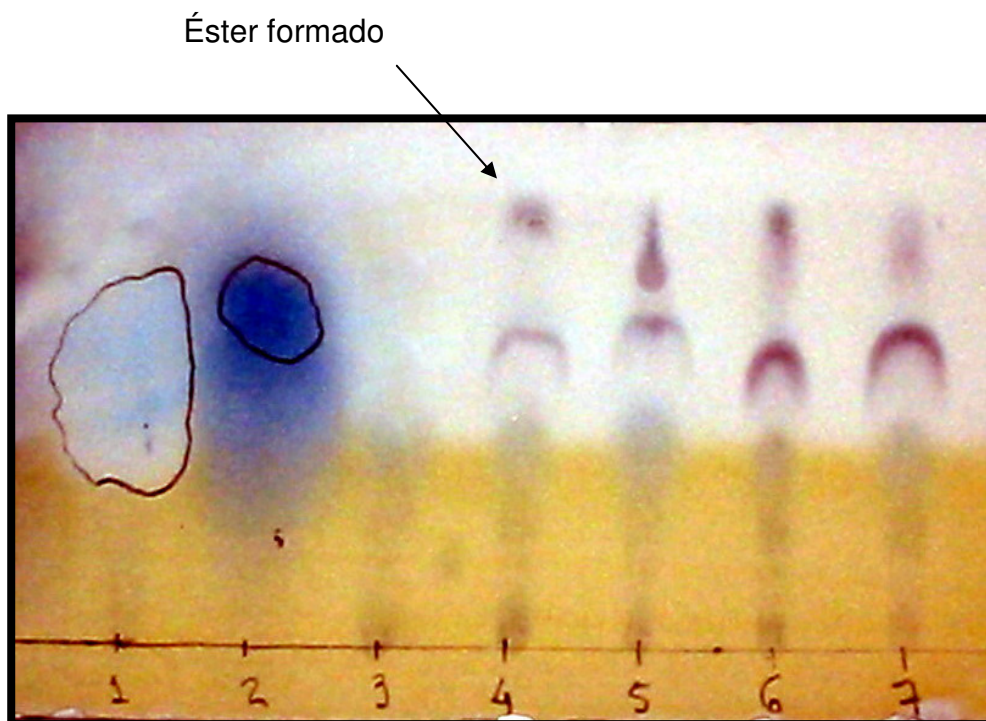


Figura 12: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido octanóico e (S)-2-octanol

1- Ácido octanóico, 2- (S)-2-octanol, 3- Branco, 4- Enzima produzida em meio com farelo de trigo, 5- Enzima produzida em meio com casca de soja, 6- Enzima produzida em meio com farelo de arroz, 7- Enzima produzida em meio com torta de pinhão manso

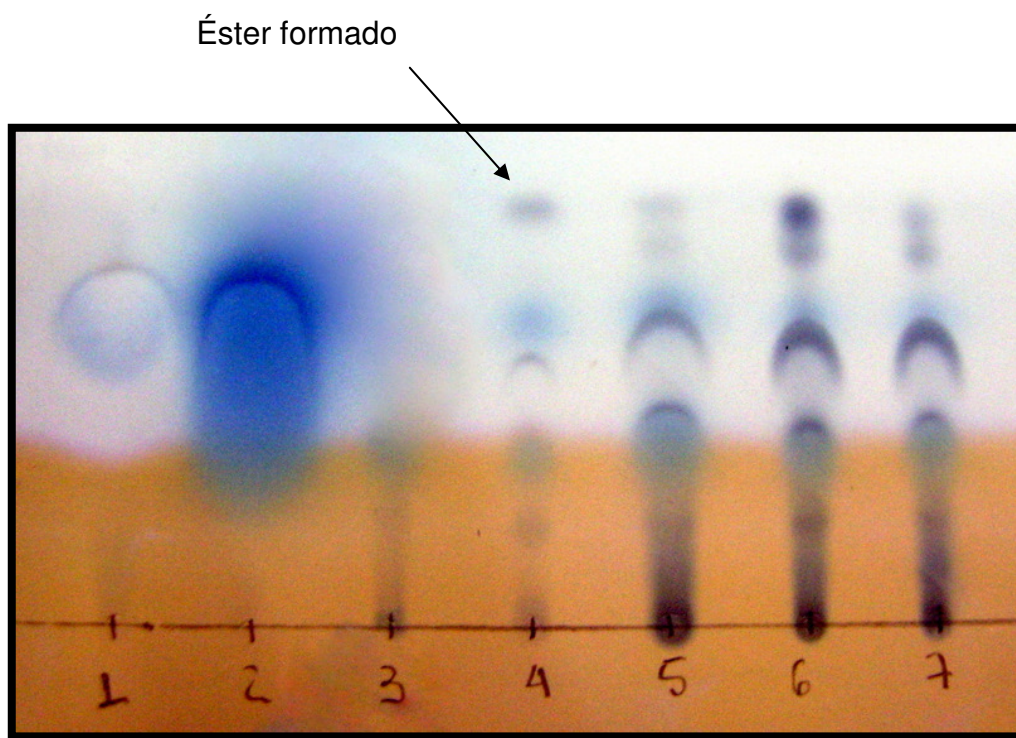


Figura 13: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido octanóico e (*R,S*)-2-octanol

1- Ácido octanóico, 2- (*R,S*)-2-octanol, 3- Branco, 4- Enzima produzida em meio com farelo de trigo, 5- Enzima produzida em meio com casca de soja, 6- Enzima produzida em meio com farelo de arroz, 7- Enzima produzida em meio com torta de pinhão manso

Resultados semelhantes foram obtidos ao se substituir o ácido octanóico pelo hexanóico. Na reação do ácido hexanóico com os alcoóis (*S*) e (*R*)-2-octanol enantiomericamente puros, houve formação de diferentes quantidades do éster hexanoato de octila com as quatro enzimas testadas (Figuras 15 e 16). Quando se substituiu estes alcoóis pela forma racêmica, observou-se maior esterificação com a enzima produzida em farelo de arroz (Figura 17).

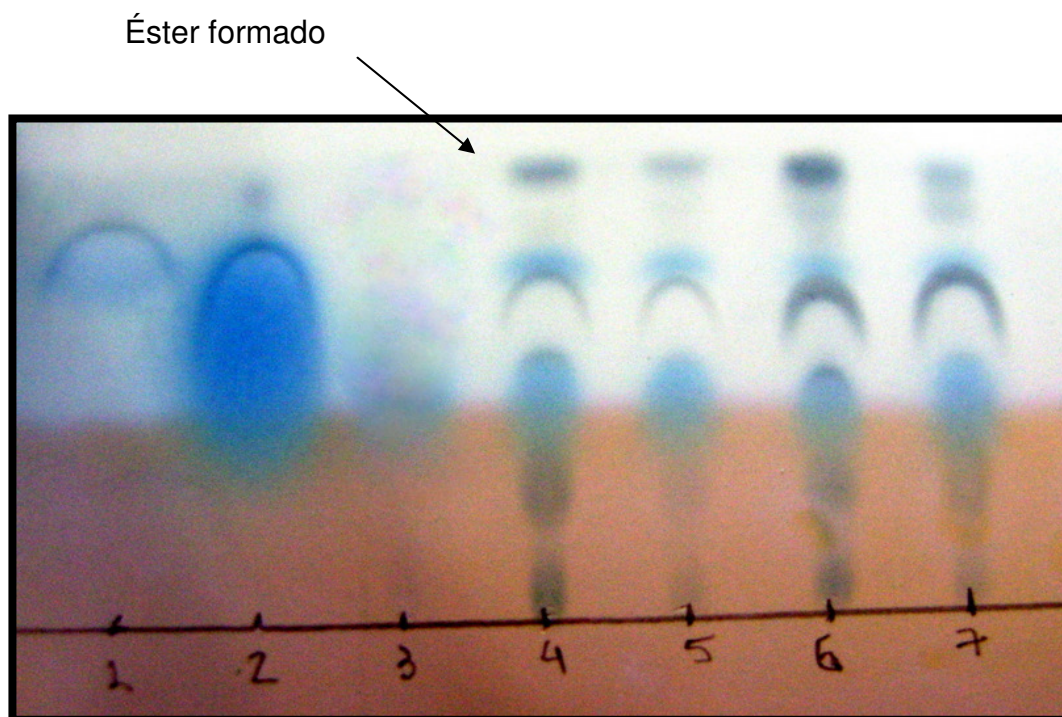


Figura 14: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido hexanóico e (*R*)-2-octanol

1- Ácido hexanóico, 2- (*R*)-2-octanol, 3- Branco, 4- Enzima produzida em meio com farelo de trigo, 5- Enzima produzida em meio com casca de soja, 6- Enzima produzida em meio com farelo de arroz, 7- Enzima produzida em meio com torta de pinhão manso

Éster formado

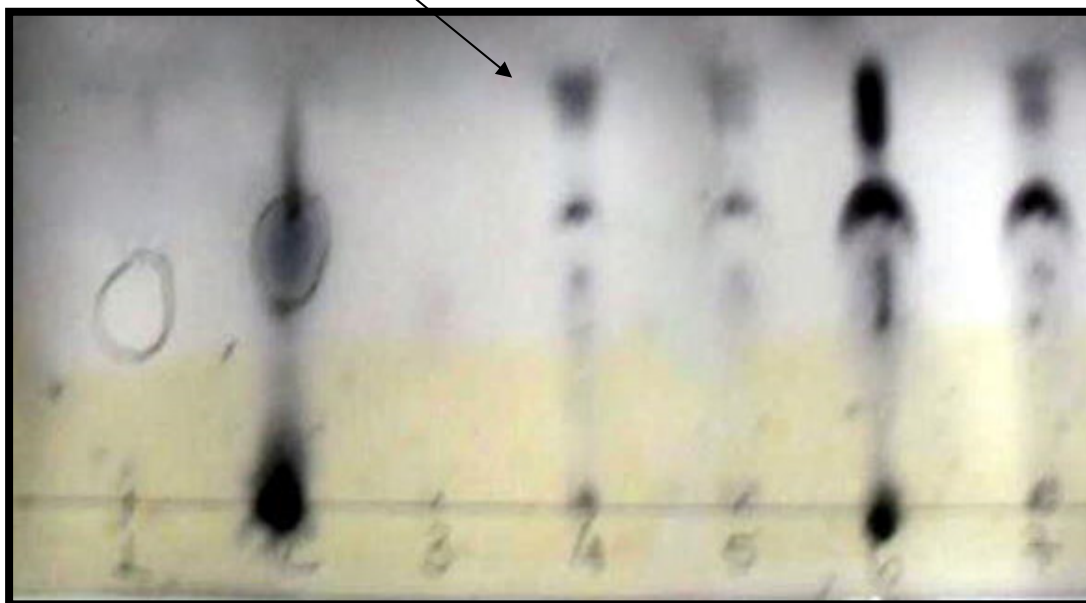


Figura 15: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido hexanóico e (*S*)-2-octanol

1- Ácido hexanóico, 2- (*S*)-2-octanol, 3- Branco, 4- Enzima produzida em meio com farelo de trigo, 5- Enzima produzida em meio com casca de soja, 6- Enzima produzida em meio com farelo de arroz, 7- Enzima produzida em meio com torta de pinhão manso

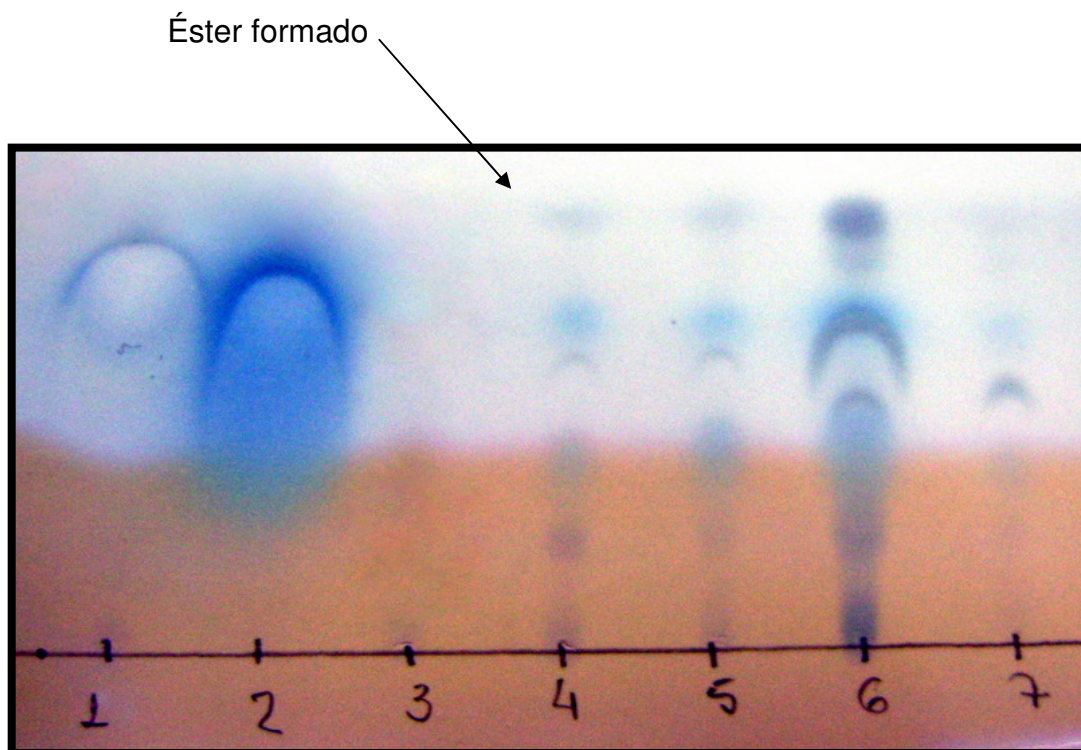


Figura 16: Reação de esterificação das cutinases brutas utilizando como substratos ácido hexanóico e (*R,S*)-2-octanol

1- Ácido hexanóico, 2- (*R,S*)-2-octanol, 3- Branco, 4- Enzima produzida em meio com farelo de trigo, 5- Enzima produzida em meio com casca de soja, 6- Enzima produzida em meio com farelo de arroz, 7- Enzima produzida em meio com torta de pinhão manso

Os resultados obtidos na cromatografia em camada delgada indicam que as enzimas produzidas nos meios com farelo de trigo e casca de soja apresentam maior potencial enantiosseletivo. Assim estas enzimas foram submetidas à cromatografia gasosa em fase quiral para confirmar estes resultados (amostras 4 e 5).

6.4.2. Caracterização enantiosseletiva das cutinases brutas

As reações de esterificação enantiosseletiva das enzimas foram feitas como descrito nos itens 5.2.7.1. e 5.2.7.2. Na Tabela 9 estão apresentados os valores

de esterificação dos alcoóis (*R*) e (*S*)-2-octanol com o ácido octanóico catalisados pelas enzimas produzidas nos meios com farelo de trigo e casca de soja. Os resultados mostram boa taxa de conversão do éster para ambas as enzimas, indicando também esterificação preferencial do enantiômero *S* do que do enantiômero *R*. Os valores de conversão após 168 horas de reação do (*S*)-2-octanol foi de 45,2% na presença da enzima produzida em farelo de trigo e de 42,5% na presença da enzima produzida em casca de soja.

Tabela 9: Esterificação do (*R*) e (*S*)-2-octanol com ácido octanóico catalisada pelas cutinases em hexano a 30 °C e 168 horas de reação

Substrato para produção das cutinases	Conversão (%) ¹	
	<i>R</i> -2-octanol	<i>S</i> -(2)-octanol
Farelo de trigo	15,4	45,4
Casca de soja	26,3	42,5

¹ Conversão é expressa como % de éster formado após 168 horas de reação

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados de conversão (*c*), excesso enantiomérico do produto *S*-éster (*ee_p*) e taxa enantiomérica (*E*) após 168 horas de reação do álcool racêmico 2-octanol com o ácido octanóico catalisados pelas enzimas produzidas em farelo de trigo e casca de soja. Os resultados mostram que a enzima produzida em casca de soja foi mais enantiosseletiva com valores de *E*=5,9 após 168 horas de reação, taxa de conversão de 40,4% e *ee_p* de 59,8%. Uma vez que esta enzima apresenta bons valores de conversão, excesso enantiomérico e taxa enantiomérica, sua utilização como catalisadora na resolução de álcoois racêmicos como o (*R,S*)-2-octanol, mostra-se bastante interessante.

Tabela 10: Esterificação do (*R,S*)-2-octanol com ácido octanóico catalisado pelas cutinases em hexano a 30°C e 168 horas de reação

Substrato para produção das cutinases	Conversão (%)	Excesso enantiomérico do produto <i>S</i> -éster (%)	Taxa enantiomérica
Farelo de trigo	38,3	45,6	3,5
Casca de soja	40,4	59,8	5,9

Na Tabela 11 estão apresentados os valores de esterificação dos alcoóis (*R*) e (*S*)-2-octanol com o ácido hexanóico catalisados pelas enzimas produzidas em farelo de trigo e casca de soja. Os resultados mostram baixo rendimento do éster para ambas as enzimas após 168 horas de reação, sendo difícil verificar também qualquer preferência por um dos enantiômeros. Embora os ácidos octanóico e hexanóico sejam semelhantes em número de carbonos os resultados obtidos mostram uma maior esterificação na presença do ácido octanóico. Uma possível explicação pode ser atribuída ao fato do sítio ativo de ambas as enzimas reconhecerem de forma mais eficiente a cadeia carbônica do ácido octanóico.

Tabela 11: Esterificação do (*R*) e (*S*)-2-octanol com ácido hexanóico catalisado pelas cutinases em hexano a 30°C e 168 horas de reação

Substrato para produção das cutinases	Conversão (%) ¹	
	<i>R</i> -2-octanol	<i>S</i> -(2)-octanol
Farelo de trigo	8,5	7,8
Casca de soja	4,8	6,9

¹ Conversão é expressa como % de éster formado após 168 horas de reação

Na Tabela 12 estão apresentados os valores de conversão (*c*), excesso enantiomérico do produto *S*-éster (*ee_p*) e taxa enantiomérica (*E*) após 168 horas de reação do álcool racêmico 2-octanol com o ácido hexanóico catalisados pelas enzimas produzidas em farelo de trigo e casca de soja. Assim como

anteriormente, os valores de conversão, excesso enantiomérico e taxa enantiomérica ficaram inferiores à reação com o ácido octanóico. Ambas as enzimas apresentaram a mesma taxa enantiomérica.

Tabela 12: Esterificação do (*R,S*)-2-octanol com ácido hexanóico catalisado pelas cutinases em hexano a 30 °C e 168 horas de reação

Substrato para produção das cutinases	Conversão (%)	Excesso enantiomérico do produto <i>S</i> -éster (%)	Taxa enantiomérica
Farelo de trigo	6,8	25,7	1,7
Casca de soja	7,8	23,8	1,7

Os resultados obtidos mostram-se bastante promissores. A otimização das reações enantiosseletivas podem favorecer a obtenção de resultados mais interessantes, possibilitando assim a utilização destas enzimas, em especial a produzida em casca de soja, em processos indústrias de separação de enantiômeros. Para propósitos práticos, um valor de *E* abaixo de 10 para qualquer biotransformação torna-se inviável como um processo enantiosseletivo. Por outro lado, este pode ser considerado bom se estiver situado entre 10 e 30 e acima deste valor, pode ser considerado excelente (FABER, 2004).

Fraga (2008) testou o potencial de esterificação e enantiosseletividade de quatro cutinases produzidas por diferentes meios de cultivo, farelo de trigo, casca de soja, farelo de arroz e meio líquido, utilizando Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID). Os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos neste trabalho. O potencial de esterificação e enantiosseletividade foi comparado utilizando a substância racêmica (*R,S*)-2-octanol com ácido octanóico em hexano. A enzima mais enantiosseletiva foi a produzida em casca de soja, com valores de *E*=3,3 após 100 horas de reação, *c*= 64,1% e *ee_p*= 33%. A enzima produzida em farelo de trigo apresentou valor de *E*=1,7 após 100 horas de reação, *c*= 73,1% e *ee_p*= 13%. A enzima produzida em farelo de arroz apresentou valores de *E*= 2,2 após 100 horas de reação, *c*= 19,4% e *ee_p*= 23. Os resultados obtidos

após 200 horas de reação foram semelhantes aos obtidos após 100 horas de reação.

Carvalho *et al.* (2005) compararam a capacidade de esterificação e enantiosseletividade de quatro lipases produzidas por espécies de *Aspergillus* na reação de esterificação, entre o (*R,S*)-2-octanol com ácido octanóico em hexano. As lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* apresentaram os melhores resultados em termos de enantiosseletividade, com valores de $E=4,9$ após 250 horas de reação; $ee_s=22,1\%$ e $c=27,2\%$ para a enzima de *Aspergillus niger* e $E=4,5$ após 250 horas de reação; $ee_s=13,6\%$ e $c=18,1\%$ para a enzima de *Aspergillus terreus*.

7. CONCLUSÕES

A caracterização bioquímica e avaliação do potencial enantiosseletivo das cutinases produzidas pelo mesmo micro-organismo em diferentes meios de cultivo mostraram que embora as enzimas apresentem composição protéica semelhante, suas características catalíticas apresentam algumas particularidades, das quais podemos citar:

- A enzima produzida no meio de cultivo com torta de pinhão manso mostrou-se mais estável em temperaturas mais elevadas que as demais enzimas;
- As enzimas produzidas nos meios com casca de soja e farelo de arroz apresentaram maior estabilidade em valores de pH mais alcalinos;
- A enzima produzida no meio com casca de soja apresentou velocidade de reação (v_{\max}) superior às demais enzimas;
- A enzima produzida no meio com de torta de pinhão manso apresentou aumento de sua atividade cutinolítica com a maioria dos sais minerais utilizados. Os sais minerais que mais aumentaram a atividade desta enzima foram 1 mM MnSO_4 , 1 mM CoCl_2 , 10 mM CaCl_2 e 10 mM FeSO_4 ;
- A enzima produzida no meio com farelo de arroz apresentou maior especificidade por ésteres sintéticos de cadeia carbônica pequena (*p*-NPB), enquanto que as demais enzimas apresentaram maior especificidade por ésteres sintéticos de cadeia média (*p*-NPC);
- A enzima produzida no meio com torta de pinhão manso apresentou alta estabilidade em solventes orgânicos, dos quais se destacou o hexano;
- A enzima produzida no meio com casca de soja, comparada com a enzima produzida em farelo de trigo, foi a mais enantiosseletiva na reação entre o álcool racêmico 2-octanol e o ácido octanóico.

Com estes resultados pôde-se concluir que a produção da cutinase em diferentes meios de cultivo pode ter alterado sua estrutura protéica, e consequentemente seu sítio ativo. Estas alterações podem explicar estas diferenças no comportamento catalítico da enzima.

A enzima produzida no meio de cultivo com torta de pinhão manso, de uma maneira geral, foi a que apresentou maior diferença catalítica em relação às demais enzimas.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diferentes trabalhos na literatura e os resultados preliminares obtidos neste trabalho demonstram o potencial destas cutinases na separação de misturas racêmicas em reações de esterificação. O estudo do efeito da temperatura, concentração e tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo e do álcool, tipo de solvente e concentração da enzima podem possibilitar o desenvolvimento de processos de separação de enantiômeros bastante interessantes com esta classe de enzimas.

A enzima produzida no meio com torta de pinhão manso mostrou-se bastante ativa na presença de solventes orgânicos. Estudos de otimização utilizando esta enzima em reações de esterificação e transesterificação podem oferecer resultados promissores.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, D.W.; CHANG, C.D.; LI, W.Y. Relevance of enantiomeric separation in food and beverage analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 1674- 1677, 1990.

AYROOKARAN, P.; MATTHEW, B. Enzyme assisted degradation of surface membranes of harvested fruit and vegetable. p.12-24, 1990 (patente CA2060510).

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

BADENES, S.M.; LEMOS, F.; CABRAL, J.M.S. Assessing the use of cutinase reversed micellar catalytic system for the production of biodiesel from triglycerides. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, p. 993-998, 2010.

BARROS, D.P.C.; FONSECA, L.P.; FERNANDES, P.; CABRAL, J.M.S.; MOJOVIC, L. Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 60, p. 178-185, 2009.

BARROS, D.P.C.; LEMOS, F.; FONSECA, L.P.; CABRAL, J.M.S. Kinetic cutinase-catalyzed esterification of caproic acid in organic solvent system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, doi:10.1016/j.molcatb.2010.06.005, 2010.

BOERSMA, Y.L.; PIJNING, T.; BOSMA, M.S.; VAN DER SLOOT, A.M.; GODINHO, L.F.; DROGE, M.J.; WINTER, R.T.; VAN POUDEROYEN, G.; DIJKSTRA, B.W.; QUAX, W.J. Loop grafting of *Bacillus subtilis* lipase A: inversion of enantioselectivity. *Chemistry & Biology*, v. 15, p. 782-789, 2008.

BORNSCHEUER, U.T.; BESSER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, S.H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnology*, v. 20, p. 433-437, 2002.

BORREGUERO, I.; CARVALHO, C.M.L.; CABRAL, J.M.S.; SINISTERRA, J.V.; ALCÁNTARA, A.R. Enantioselective properties of *Fusarium solani* pisi cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 613-622, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARRIZALES, V.; JAFFE, W. Solid state fermentation an appropriate biotechnology for developing countries. *Interscience*, v.11, p. 9-15, 1986.

CARVALHO, P.O.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R.; MACEDO, G.A. Kinetic properties and enantioselectivity of the lipases produced by four *Aspergillus* species. *Food Biotechnology*, v. 19, p. 183-192, 2005.

CASTILHO, L.R.; MITCHELL, D.A.; FREIRE, D.M.G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and soli-state fermentation. *Bioresource Technology*, v.100, p. 5996-6009, 2009.

CHEN, S. TONG, X., WOODARD, R.W., DU G., WU J., CHEN J. Identification and characterization of bacterial cutinase. *The Journal of Biological Chemistry*, v.283, p. 25854-25862, 2008.

CHEN, S.; SU Lingqia, BILLIG, S.; ZIMMERMANN W.; CHEN J.; WU J. Biochemical characterization of cutinase from *Thermobifida fusca*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, doi: 10.1016/j.molcatb.2010.01.001, 2010.

CHEN, Z.; FRANCO, C.F.; BAPTISTA, R.P.; CABRAL, J.M.S.; COELHO, A.V.; RODRIGUES JUNIOR, C.J.; MELO, E.P. Purification and identification of cutinase from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Appl Microbial Biotechnol*, v. 73, p. 1306-1313, 2007.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. *Journal of Food Engineering*, v. 76, p.291-302, 2006.

DEGANI, O.; GEPSTEIN, S.; DOSORETZ, C.G. Potencial use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 102-103, p. 277-289, 2002.

DUTTA, K.; SEN, S.; VEERANKI, V.D. Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 127-134, 2009.

EGMOND, M. R.; VLIEG, J. *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochimie*, v.82, p. 1015-1021, 2000.

ERTUNGA, N. S.; CAKMAK, Ü.; COLAK, A.; FAIZ, Ö.; SESLI, E. Characterisation of esterolytic activity from two wild mushroom species, *Amanita vaginata* var. *vaginata* and *Tricholoma terreum*. *Food Chemistry*, v. 115, p. 1486-1490, 2009.

FABER, K. *Biotransformations in organic chemistry*; 5^a ed.; Springer-Velag: Berlim, 2004.

FAIZ, O.; COLAK, A.; SAGLAM, N.; CANAKCI, S.; BELDUZ, A.O. Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, p.588-594, 2007.

FETT, W.F.; GERARD, H.C.; MOREAU, R.A.; OSMAN, S.F.; JONES, L.E. Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin-degrading enzymes. *Environmental Microbiology*, v. 58, p. 2123-2130, 1992.

FETT, W.F.; WIJEY, C.; MOREAU, R.A.; OSMAN, S.F. Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC 27730. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 561-568, 1999.

FETT, W.F.; WIJEY, C.; MOREAU, R.A.; OSMAN, S.F. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, v. 31, p. 25-29, 2000.

FLIPSEN, J.A.C.; APPEL, A.C.M.; VAN DER HIJIDEN, H.T.W.M.; VERRIPS, C.T. Mechanism of removal of immobilized triacylglycerol by lipolytic enzymes in a sequential laundry wash process. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 274-280, 1998.

FRAGA, Laira Priscila. *Produção de cutinase por Fusarium oxysporum utilizando subprodutos agroindustriais*. Campinas, 2008. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FRAGA, L.P.; CARVALHO, P.O.; MACEDO, G.A. Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* on Brazilian agricultural by-products and its enantioselective properties. *Food Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-009-0261-4, 2009

GEVENS, A.; NICHOLSON, R.L. Cutin composition: A subtle role for fungal cutinase? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 57, p. 43-45, 2000.

GONÇALVES, A.P.V.; LOPES, J.M.; LEMOS, F.; RAMOA, R.F.; PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 1, p. 53-60, 1996.

GUTIERREZ-ROJAS, M.; TORRES, E.F. *Curso de fermentaciones en medio sólido*, In: *Biotecnología para el aprovechamiento de residuos agroindustriales y municipales*. Universidade Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa. México, 1992.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, p. 175-186, 2004.

HORRI, K.; ADACHI, T.; TANINO, T.; TANAKA, T.; KOTAKA, ^a; SAHARA, H.; HASHIMOTO, T.; KURATANI, N.; SHIBASAKI, S.; OGINO, C.; HATA, Y.; UEDA, M.; K. A. Fatty acid production from butter using novel cutinase-displaying yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 194-199, 2010.

KADEMI, A.; Ait-ABDELKADER, N.; FAKHREDDINE, L. Purification and characterization of thermostable esterase from moderate thermophile *Bacillus circullans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 54, p. 173-179, 2000.

KIM, Y.H.; AHN, J.Y.; MOON, S.H.; LEE, J. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum f.sp. pisi* cutinase. *Chemosphere*, v. 60, p. 1349-1355, 2005.

KLIBANOV, A.M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water. *Focus*, v.15, p. 97-101, 1997.

KOLATTUKUDY, P.E. Cutinases from fungi and pollen. *Lipolytic Enzymes*. Ed.B. Borgstrom, H. Brockman, p.471-504. Amsterdam: Elsevier/North Holland, 1984.

KOLATTUKUDY, P.E. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Reviews Phytopathology*, v. 23, p. 223-250, 1985.

KOLATTUKUDY, P.E.; KÖLLER, W. Fungal penetration of the first line defensive barriers of plants. In: Callow JA, ed. *Biochemical Plant Patthology*. New York: Wiley, 79-100, 1985.

KWON, M.A., KIM, H.S., YANG, T.H., SONG, B.K., SONG, J.K. High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v. 68, p. 104-109, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.685-689, 1970.

LINEWEAVER, H. BURK, D. The determination of enzyme dissociation constant. *Journal of American Chemical Society*, v. 56, p. 658-661.

LIU, Z.; GOSSER, Y.; BAKER, P.J.; RAVEE, Y.; LU, Z.; ALEMU, G.; LI, H.; BUTTERFOSS, G.L.; KONG, X-P.; GROSS, R.; MONTCLARE, J.K. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: Enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *Journal of the American Chemical Society*, v.131, p. 15711-15716, 2009.

LIYANAGE, H.D.; KÖLLER, W.; McMILLAN, R.T.; KISTLER, H.C. Variation in cutinase from two populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Physiology and Biochemistry*, v. 83, p. 113-116, 1993.

LONGHI, S.; CAMBILLAU, C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochimica et Biophysica ACTA*, v. 1441, p. 185-196, 1999.

LONSANE, B.K.; SAUCEDO-CASTANEDO, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GOZALES, G.; GHILDYAL, N.P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up strategies for solid-state fermentation system. *Process Biochemistry*, v. 27, p. 259-273, 1992.

MACEDO, G.A.; PIO, T.F. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, p.388-394, 2005.

MARTIN, J.T.; JUNIPER, B.E. *The cuticles of plants*. New York: St. Martin's, 1970.

MAITI, I.B.; KOLATTUKUDY, P.E.; SHAYKH, M. Purification and characterization of a novel cutinase from *Nasturtium (Tropaeolum majus)* pollen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 196, p. 412-423, 1979.

MITCHELL D.A.; KRIEGER, N.; STUART, D.M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

NAGY, V.; TÖKE, E.R.; KEONG, L.C.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; OMAR, I.C.; SZAKÁCS, G.; POPPE, L. Kinetic resolution with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 39, p. 141-148, 2006.

NICHOLSON R.L, VANSCHOYOC S., KUC J., WILLIAMS, E.B. Response of detached apple leaves to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, v. 63, p. 649-650, 1973.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid state fermentations. *Process Biochemistry*, v. 26, p. 335-361, 1991.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v.77, p.149-162, 1999.

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

PETERSEN, S.B.; FOJAN, P. PETERSEN, E.I.; PETERSEN, M.T.N. The thermal stability of the *Fusarium solani pisi* cutinase as a function of pH. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v, 1:2, p. 62-69, 2001.

PIO, T. F.; MACEDO, G.A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 613-619, 2007.

PURDY, R.E.; KOLATTUKUDY, P.E. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition and molecular weight of two isozymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani f. pisi*. *Biochemistry*, v. 14, p. 2824-2831, 1975.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A.K.; NAMPOOTHIRI, M.K.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Coconut oil cake – a potencial raw material for the production of α -amilase. *Bioresource Technology*, v.93, p. 169-174, 2004.

REGADO, M.A.; CRISTÓVÃO, B.M.; MOUTINHO, C.G.; BALCÃO, V.M.; AIRE-BARROS, R.; FERREIRA, J.P.M.; MALCATA, F.X. Flavour development via lipolysis of milkfats: changes in free fatty acid pool. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 42, p. 961–968, 2007.

RUBIO, M.B., CARDOZA, R.E., HERMOSA, R., GUTIÉRREZ, S., MONTE, E. Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Current Genetics*, v. 54, p. 301-312, 2008.

SEBASTIAN, J.; CHANDRA, A.K.; KOLATTUKUDY, P.E. Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. *Journal of Bacteriology*, v. 169, p. 131-136, 1986.

SVASTI, J. PANIJPAN, B. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Chemical Education*, v. 54, p. 560-562, 1977.

TRAIL, F.; KÖLLER, W. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi evidence for relationship between enzyme properties and tissue specificity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 36, p. 495-508, 1990.

TRAIL, F.; KÖLLER, W. Diversity of cutinase from plant pathogenic fungi: Purification and characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*, v. 42, p. 205-220, 1993.

WALTON, T.J.; KOLATTUKUDY, P.E. Determination of the structure of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. *Biochemistry*, v.11, p. 1885- 1897, 1972.

WANG, GUANG-YI, MICHAILIDES, T.J.; HAMMOCK, B.D. LEE, Y-M.; BOSTOCK, R.M. Affinity purification and characterization of cutinase from the fungal plant pathogen *Monilinia fructicola* (wint.) honey. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 382, p. 31-38, 2000.

WANG, P., WANG, Q., FAN, X., CUI, L., YUAN, J., CHEN, S., WU, J. Effects of cutinase on the enzymatic shrink-resist finishing of wool fabrics. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44, p. 302-308, 2009.

WANG, S.C.; PINCKARD, J.A. Cotton boll cuticle, a potencial factor in boll rot resistance. *Phytopathology*, v. 63, p. 315-319, 1973.

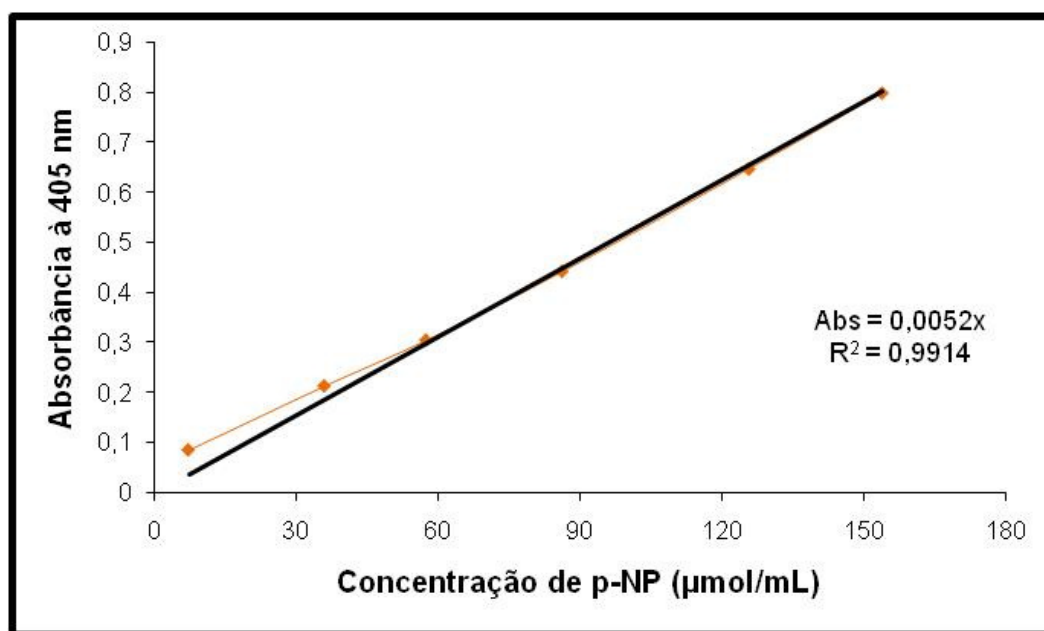
WOLSKI, E.; MENUŠI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M.A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. In solid

state and submerged fermentation: A comparative study. *Food Science and Technology*, v. 42, p. 1557-1560, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1. CURVA PADRÃO DO *P*-NITROFENOL

$\mu\text{mols de } p\text{-NP } (\mu\text{mol/mL})$	Absorbância (405 nm)
7,194	0,0854
35,971	0,2134
57,55	0,3051
86,33	0,4422
125,90	0,6472
154,17	0,7989



ANEXO 2. CURVA PADRÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Concentração da Proteína Albumina (µg/mL)	Absorbância (595 nm)
5	0,0823
10	0,1813
20	0,3134
30	0,4309
40	0,6045
50	0,7159

