

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS**

# **TRIAGEM, PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LIPASE A PARTIR DE LEVEDURAS SILVESTRES**

**Autor: Rosana Goldbeck**

**Orientador: Francisco Maugeri Filho**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**CAMPINAS – SÃO PAULO**

**2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Goldbeck, Rosana  
G564t      Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a  
partir de leveduras silvestres / Rosana Golbeck. -- Campinas, SP:[s.n.],  
2008.

Orientador: Francisco Maugeri Filho  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Leveduras - Seleção. 2. Lipase. 3. Caracterização. I.  
Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Screening, production and activity evaluation of lipase enzyme from wild  
yeasts

Palavras-chave em inglês (Keywords): Yeast - Selection, Lipase, Characterization

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho

Gabriela Alves Macedo

Eliana Setsuko Kamimura

Daniel Ibraim Pires Atala

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho**  
Orientador – FEA/DEA/UNICAMP

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Alves Macedo**  
Membro – FEA/DCA/UNICAMP

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Setsuko Kamimura**  
Membro – USP/PIRASSUNUNGA

---

**Dr. Daniel Ibraim Pires Atala**  
Membro – CTC/PIRACICABA

## DEDICATÓRIA

***Ao meu Pai Silvano e às minhas irmãs Silvania e  
Luzia, pelo amor, apoio, compreensão e incentivo.  
Amo muito vocês!***

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço à Faculdade de Engenharia de Alimentos e à UNICAMP por me acolherem e permitirem meu desenvolvimento profissional e pessoal.*

*Agradeço às agências financiadoras CAPES e FAPESP pelas bolsas de mestrado.*

*Agradeço ao Prof. Francisco Maugeri Filho pela orientação, dedicação, amizade, confiança e pelo grande ensinamento científico.*

*Gostaria de agradecer a Prof<sup>a</sup>. Gabriela Alves Macedo, a Prof<sup>a</sup>. Eliana Setsuko Kamimura e ao Dr. Daniel Ibraim Pires Atala por aceitarem fazer parte da banca examinadora e pelas correções e sugestões que muito contribuíram para este trabalho.*

*Agradeço à Dr<sup>a</sup>. Fátima Aparecida de Almeida Costa (Fifa) por ser uma pessoa adorável e estar sempre disposta a ajudar na realização dos trabalhos e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Rodrigues pelas sugestões ao longo da execução dos experimentos.*

*Não posso deixar de agradecer meus amigos e colegas da pós-graduação e principalmente do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (grande família LEB), pelos momentos compartilhados, pela ajuda, amizade e alegria.*

*Agradeço aos funcionários e professores da FEA/UNICAMP, pela ajuda e ensinamentos.*

*Agradeço imensamente a minha família, pelo apoio, incentivo e amor. Mesmo distantes estiveram sempre presentes na minha mente e coração. Ao meu Pai pelo grande ensinamento e incentivo aos meus estudos. À minha mãe querida, que mesmo em outro plano espiritual, me ilumina e protege todos os dias. Á minhas irmãs (Luzia e Silvania) pela grande amizade, amor e ajuda, sem vocês eu nada seria.*

*Agradeço aos meus amigos que me proporcionaram momentos de alegria e felicidade, em especial Leila, Letícia e Raquel Kuhn pela grande amizade e companheirismo, e também a minhas colegas de apartamento (irmãzinhas), Raquel e Natália que me acolheram quando cheguei em Campinas e são pessoas muito especiais, e Lorena e Rejane com quem convivo diariamente e desfruto de grande amizade e carinho. E a todos os outros amigos que aqui não citei, mas que de alguma forma me ajudaram e estão presentes no meu coração.*

*E principalmente à Deus, que me ilumina e protege todos os dias.*

*Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

***"Nossa recompensa se encontra no  
esforço e não no resultado.  
Um esforço total é uma vitória  
completa." (Ghandi)***

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE TABELAS DO ANEXO .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE FIGURAS DO ANEXO .....	xv
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 TRIAGEM DE MICRORGANISMOS .....	4
3.2 ENZIMAS MICROBIANAS .....	6
3.3 LIPASES.....	7
3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS LIPASES .....	9
3.5 ESTRUTURA E MECANISMO DE ATUAÇÃO DAS LIPASES .....	11
3.6 PROPRIEDADES DA LIPASES .....	12
3.6.1 Especificidade ou Regiosseletividade.....	13
3.6.2 Seletividade ou Especificidade de Substrato .....	14
3.6.3 Enantiosseletividade ou Estereoespecificidade .....	15
3.7 REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES.....	15
3.8 APLICAÇÕES DAS LIPASES .....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 MICRORGANISMOS .....	27
4.2 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASE.....	27
4.2.1 Cultivo em Meio Sólido.....	27
4.2.2 Cultivo em Meio Líquido .....	28
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	29
4.3.1 Método Tilulométrico .....	29
4.3.2 Método Espectrofotométrico.....	29
4.4 PROCESSO FERMENTATIVO – CONTROLE ANALÍTICO.....	30
4.4.1 Determinação da Atividade Lipolítica.....	30

4.4.2 Medida de pH.....	30
4.4.3 Concentração Celular.....	31
4.4.4 Determinação de Proteína.....	31
4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LIPASE.....	31
4.5.1 Perfil de Temperatura e pH .....	31
4.5.2 Estabilidade Térmica.....	32
4.5.2.1 Determinação da Constante de Desnaturação ( $K_d$ ) .....	32
4.5.2.2 Determinação da meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ ) .....	33
4.5.2.3 Determinação da Energia de Ativação da Desnaturação ( $E_{ad}$ ).....	33
4.5.3 Estabilidade de pH .....	33
4.5.3.1 Determinação da Constante de Desnaturação ( $K_d$ ) .....	34
4.5.3.2 Determinação da meia vida ( $t_{1/2}$ ).....	34
4.6 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE SUBSTRATO .....	34
4.7 SÍNTESE DE ÉSTERES EM MEIO ORGÂNICO.....	34
4.7.1 Síntese de Heptil Oleato.....	34
4.7.2 Síntese de Etil Oleato.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASE.....	36
5.1.1 Seleção em Meio Sólido.....	36
5.1.2 Seleção em Meio Líquido .....	41
5.2 PROCESSO FERMENTATIVO.....	47
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS LIPASES .....	52
5.3.1 Perfil de Temperatura e pH .....	52
5.3.2 Estabilidade Térmica.....	71
5.3.3 Estabilidade de pH .....	82
5.4 ESPECIFICIDADE DE SUBSTRATO.....	88
5.5 SÍNTESE DE ÉSTERES EM MEIO ORGÂNICO.....	90
5.5.1 Síntese de Heptil Oleato.....	90
5.5.2 Síntese de Etil Oleato.....	92
6 CONCLUSÕES.....	95
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS.....	104
Anexo 1 .....	104



Anexo 2 .....	105
Anexo 3 .....	106
Anexo 4 .....	107
Anexo 5 .....	108
Anexo 6 .....	109
Anexo 7 .....	110
Anexo 8 .....	111
Anexo 9 .....	112
Anexo 10.....	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seletividade das lipases de diferentes fontes segundo Xu (2000).....	14
Tabela 2. Aplicações industriais das lipases. ....	19
Tabela 3. Regiões nas quais foram isolados os microrganismos. ....	27
Tabela 4. Valores utilizados no DCCR para determinação do pH e temperatura ótimas.....	32
Tabela 5. Critério de seleção das leveduras potencialmente produtoras de lipase nas diferentes regiões do país.....	37
Tabela 6. Valores utilizados no DCCR para determinação do pH e temperatura ótimas para a lipase do microrganismo AC02. ....	53
Tabela 7. Matriz do DCCR e resposta para a lipase do microrganismo AC02.....	53
Tabela 8. Coeficientes de regressão para a atividade lipolítica do DCCR da levedura AC02. ....	54
Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para a atividade lipolítica da levedura AC02. ....	55
Tabela 10. Valores de atividade lipolítica, experimentais e previstos pelo modelo, desvios e desvios relativos para o DCCR da levedura AC02.....	55
Tabela 11. Validação dos resultados para a lipase produzida pela levedura AC02.....	58
Tabela 12. Valores utilizados no DCCR para determinação do pH e temperatura ótimas para a lipase do microrganismo AAV1. ....	59
Tabela 13. Matriz do DCCR e resposta para a lipase do microrganismo AAV1. ....	59
Tabela 14. Coeficientes de regressão para a atividade lipolítica do DCCR da levedura AAV1. ....	60
Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para a atividade lipolítica da levedura AAV1. ....	60
Tabela 16. Valores de atividade lipolítica, experimentais e previstos pelo modelo, desvios e desvios relativos para o DCCR da levedura AAV1.....	61
Tabela 17. Validação dos resultados para a lipase produzida pela levedura AAV1. ....	64
Tabela 18. Valores utilizados no DCCR para determinação do pH e temperatura ótimas para a lipase do microrganismo AY3. ....	65
Tabela 19. Matriz do DCCR e resposta para a lipase do microrganismo AY3.....	65
Tabela 20. Coeficientes de regressão para a atividade lipolítica do DCCR da levedura AY3. ....	66
Tabela 21. Análise de variância (ANOVA) para a atividade lipolítica da levedura AY3.....	66
Tabela 22. Valores de atividade lipolítica, experimentais e previstos pelo modelo, desvios e desvios relativos para o DCCR da levedura AY3.....	67

Tabela 23. Validação dos resultados para a lipase produzida pela levedura AY3.....	70
Tabela 24. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 30°C....	71
Tabela 25. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 37°C....	72
Tabela 26. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 45°C....	72
Tabela 27. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 50°C....	72
Tabela 28. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 55°C....	73
Tabela 29. Valores de $K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ ) e suas respectivas temperaturas para a lipase do microrganismo AC02. ....	74
Tabela 30. Valores experimentais e estimados da constante de desnaturação ( $k_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para as temperaturas estudadas para o microrganismo AC02. ....	75
Tabela 31. Valores de $K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ ) e suas respectivas temperaturas para a lipase do microrganismo AAV1. ....	76
Tabela 32. Valores experimentais e estimados da constante de desnaturação ( $k_d$ ) a meia vida ( $t_{1/2}$ ) para as temperaturas estudadas para o microrganismo AAV1.....	78
Tabela 33. Valores de $K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ ) e suas respectivas temperaturas para a lipase do microrganismo AY3.....	79
Tabela 34. Valores experimentais e estimados da constante de desnaturação ( $k_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para as temperaturas estudadas para o microrganismo AY3. ....	80
Tabela 35. Valores experimentais de meia vida ( $t_{1/2}$ ) nas diferentes temperaturas estudadas para as lipases provenientes dos 3 microrganismos selecionados. ....	81
Tabela 36. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 5,5. ....	83
Tabela 37. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 6,0. ....	83
Tabela 38. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 6,5. ....	84
Tabela 39. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 7,0. ....	84
Tabela 40. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 8,0. ....	84
Tabela 41. Valores experimentais da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e de meia vida ( $t_{1/2}$ ) nos diferentes pHs estudados para as lipases provenientes dos 3 microrganismos selecionados. ....	85
Tabela 42. Valores residuais de heptanol nas amostras e porcentagem de esterificação.....	91
Tabela 43. Valores residuais de etanol nas amostras e porcentagem de esterificação.....	92

## LISTA DE TABELAS DO ANEXO

Tabela 1. Tempo de retenção dos compostos da amostra AC02 / heptanol. ....	104
Tabela 2. Tempo de retenção dos compostos da amostra AC02 / etanol. ....	105
Tabela 3. Tempo de retenção dos compostos da amostra AAV1 / heptanol. ....	106
Tabela 4. Tempo de retenção dos compostos da amostra AAV1 / etanol. ....	107
Tabela 5. Tempo de retenção dos compostos da amostra AY3 / heptanol.....	108
Tabela 6. Tempo de retenção dos compostos da amostra AY3 / etanol. ....	109
Tabela 7. Tempo de retenção dos compostos da amostra comercial / heptanol. ....	110
Tabela 8. Tempo de retenção dos compostos da amostra comercial / etanol. ....	111
Tabela 9. Valores das áreas para curva de calibração de heptanol. ....	112
Tabela 10. Valores das áreas para curva de calibração de etanol. ....	113

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações catalisadas por lipases segundo Oliveira et al., (2000).....	17
Figura 2. Halo de hidrólise formado ao redor das colônias de leveduras produtoras de lipase. .....	28
Figura 3. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região do Cerrado. ....	37
Figura 4. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região do Pantanal. ....	38
Figura 5. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região da Floresta Amazônica. ....	39
Figura 6. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região da Mata Atlântica I.....	39
Figura 7. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região da Mata Atlântica II.....	40
Figura 8. Produção de lipase pelas leveduras isoladas de resíduo de queijo e xarope.....	40
Figura 9. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 10 leveduras pré-selecionadas na região do Cerrado. ....	41
Figura 10. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 3 leveduras pré-selecionadas na região do Pantanal. ....	42
Figura 11. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 4 leveduras pré-selecionadas na região da Floresta Amazônica e 1 levedura isolada de resíduo de queijo...	42
Figura 12. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 20 leveduras pré-selecionadas na região da Mata Atlântica I.....	43
Figura 13. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 6 leveduras pré-selecionadas na região da Mata Atlântica II.....	44
Figura 14. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 11 leveduras selecionadas quando cultivadas em meio não enriquecido.....	45
Figura 15. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 11 leveduras selecionadas quando cultivadas em meio enriquecido.....	46
Figura 16. Comportamento do microrganismo AC02 durante o processo fermentativo.....	48
Figura 17. Comportamento do microrganismo AVV1 durante o processo fermentativo.....	50
Figura 18. Comportamento do microrganismo AY3 durante o processo fermentativo.....	51
Figura 19. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo da levedura AC02.	56
Figura 20. Superfície de resposta para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AC02. ....	57
Figura 21. Curvas de contorno para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AC02. ....	57
Figura 22. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo da levedura AAV1.	62

Figura 23. Superfície de resposta para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AAV1.....	63
Figura 24. Curvas de contorno para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AAV1.....	63
Figura 25. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo da levedura AY3....	68
Figura 26. Superfície de resposta para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AY3. ....	69
Figura 27. Curvas de contorno para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AY3. ....	69
Figura 28. Efeito da temperatura em função do tempo de incubação para a lipase do microrganismo AC02, para cálculo da constante de desnaturação ( $K_d$ ) na $T = 55^\circ\text{C}$ . ....	73
Figura 29. Linearização dos valores de $K_d$ em função da temperatura (K) para o cálculo da energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da lipase do microrganismo AC02. ....	74
Figura 30. Linearização dos valores de $K_d$ em função da temperatura (K) para o cálculo da energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da lipase do microrganismo AAV1. ....	77
Figura 31. Linearização dos valores de $K_d$ em função da temperatura (K) para o cálculo da energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da lipase do microrganismo AY3. ....	79
Figura 32. Perfil de estabilidade térmica para as lipases provenientes dos microrganismos AC02, AAV1 e AY3.....	81
Figura 33. Efeito do pH em função do tempo de incubação para a lipase do microrganismo AC02, para cálculo da constante de desnaturação ( $K_d$ ) no pH 8,0.....	85
Figura 34. Perfil de estabilidade de pH para as lipases provenientes dos microrganismos AC02, AAV1 e AY3.....	87
Figura 35. Atividade Relativa das lipases (AC02, AAV1 e AY3) em diferentes triglicerídeos.	88

## LISTA DE FIGURAS DO ANEXO

Figura 1. Cromatograma da amostra ACO2 utilizando heptanol na mistura reacional.....	104
Figura 2. Cromatograma da amostra ACO2 utilizando etanol na mistura reacional. ....	105
Figura 3. Cromatograma da amostra AVV1 utilizando heptanol na mistura reacional. ....	106
Figura 4. Cromatograma da amostra AVV1 utilizando etanol na mistura reacional. ....	107
Figura 5. Cromatograma da amostra AY3 utilizando heptanol na mistura reacional. ....	108
Figura 6. Cromatograma da amostra AY3 utilizando etanol na mistura reacional. ....	109
Figura 7. Cromatograma da amostra Comercial utilizando heptanol na mistura reacional. ....	110
Figura 8. Cromatograma da amostra Comercial utilizando etanol na mistura reacional. ....	111
Figura 9. Curva de calibração de heptanol.....	112
Figura 10. Curva de calibração de etanol.....	113

## RESUMO

Lipases (E.C.3.1.1.3) constituem um importante grupo de enzimas definidas como carboximetilesterases que catalisam a hidrólise de cadeias longas de acilgliceróis na interface água-óleo. Estão amplamente distribuídas na natureza estando presentes em animais e vegetais, podendo ser produzidas por microrganismos como fungos e bactérias. As lipases apresentam promissoras aplicações comerciais devido a sua estabilidade, seletividade, larga especificidade por substratos e capacidade de síntese orgânica. Embora os estudos científicos tenham se concentrado mais na aplicação das lipases, alguns grupos de pesquisa se dedicam também ao isolamento de microrganismos produtores de lipase, em busca de novas enzimas com diferentes propriedades e especificidades. Este trabalho teve como objetivo explorar uma classe de microrganismos pouco utilizada para a produção de lipases, que são as leveduras. Assim, a partir de leveduras silvestres isoladas de diversas regiões do país, selecionaram-se cepas produtoras de lipase, que foram em seguida estudadas e caracterizadas. Primeiramente, realizou-se uma triagem inicial a partir de 372 leveduras isoladas e selecionaram-se aquelas que apresentam capacidade de produção de lipase. Esta seleção foi feita através da formação de um halo transparente ao redor das colônias quando cultivadas em placas contendo 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura, 2% de agar e 0,1% de tributirina, pH 6,0 a 30°C por 48 horas. Após pré-selecionadas, as leveduras foram cultivadas em meio líquido contendo: 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura e 1% de óleo de oliva, pH 6,0, temperatura de 30°C durante 48 horas sob agitação de 150 rpm para posterior determinação da atividade lipolítica. Em uma segunda etapa, após a seleção dessas leveduras, a lipase foi caracterizada quanto à especificidade de substrato, perfil de pH e temperatura, estabilidade térmica e de pH e capacidade biocatalítica de síntese orgânica. A especificidade de substrato da enzima foi realizada através da determinação da atividade lipolítica utilizando diferentes triglicerídeos ( $C_4$ ,  $C_8$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{18:1}$ ) como substratos. Para verificar a atividade catalítica, foi realizada síntese de ésteres em meio orgânico. Os ésteres formados durante a reação foram quantificados por cromatografia gasosa. Na etapa de seleção, das 372 leveduras silvestres estudadas, 3 cepas foram selecionadas com potencial para produção de lipase. Estas foram caracterizadas e apresentaram comportamentos distintos. Para a cepa AC02, temos como condições ótimas para a reação enzimática pH 7,0 e temperatura 44°C, para o microrganismo AAV1, também temos como ótimo o pH 7,0, porém, uma temperatura um pouco mais elevada, 47°C, já para a levedura AY3, as condições ótimas de temperatura e pH foram 37°C e 6,6 respectivamente. Quanto à especificidade de substrato, a enzima proveniente do microrganismo AY3 apresentou atividade lipolítica superior em tributirina ( $C_4$ ) e tricaprilina ( $C_8$ ) quando comparada com óleo de oliva, demonstrando maior especificidade por triglicerídeos de cadeia curta e média. As três cepas estudadas apresentaram capacidade biocatalítica, no entanto foram registradas maiores porcentagens de esterificação quando utilizado etanol ao invés de heptanol como componente reacional. Portanto, a procura de novas lipases através de programas de seleção de microrganismos produtores é de fundamental importância para ampliar ainda mais o campo de aplicação dessas enzimas.



## ABSTRACT

Lipases (E.C.3.1.1.3) consists of an important group of enzymes defined as carboxymethylesterases that catalyze the hydrolysis of long chains of acylglycerols in the water-oil interface. They are thoroughly distributed in the nature being present in animals and vegetables and can be produced by microorganisms such as fungal and bacteria. Lipase presents a promising commercial application because of their stability, selectivity, large specificity for substrates and capacity of organic synthesis. Although the scientific studies have been more concentrated in the application of lipases, some research groups are dedicated to the isolation of lipase producer microorganisms, with the goal of finding new enzymes with different substrate specificities. In face of that, this work had as main objective to select wild lipase producer yeasts isolated from different areas of the country, as well as study the specificity of the enzyme. At first, a selection of wild yeasts that presented lipase production capacity was accomplished. The strains that produce lipase were selected considering the formation of a transparent halo around of the colonies when cultivated in plates containing 0.5% of peptone, 0.3% of yeast extract, 2% of agar and 0.1% of tributyrin, at pH 6.0 and 30°C for 48 hours. After being previously selected, the yeasts were then cultivated in shacked flasks in medium containing 0.5% of peptone, 0.3% of yeast extract and 1% of olive oil also at pH 6.0 and 30°C for 48 hours, under agitation of 150 rpm for subsequent determination of the lipolytic activity. At a second stage, after the selection of the yeasts, the lipases were characterized concerning substrate specificity, pH and temperature profile, thermal and pH stability and the biocatalyst capacity for synthesis in organic media. The enzyme specificities for substrates were accomplished throughout the determination of the activity using different triglycerides ( $C_4$ ,  $C_8$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{18:1}$ ) as substrate. To verify the catalytic lipolytic activity, the synthesis of esters were accomplished in organic medium. The esters formed during the reaction were quantified by gas chromatography. In the selection stage, of the 372 studied wild yeasts, 3 strains were selected with potential for lipase production. These enzymes were characterized and they presented different behavior. For the strain AC02, the optimum conditions for the enzymatic reaction were pH 7.0 and 44°C, for the microorganism AAV1, the pH 7.0 was also better however the optimum temperature was a little higher, 47°C, and for the yeast AY3, the optimum conditions for temperature and pH were 37°C and 6.6 respectively. For substrate specificity, the enzyme originated from the microorganism AY3 presented superior lipolytic activity in tributyrin ( $C_4$ ) and tricapyrin ( $C_8$ ) when compared with olive oil, demonstrating larger specificity for triglycerides of short and medium chain. The three strains studied presented biocatalyst capacity, however larger esterification percentages were registered when ethanol was used as component of the reaction instead of heptanol. Hence, the search of new lipases through programs of selection of microorganisms is of fundamental importance to enlarge the field of application of those enzymes.

# 1 INTRODUÇÃO

A biocatálise é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou células animais representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial. Os microrganismos neste caso são de particular interesse devido ao curto período de geração, a grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas e, não há um número limitado de microrganismo na natureza que possam ser testados, os quais são bastante diferentes entre si (CARVALHO et al., 2005).

Devido à grande biodiversidade brasileira, as espécies pertencentes à fauna e flora talvez não venham a ser conhecidas em sua totalidade, sabendo-se, entretanto, que o número de espécies ainda não identificadas pode alcançar a ordem de dezena de milhões. Neste contexto é fundamental a implementação de programas na busca de um melhor aproveitamento da biodiversidade brasileira. Atualmente, há um grande interesse em encontrar espécies de microrganismos ainda não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria em geral e à de alimentos em particular, bem como otimizar processos de produção desses insumos a partir de microrganismos já conhecidos (HERNALSTEENS, 2006).

As lipases são enzimas largamente distribuídas na natureza, presentes em diversos microrganismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Sua função biológica é catalisar a hidrólise de óleos e gorduras, fornecendo ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Esta reação é reversível, pois as lipases catalisam a formação de glicerídeos a partir de ácidos graxos e glicerol na interface óleo-água (BURKERT et al., 2004).

Os fungos são os microrganismos preferidos como produtores industriais de lipases, porque as enzimas produzidas por eles normalmente são extracelulares, o que facilita a sua extração do meio fermentado, além de serem mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (BURKERT, 2003; CIAFARDINI et al., 2006).

O interesse na produção de lipases microbianas tem aumentado significativamente nas últimas décadas, devido ao seu amplo potencial de aplicações industrial, seja na indústria de alimentos como aditivos (modificando aromas), química fina (síntese de ésteres),

detergente (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêuticas e medicinais (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) entre outras (BURKERT et al., 2004).

Embora os estudos científicos tenham se concentrado mais na aplicação das lipases, alguns grupos de pesquisa também se dedicam ao isolamento de microrganismos produtores de lipase, em busca de novas enzimas com diferentes especificidades (PASTORE et al., 2003).

A descoberta da capacidade das lipases de catalisar reações de síntese e sua surpreendente estabilidade em diversos solventes orgânicos abriu inúmeras possibilidades no campo da síntese química, onde as diferentes seletividades de lipases de várias fontes, aliada às condições suaves de temperatura e pressão em que atuam, apresentam uma enorme vantagem em relação aos catalisadores convencionais (FEVRIER et al., 2001).

Devido a sua versatilidade, as lipases têm sido aplicadas em diferentes processos biotecnológicos para produção de compostos industriais e também na biotransformação em síntese orgânica. As reações de hidrólise, alcóólise e glicerólise proporcionam excelente rendimento, processo mais econômico e qualidade superior do produto final. Além disso, alguns dos produtos formados não poderiam ser obtidos por processos químicos convencionais, sendo, portanto, produzidos em processos que utilizam lipases devido sua especificidade (FEVRIER et al., 2001; HASAN et al., 2006).

A principal razão de introduzir a biotransformação num processo de síntese orgânica é devido ao controle régio e estéreo seletivo que se pode realizar nos passos onde se utilizam enzimas como catalisadores. Recentemente, tem sido demonstrado que a síntese de heptil oleato é um ótimo teste comparativo de seletividade, considerado como reação padrão para verificar a atividade biocatalítica das lipases em meio orgânico (CASA et al., 2006).

Em face disso, este trabalho teve como objetivo selecionar leveduras silvestres produtoras de lipase, provenientes de amostras coletadas de pólen de flores, frutos, caules e solos, de diversas regiões do país, bem como estudar a especificidade da enzima. Para tanto, primeiramente foi realizada uma triagem de leveduras silvestres que apresentaram capacidade de produção de lipase, e em uma segunda etapa, após selecionadas as leveduras, a lipase foi caracterizada quanto a sua atividade lipolítica, perfil de pH e temperatura, estabilidade térmica e de pH e especificidade de substrato da enzima. A capacidade biocatalítica de síntese orgânica da lipase também foi verificada, através da síntese de ésteres (heptil oleato e etil oleato) em meio orgânico.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Este trabalho teve por objetivo selecionar leveduras silvestres produtoras de lipase, provenientes de amostras coletadas de pólen de flores, frutos, caules e solos, de diversas regiões do país, bem como estudar a especificidade da enzima.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para alcançar o objetivo principal deste trabalho foram estipulados os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a atividade lipolítica da enzima;
- Monitorar as respostas fisiológicas dos microrganismos durante o processo fermentativo;
- Caracterizar a lipase quanto ao perfil de pH e temperatura;
- Verificar a estabilidade térmica e de pH da enzima;
- Determinar a especificidade de substrato da enzima;
- Verificar a capacidade biocatalítica de síntese da lipase em meio orgânico.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 TRIAGEM DE MICRORGANISMOS

O crescente aumento das pesquisas na área da enzimologia estimula a descoberta de novos microrganismos a fim de aumentar a produtividade, a especificidade e a estabilidade das enzimas (GEOK et al., 2003).

Microrganismos produtores de enzimas são encontrados em diversos *habitats*, como em rejeitos de indústrias de processo de óleos vegetais e de laticínios, solos, sementes, frutos e alimentos apodrecidos (SHARMA et al., 2001). O solo possui uma grande diversidade de populações microbianas de onde se podem isolar estes microrganismos e avaliar a sua capacidade para a produção de enzimas (KO, WANG E ANN, 2005).

A crescente necessidade de abordagens mais seletivas e menos imediatas do uso dos recursos naturais do planeta impulsiona o avanço dos processos biotecnológicos. Na base de todos os processos biotecnológicos encontra-se a biodiversidade genética. Estima-se que o Brasil detenha cerca de 20% da biodiversidade mundial (ZANOTTO et al., 2007).

No entanto, a seleção de cepas selvagens hiperprodutoras é uma técnica de grande importância, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade como o Brasil (FREIRE E CASTILHO, 2000).

O Brasil tem uma área de 8,5 milhões de quilômetros quadrados, possuindo várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido, o semi-árido e áreas temperadas. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas (biomas). A variedade de biomas reflete a riqueza da flora e fauna brasileira, tornando-as as mais diversas do mundo. Diversidade biológica, ou biodiversidade que inclui a variedade genética dentro das populações e espécies, a variedade de espécies de flora, fauna e de microrganismos, a variedade de funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas, a variedade de comunidades, *habitats* e ecossistemas formados pelos organismos (HERNALSTEENS, 2006)

Estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes na Terra, tenham sido descritos. Isso porque os esforços dos centros de pesquisa estão focados principalmente nos macro-organismos (mamíferos, répteis, anfíbios, aves, peixes e plantas), resultando no conhecimento de 80 a 90% destes seres. No entanto os microrganismos, mesmo exercendo

funções vitais nos ecossistemas e na biosfera em geral foram pouco estudados, tanto devido à falta de interesse quanto à dificuldade na pesquisa destes seres invisíveis a olho nu (HERNALSTEENS, 2006).

Vários microrganismos são capazes de sintetizar enzimas. Usualmente, mais de um tipo de enzima hidrolítica é sintetizado, garantindo deste modo, o consumo de vários tipos de substratos e a subsistência do microrganismo. Entretanto, a triagem de microrganismos produtores de enzimas é de grande importância para o descobrimento de novas enzimas, mais estáveis e seletivas, podendo ser usadas para biocatálise e sínteses orgânicas (CARDENAS et al., 2001; SANDOVAL & MARTY, 2007).

O crescente mercado para as lipases exige a seleção de novos microrganismos produtores com maiores taxas de produção a fim de reduzir os custos, visando aumentar a produtividade e obter enzimas com diferentes propriedades. À procura por fontes de novos microrganismos produtores de lipases avaliando as aplicações futuras que requerem não somente a especificidade da enzima-substrato, mas também a estabilidade do processo, tal como a tolerância do pH e a estabilidade térmica elevada, vem ganhando cada vez mais destaque nos estudos científicos (SHU, XU E LIN, 2006).

Para a seleção dos microrganismos produtores de enzimas, empregam-se métodos de detecção qualitativos ou quantitativos (GUPTA et al., 2004). Um dos métodos qualitativos para a produção de lipase consiste em obter halo diferenciado ao redor da colônia, devido às substâncias diferenciadas adicionadas ao meio, que podem ser baseados em Tween 20, Tween 80, tributirina e óleo de oliva (GUPTA et al., 2004; FREIRE, 1996).

Dentre os métodos quantitativos para a verificação da atividade lipolítica, freqüentemente se utiliza a reação de hidrólise de ésteres de ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia, como por exemplo de p-nitrofenilpalmitato, que ocasiona a liberação de p-nitrofenol, de coloração amarela, que absorve na região do visível a 410 nm. A limitação desse método é relativa ao pH e só permite utilização em pH neutro ou alcalino, pois o p-nitrofenol não absorve na região de visível (amarelo) em pHs ácidos (GUPTA et al., 2004).

Outro método quantitativo bastante utilizado é o método titulométrico que se baseia na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no caldo fermentado bruto, sobre os triglicerídeos de óleo de oliva emulsionados em goma arábica (FREIRE et al., 1997; CARDENAS et al., 2001).

## 3.2 ENZIMAS MICROBIANAS

Teoricamente, as enzimas podem ser obtidas de animais, plantas ou microrganismos. Entretanto, para a maioria dos processos enzimáticos, enzimas microbianas são mais utilizadas, porque são mais fáceis e baratas de serem obtidas. Uma das razões para isso é que muitas bactérias e fungos têm habilidade natural de secretar enzimas e crescer em meios com baixo custo. Outra razão para o uso de microrganismos é que muitos deles possuem uma longa história de aplicação segura na indústria de alimentos (JOHNSON-GREEN, 2002; CARVALHO et al., 2003).

Dentro da indústria de alimentos, as enzimas são particularmente úteis quando uma transformação específica é requerida. Estas são muito utilizadas para produção de ingredientes e modificação de textura (JOHNSON-GREEN, 2002).

As vantagens do emprego de enzimas microbianas em processos industriais se devem (1) à existência de diferentes tipos de atividade enzimática, (2) à rapidez e estabilidade de produção através de fermentação microbiana de baixo custo, reprodutível e segura, e (3) às otimizações no rendimento que são obtidas muito mais facilmente com a engenharia genética ou de proteínas do que a partir de culturas de plantas ou animais. Além disso, não são nocivas a saúde humana, sendo reconhecidas como “Generally Regarded as Safe - GRAS” (LEE, 1996; CARVALHO et al., 2005).

As enzimas de uso industrial, diferentes daquelas empregadas para propósitos analíticos ou clínicos são na atualidade em sua grande maioria hidrolases, geralmente extracelulares, de estruturas simples, relativamente estáveis, não requerem cofatores para a expressão da atividade. Geralmente trata-se de preparados brutos não puros, produzidos e utilizados por métodos convencionais. Não obstante, a produção de enzimas com uma maior pureza tem aumentado nesses últimos tempos, para a fabricação de enzimas imobilizadas e para síntese de compostos de alto valor agregado (FEVRIER et al., 2001).

A produção de enzimas hidrolíticas (proteases, esterases e lipases) por fungos é muito explorada tecnologicamente. Estas são usadas usualmente para clivar ligações éster ou amidas e também para sintetizar essas ligações quando há concentrações de água baixas ou nulas combinadas com solventes orgânicos (ZANOTTO et al., 2007).

Mais de 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente utilizam hidrolases. Dentre as enzimas hidrolíticas de maior interesse, 5-10% cabem as lipases. As lipases são

extremamente versáteis, pois catalisam várias reações e diversos substratos, quando comparadas às outras hidrolases (CARVALHO et al, 2005).

### 3.3 LIPASES

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem o grupo das enzimas definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise de cadeias longas de acilgliceróis na interface água-óleo. As lipases agem sobre óleos e gorduras na clivagem das ligações ésteres de glicerídeos, liberando ácidos graxos, monoacilgliceróis ou diacilgliceróis, ou ainda nas interesterificações de óleos e gorduras, produzindo monoacilgliceróis, ou diacilgliceróis desejados ou alterando a composição de ácidos graxos de óleos e gorduras (TAN et al., 2003; BURKERT et al., 2004; CASTRO-OCHOA et al., 2005; CIAFARDINI et al., 2006).

Por serem enzimas que apresentam uma forma de ação incomum, são solúveis em água, mas catalisam reações envolvendo substratos lipofílicos. Sua estrutura molecular muitas vezes composta por uma “tampa” que protege o sítio ativo predominantemente hidrofóbico da enzima, tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa (JAEGER & EGGERT, 2002).

As lipases e esterases são capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases atuem sobre ésteres insolúveis em água como os triglicerídeos (FREIRE, 1996). As lipases apresentam um modo de ação semelhante ao das esterases, porém sua atividade aumenta em muito quando situadas na interface polar/apolar. Talvez isto ocorra devido ao fato de uma parte da superfície da enzima se encontrar em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar, colocando o sítio ativo da enzima em posição favorável para a catálise (PASTORE et al., 2003).

Enzimas lipolíticas, como lipases e esterases, constituem um importante grupo de enzimas associadas ao metabolismo e a degradação de lipídeos. As lipases propiciam a quebra de emulsões de ésteres, glicerinas e ácidos graxos de cadeia longa, como por exemplo, a trioleína e tripalmitina (SHARMA et al., 2001).

Uma característica específica das lipases é sua capacidade de agir sobre substratos pouco solúveis em água, atuando somente na interface água/lipídeo, diferenciando-se, assim, das esterases, que atuam sobre ligações éster de substâncias solúveis em água. A atividade catalítica das lipases é sensivelmente diminuída na ausência de uma interface, o



que é evidenciado pela baixa conversão na hidrólise de ésteres solúveis em água por elas catalisadas (OLIVEIRA et al., 2000).

As lipases são amplamente distribuídas na natureza estando presentes em tecidos e fluídos de origem animal, vegetal e em microrganismos (CIAFARDINI et al., 2006). Antigamente, elas eram predominantemente obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Atualmente, as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de microrganismos devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção. Em geral, os microrganismos mais utilizados para a produção de lipases são fungos dos Gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor* (CARDENAS et al., 2001; SHARMA et al., 2001). Muitas cepas de leveduras também vêm sendo empregadas na produção de lipase, principalmente dos Gêneros *Saccharomyces*, *Candida* e *Williopsis* (CIAFARDINI et al., 2006). Estas destacam-se pela sua maior velocidade de crescimento quando comparadas com os fungos (bolos).

Muitas bactérias e fungos (bolos e leveduras) podem ser usados para a produção de lipases. As lipases podem ser produzidas por fermentações em estado sólido e submersas. Por causa da simplicidade e viabilidade econômica, muitas enzimas vêm sendo produzidas por fermentação em estado sólido, pois esta utiliza muitas vezes como alternativa substratos baratos (HAQ et al., 2002).

Uma grande variedade de microrganismos apresenta a habilidade de produzir lipases, dependendo dos parâmetros reacionais e apresentando diferentes especificidades, peso molecular, sensibilidade a pH e temperatura. No entanto, do ponto de vista industrial, os fungos são os microrganismos preferidos como produtores industriais de lipase, porque as enzimas produzidas por eles normalmente são extracelulares, o que facilita a sua extração do meio fermentado (CIAFARDINI et al., 2006).

Milhares de microrganismos diferentes foram isolados do solo e avaliados quanto a sua capacidade de produzir lipases e 20% destes mostraram-se úteis em tal aplicação (JAEGER & EGGERT, 2002).

As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens se comparadas as de origem animal e vegetal, uma vez que são enzimas extracelulares em sua grande maioria, são facilmente separadas do micélio por filtração ou centrifugação, o processo pode ser facilmente conduzido, possuem alta velocidade de síntese e alto rendimento de conversão de substrato em produto (LEAL, 2000). Além disso, são enzimas termoestáveis e

apresentam versatilidade e simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (SHARMA et al., 2001).

Uma importante característica das lipases é sua habilidade de não apenas hidrolisar ligações de ésteres, transesterificação de triacilgliceróis e resolução de misturas racêmicas, mas também de sintetizar ligações ésteres em meios não aquosos (ABBAS et al., 2002).

Lipases microbianas apresentam um grande potencial para aplicações comerciais devido sua estabilidade, seletividade e larga especificidade por substratos (CARDENAS et al., 2001).

Uma das maiores limitações do uso industrial das lipases são os altos custos das matérias-primas utilizadas no meio de produção de enzima, como óleo de oliva, que constituem aproximadamente 25% a 50% do custo total de produção. Uma alternativa é a utilização de materiais crus de baixos custos, como, por exemplo, bebida alcoólica de milho e óleo de soja, que conduzem uma redução nos custos dos meios de cultura (BURKERT et al., 2004).

As lipases diferenciam-se uma das outras devido a suas características físico-químicas e propriedades bioquímicas como: especificidade pelo substrato, condições ótimas de reação, sensibilidade a inibidores e necessidade de ativadores. Dependendo do microrganismo produtor de lipase, a massa molecular desta enzima pode variar na faixa de 20 a 200 KDa, apresentando atividade enzimática numa ampla faixa de pH que varia de 4 a 9 e temperatura numa faixa de 25°C a 70°C (CASTRO-OCHOA et al., 2005).

### **3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS LIPASES**

O potencial de aplicação de uma determinada lipase em indústrias químicas, farmacêuticas ou alimentícias dependerá quase que exclusivamente de sua atuação catalítica (atividade e estabilidade) sob diferentes condições de pH e temperatura. Torna-se assim muito importante o conhecimento das características cinéticas da enzima que está sendo produzida, não só para sua futura utilização com também pelas informações necessárias para a otimização e entendimento do processo fermentativo. Dessa forma, a caracterização das enzimas ganha destaque, pois estas podem ser afetadas tanto pelo processo de purificação, como por outros fatores (como tempo e forma de estocagem, alterações no meio de fermentação e nas demais condições de obtenção, etc). Além de

fornecer dados para compreender melhor a atuação e as alterações sofridas pela enzima (MALDONADO, 2006).

As propriedades físico-químicas das lipases apresentam grande diversidade não só decorrentes das características do microrganismo produtor, com também pelas diferenças cinéticas entre duas ou mais isoenzimas produzidas pela mesma espécie. Para tanto, é de fundamental importância o estudo da temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e de pH, meia-vida e outros parâmetros que são decisivos na hora do dimensionamento de um processo enzimático (MALDONADO, 2006).

Existe uma diversidade muito grande de lipases que podem ser obtidas a partir de microrganismos e estas podem apresentar características muito distintas entre si. Há lipases que tem sua atividade ótima em pH ácido, outras atuam próximas a neutralidade e, ainda aquelas ditas alcalinas. Geralmente a maioria das lipases fúngicas apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade ao pH que oscila entre 6,0 e 8,0 (FREIRE, 1996).

Em relação à temperatura ótima também há um amplo espectro de lipases atuando em várias faixas de temperatura. Os valores ótimos de atividade e estabilidade, em geral, situam-se na faixa de 30 a 40°C, com exceção das lipases provenientes de fungos termófilos, que são estáveis em temperaturas superiores a 55°C (FREIRE, 1996; MALDONADO, 2006).

Segundo Castro et al. (2004), dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica.

Burket et al. (2001) realizaram a caracterização parcial da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meio sintético contendo peptona e óleo de soja. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 7,0 e 37°C. A estabilidade térmica da enzima foi relativamente baixa, com uma meia-vida de 3,6 h (37°C e pH 7,0) e a atividade enzimática foi quase totalmente inibida pela presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ag}^{+}$  e, parcialmente inibida, pela presença de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ .

### 3.5 ESTRUTURA E MECANISMO DE ATUAÇÃO DAS LIPASES

A estrutura tridimensional da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática foram determinadas em 1990. Desde então, mais de onze estruturas de lipases já foram determinadas, das quais, com exceção da lipase pancreática, todas são de origem microbiana (JAEGER & EGGERT, 2002).

Estas enzimas mostram uma característica padrão conhecida como o entrelaçado de  $\alpha/\beta$  hidrolase. O sítio ativo da lipase é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. O resíduo nucleofílico serina é localizado no C-terminal da fita  $\beta$ 5 de um pentapeptídeo GX SXG altamente conservado, formando uma característica principal “ $\beta$  em torno de  $\alpha$ ”, designada como a cavidade nucleofílica. O sítio é composto de uma folha  $\beta$  central consistindo de 8 diferentes fitas  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 8) conectadas com seis  $\alpha$  hélices (A-F) (JAEGER & EGGERT, 2002).

A hidrólise do substrato inicia-se com o ataque nucleofílico pelo oxigênio da serina no átomo de carbono carbonílico na ligação éster, levando à formação de um intermediário tetraédrico estabilizado pelas ligações do hidrogênio a átomos de nitrogênio de resíduos da cadeia principal pertencente à cavidade de oxiânion. Um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado com a liberação dos ácidos graxos e regeneração da enzima (JAEGER & EGGERT, 2002; CASTRO et al., 2004).

As reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídeo podendo, em alguns casos, impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, que só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea (SHARMA et al. 2001).

Substratos lipolíticos usualmente formam um equilíbrio entre os estados monoméricos, micelar e emulsificados, resultando na necessidade de um modelo de sistema adequado ao estudo da cinética da lipase. A técnica de camada única tem sido usada extensivamente e, mais recentemente, a tecnologia gota-óleo foi proposta para estabelecimento da cinética da lipase, que é monitorada pela análise automática do perfil de uma gota de óleo suspensa em água. A redução na tensão superficial entre o óleo e a água causada pela hidrólise da lipase é medida em função do tempo (JAEGER & EGGERT, 2002).

O fenômeno mais conhecido originado de estudos cinéticos recentes de reações lipolíticas é a “ativação interfacial”, que relaciona o aumento da atividade da lipase em

função de substratos insolúveis, que formam emulsão. Lipases, diferentemente das esterases, são definidas como carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados (CASTRO et al., 2004).

A determinação da estrutura tridimensional da lipase fornece uma explicação elegante para a ativação interfacial. O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (CASTRO et al., 2004).

Recentemente, revelou-se que a presença de uma estrutura em forma de tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e uma lipase pancreática não específica, não demonstraram ativação interfacial, embora apresentem uma “tampa” anfifílica cobrindo seus sítios ativos. Esta observação sugere que a presença de uma tampa dominante e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como a lipase. Portanto, a definição atual é bastante simples: uma lipase é uma carboxilesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa (JAEGER & EGGERT, 2002; CASTRO et al., 2004).

### **3.6 PROPRIEDADES DA LIPASES**

Segundo Carvalho et al. (2005) a importância do uso de enzimas (lipases) em biocatálise tem se mostrado cada vez mais evidente devido a grande versatilidade das reações catalisadas. As propriedades catalíticas das lipases como seletividade e estereoespecificidade, podem ser extremamente fáceis de serem controladas por condições de reação. Esta dependência das propriedades catalíticas das lipases com seu meio reacional pode ser uma consequência do seu mecanismo de ação complexo, que envolvem mudanças conformacionais significantes na sua estrutura. Isto sugere que as lipases são muito susceptíveis às mudanças na interação entre a sua superfície e o meio, que podem modificar o equilíbrio entre a estrutura aberta e fechada, e talvez, a forma do centro ativo.

A especificidade das lipases é fator crucial na determinação de suas potenciais aplicações em processos industriais. A descoberta de lipases com especificidades diferentes

das já reportadas na literatura, através de programas de isolamento e seleção, poderia ampliar o seu campo de aplicação nas áreas de química fina e de óleos e gorduras. Esta propriedade de atuarem seletivamente sobre seus substratos depende da fonte da enzima e apresentam, a exemplo das demais propriedades gerais, uma grande diversidade (FREIRE, 1996, CASTRO et al., 2004).

### **3.6.1 Especificidade ou Regiosseletividade**

Segundo Foglia et al. (1993) e Pabai et al. (1995) as lipases, de acordo com sua especificidade (regiosseletividade), estão divididas em três grupos: Lipases não-específicas, Lipases 1,3 específicas, Lipases ácido graxos específicas.

#### **Lipases não-específicas**

Catalisam a hidrólise completa dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, apresentando monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários, atuando de modo aleatório. As lipases de *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* têm sido comumente usadas para a síntese de acilglicerol, alcóolise e interesterificação de glicerídeos.

#### **Lipases 1,3-específicas**

Catalisam a hidrólise dos ácidos graxos ligados ao C<sub>1</sub> e C<sub>3</sub> do glicerol, produzindo ácidos graxos 2-monoacilgliceróis ou 1,2- ou 2,3-diacilgliceróis, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil produzindo 1,3-diacilgliceróis e 1- ou 3-monoacilgliceróis. Neste grupo, temos como exemplo, as lipases produzidas pelo *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei* e por várias espécies de *Rhizopus*.

#### **Lipases ácido graxo específicas**

São específicas para hidrólise de ésteres com determinados ácidos graxos, como por exemplo, a lipase produzida pelo *Geotrichum candidum*, que hidrolisa preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia longa insaturados, com dupla ligação cis, no C<sub>9</sub>. Ésteres com ácidos graxos saturados ou sem insaturação no C<sub>9</sub> são lentamente hidrolisados. Devido

a esta especificidade, lipase de *Geotrichum candidum* tem sido estudada para alcóólise de óleos selecionados que contém ácidos graxos poliinsaturados.

### 3.6.2 Seletividade ou Especificidade de Substrato

Grande parte das lipases apresenta a propriedade de hidrolisar preferencialmente um determinado grupo de substratos (especificidade de substrato), em geral relacionado ao tamanho da cadeia carbônica ou grau de insaturação do grupo acil em questão (PEDERSON & HOLMER 1995; GUPTA et al., 2004).

Segundo Gupta et al. (2004) as lipases provenientes de *Bacillus* sp. e *P. alcaligenes* são específicas por triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia longa. Já as lipases de origem de *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *C. viscosum* e *Aeromonas hydrophila* preferem ácidos graxos de curta ou média cadeia de carbono. Enquanto que a lipase proveniente de *S. aureus* tem demonstrado preferência por ácidos graxos insaturados.

Na Tabela 1 estão relacionadas algumas fontes de lipases e sua seletividade de substrato e regiosseletividade.

Tabela 1. Seletividade das lipases de diferentes fontes segundo Xu (2000).

Fontes de Lipase	Seletividade de Substrato	Regiosseletividade
<i>Aspergillus niger</i>	C,M,L	1,3>>2
<i>Candida lipolytica</i>	C,M,L	1,3>2
<i>Humicola lanuginosa</i>	C,M,L	1,3>>2
<i>Mucor javanicus</i>	M,L>>L	1,3>2
<i>Rhizomucor miehei</i>	C>M,L	1>3>>2
Pancreática	C>M,L	1,3
Pré-gástrica	C,M>>L	1,3
<i>Penicillium roquefortii</i>	C,M>>L	1,3
<i>Rhizopus delemar</i>	M,L>>C	1,3>>2
<i>Rhizopus javanicus</i>	M,L>C	1,3>2
<i>Rhizopus niveus</i>	M,L>C	1,3>2
<i>Rhizopus oryzae</i>	M,L>C	1,3>>>2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M,L>C	1,3>2
<i>Pseudomonas</i> sp.	C,M,L	1,3>2
<i>Rhizopus arrhizus</i>	C,M>L	1,3

C: Ácidos Graxos de cadeia curta; M: cadeia média; L: cadeia longa.

### **3.6.3 Enantiosseletividade ou Estereoespecificidade**

As lipases podem ainda possuir um tipo de especificidade denominada estereoespecificidade, que é a habilidade em discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica (JAEGER & EGGERT, 2002; CARVALHO et al., 2005).

Estereoespecificidade é a propriedade das lipases de reagirem em diferentes velocidades com dois enantiômeros gerando, depois de determinado tempo de reação, um excesso enantiomérico que possibilita a resolução de racematos e a obtenção de compostos opticamente puros. Alguns autores atribuem esta propriedade das lipases ao fato de serem enzimas constituídas apenas por L-aminoácidos o que as tornaria catalisadores quirais (CASTRO et al., 2004; CARVALHO et al., 2005).

A reação de esterificação enantiosseletiva catalisada por lipases tem sido usada com sucesso na resolução de profenos. Uma forma bastante simples de obter a forma (S)-ativa presente na mistura racêmica do fármaco é realizar a reação de esterificação utilizando lipase que apresente enantiosseletividade para a forma (R)-ibuprofeno. Desta forma, a enzima catalisa seletivamente a conversão para (R)-éster, discriminando o (S)-ibuprofeno da mistura racêmica. Posteriormente o ácido discriminado, (S)-ibuprofeno, pode ser separado do meio reagindo-se com uma base forte em meio aquoso (CARVALHO et al., 2005).

Regiosseletividade, estereoespecificidade, especificidade de substrato e baixo custo de obtenção são algumas das características que fazem com que os processos catalisados por lipases microbianas se tornem mais atrativos do que os processos convencionais não enzimáticos (SHARMA et al. 2001; JAEGER & EGGERT, 2002; GUPTA et al., 2004)

Todas estas propriedades relatadas determinam a importância biotecnológica das lipases. A relativa disponibilidade de grandes quantidades de enzimas microbianas obtidas por bioprocessos tem ampliado a pesquisa sobre o uso, com potencial industrial, de lipases produzidas por fungos e bactérias (JAEGER & EGGERT, 2002; CARVALHO et al., 2005).

## **3.7 REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES**

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas



como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: sua alta estabilidade em solventes orgânicos; não requerem a presença de co-fatores; possuem uma larga especificidade pelo substrato e, exibem uma alta enantiosseletividade (SHARMA et al., 2001; CASTRO et al. 2004; HASAN et al., 2006).

A reação de hidrólise envolve ataque na ligação éster do triglicerídeo na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos. A alta especificidade das lipases em relação ao substrato triglicerídeo com relação ao tipo e a posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxo propiciam um grande número de aplicações industriais na área alimentícia (SHARMA et al., 2001; HASAN et al., 2006).

Após a realização de estudos que comprovam que as lipases mantêm sua atividade e estabilidade em solventes orgânicos, novas e importantes aplicações destes catalisadores naturais foram desenvolvidas (OLIVEIRA et al., 2000).

A reação de esterificação entre polióis e ácidos graxos é, em sua essência, a reação inversa da hidrólise do glicerídeo correspondente. As velocidades relativas da reação direta (hidrólise) e inversa (esterificação) são usualmente controladas pela atividade de água da mistura reacional. Exemplos de produtos químicos de alto valor agregado obtidos pelo uso de lipases para esterificação incluem a síntese de ésteres de ácido oléico com álcoois alifáticos primários e secundários, álcoois terpênicos e a produção de ésteres dos álcoois geraniol e mentol com ácido butírico e ácido láurico, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2000).

Embora a função natural das lipases seja quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), liberando ácidos graxos, monoalcilgliceróis ou diacilgliceróis, as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos. Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para efetuar reações de interesterificação (acidólise, alcóolise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados (CASTRO et al., 2004).

O termo interesterificação refere-se a troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), entre um éster e um álcool (alcóolise), ou um éster e um outro éster (transesterificação). Nessas reações o triglicerídeo reage com um ácido graxo, um álcool ou outro éster, resultando num rearranjo dos grupos dos ácidos graxos do triglicerídeo de forma

a produzir um novo triglicerídeo. O rearranjo é o resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação como podem ser visualizados na Figura 1. A concentração ótima de água no meio reacional deve ser suficientemente baixa de forma a minimizar a formação de produtos de hidrólise indesejáveis, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça totalmente ativa (OLIVEIRA et al., 2000; CASTRO et al., 2004).

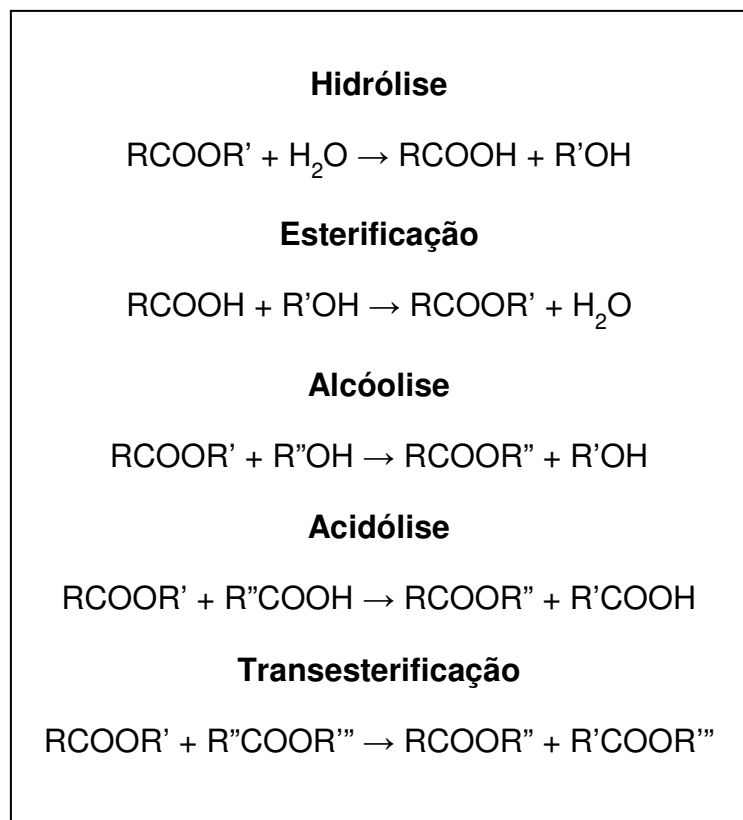


Figura 1. Reações catalisadas por lipases segundo Oliveira et al., (2000).

Outros compostos, além de água e álcool, podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem participar de reações como aminólises, lactonização e oximólises, em solventes orgânicos, com elevada seletividade (CASTRO et al., 2004). O uso deste biocatalizador em aminólise de ésteres, em meios anidros, tem sido bem sucedido na síntese de peptídeos e amidas de ácidos graxos. Esses resultados são promissores para a utilização de tecnologia de lipases em síntese de peptídeos opticamente ativos, polímeros, surfactantes e novos detergentes com baixo custo (GHOTRA, et al., 2002). A atividade hidrolítica da lipase pode ser diretamente relacionada com sua atividade de síntese, mas é independente de sua atividade de interesterificação.

Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (GHOTRA, et al., 2002; CASTRO et al., 2004).

### **3.8 APLICAÇÕES DAS LIPASES**

Atualmente, as lipases dominam cerca de 5% do mercado mundial de enzimas. Entretanto nota-se uma inclinação ao crescimento deste mercado, devido ao vasto número de aplicações reveladas (PALMA et al., 2000).

Devido à grande variedade de reações que catalisam, as lipases têm inúmeras aplicações industriais tanto na indústria de alimentos como de química fina. As vantagens que o uso de lipases apresenta sobre os processos químicos convencionais estão descritas em Xu (2000):

- Alta eficiência em condições de baixas temperaturas e pressão atmosférica;
- Reduzida poluição ambiental;
- Produtos originados de reações enzimáticas são considerados “naturais” pela legislação da maioria dos países;
- Lipases apresentam vários graus de seletividade, ao contrário dos catalisadores convencionais, gerando menos produtos secundários e reduzindo a necessidade de purificação.

Atualmente o maior empecilho ao uso de lipases em processos industriais está relacionado ao alto custo deste catalisador, entretanto os recentes avanços na tecnologia de engenharia genética e de modificação e imobilização de lipases têm grande possibilidade de mudar este quadro num futuro próximo (XU, 2000).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente nas últimas décadas. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. Atualmente, o maior consumidor da enzima lipase é a indústria de formulação de detergentes, na qual é usada geralmente em combinação com outras enzimas (proteases e celulasas), sendo responsável pela remoção de manchas de gordura tais como batom, fritura, manteiga, azeite, molhos e as difíceis manchas em colarinhos e punhos (CASTRO et al., 2004).

Embora, atualmente, as aplicações industriais das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais, conforme podem ser visualizadas na Tabela 2. As lipases vêm deste modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais (CASTRO et al., 2004).

Tabela 2. Aplicações industriais das lipases.

<b>Setor</b>	<b>Efeito Utilizado</b>	<b>Produto</b>
<b>Alimentício</b>		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para produtos lácteos
Panificação	Melhoramento do sabor e/ou qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas, ex: saque, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais; Hidrólise de óleos (ácidos graxos), diglicerídeos	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
<b>Químico</b>		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes

Fonte: Castro et al., (2004).

Na indústria alimentícia as lipases têm papel no desenvolvimento de sabores e odores específicos e característicos de alguns alimentos. As duas maiores aplicações das lipases em processamento de alimentos são: (1) síntese específica de lipídeos com ácidos graxos desejados, e (2) formação de ácidos graxos voláteis para melhorar o aroma da manteiga, queijo e vários outros alimentos. A primeira aplicação faz uso das capacidades sintéticas das lipases, e a segunda faz uso das propriedades hidrolíticas destas enzimas. A síntese de lipídeos é realizada através da transesterificação. Quando um lipídeo simples é exposto a um ácido graxo desejado e lipase, a enzima canalizará a substituição de um ou mais ácidos graxos pelo ácido graxo mais desejável. Algumas lipases catalisam esta reação em pontos específicos na molécula de glicerol (por exemplo, uma lipase 2-específica troca ácidos graxos apenas no segundo carbono do glicerol). Outras lipases (por exemplo, as produzidas por *Candida rugosa*, um organismo “GRAS”) não são específicas e podem formar diversos lipídeos diferentes. As lipases de *C. rugosa* são particularmente populares porque podem trocar um grande número de ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeias e graus de insaturação (JOHNSON-GREEN, 2002).

Na indústria de laticínios, lipases, em conjunto com proteases, são utilizadas na aceleração da maturação de queijos melhorando a textura e o aroma destes produtos. A função hidrolítica das lipases é também útil porque pode ser usada para formação de ácidos graxos livres, que freqüentemente contribuem para o aroma de alimentos (SHARMA et al., 2001; JOHNSON-GREEN, 2002; CASTRO et al., 2004). Da mesma forma, na indústria de chocolates e caramelos a liberação de ácidos graxos pela adição de lipases melhora o aroma do produto final.

Na panificação a adição de lipases a massas de pães e bolos aumenta a capacidade de retenção de ar e o aroma além de retardar a sinerese, aumentando a vida de prateleira (SHARMA et al., 2001). O uso de lipase 1,3-específica tem um excelente efeito condicionador da massa, facilitando o seu manuseio em máquinas convencionais da indústria de panificação. Além disso, aumenta o volume do pão, melhora a textura do miolo e confere ao mesmo uma cor mais branca. Nesta aplicação, a lipase degrada os lipídeos do trigo, modificando sua interação com o glúten, permitindo que o glúten obtenha uma rede mais forte e mais elástica (CASTRO et al., 2004).

No processamento de carnes e pescados lipases são utilizadas na remoção de gordura (produção de “fat-free meats”) e na melhoria do aroma de produtos embutidos (SHARMA et al., 2001; HASAN, et al., 2006).

Além da aplicação direta no processamento, a indústria de alimentos se beneficia também da produção de aditivos por lipases. Entre eles estão os óleos e gorduras estruturados, os surfactantes citados acima e também ésteres do aroma produzidos por síntese enzimática. Vale lembrar que aditivos produzidos por via enzimática recebem o rótulo “natural” de acordo com a legislação de muitos países o que é um importante atrativo para consumidores de alimentos em todo o mundo. Os ésteres de ácidos carboxílicos são importantes componentes do aroma de vários alimentos, principalmente os de baixo peso molecular como butirato de etila com aroma característico de morango e acetato de isoamila, composto de impacto do aroma de banana. Lipases podem ser utilizadas na síntese de uma grande gama de ésteres de aroma com a vantagem adicional de garantir um excesso enantiomérico muitas vezes crucial para obtenção do aroma, uma vez que o caráter e a intensidade dos compostos de aroma estão intimamente relacionados com sua estereoquímica (SHARMA et al., 2001; Castro et al, 2004; HASAN, et al., 2006).

Nos seres vivos, a atividade biológica de uma droga é geralmente dependente da estereoquímica do composto em questão. Assim, enquanto um enantiômero apresenta um efeito benéfico, o outro pode ser tóxico ou inócuo. Uma aplicação que tem merecido destaque é a utilização de lipases para obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica (CARVALHO et al., 2005).

As lipases apresentam aplicações promissoras em processamentos químicos orgânicos, formulação de detergentes, síntese de biosurfactantes, indústria óleo-química, indústria de laticínios, fabricação de papel, nutrição, cosméticos, e processamentos farmacêuticos. O desenvolvimento de tecnologias baseadas em lipases para síntese de novos compostos está rapidamente expandindo o uso destas enzimas. A maior aplicação comercial para as lipases hidrolíticas está no seu uso em produtos de lavagem de roupa. Este mercado chega a 32% de todas as vendas de lipases. A lipase para esse fim deve ser termoestável e permanecer ativa no ambiente alcalino típico de uma máquina de lavar. Estima-se que 1000 toneladas de lipase são adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas destes produtos todos os anos (SHARMA et al., 2001).

As lipases apresentam um grande potencial para melhorar os aspectos nutricionais de óleos vegetais, porque podem ser usadas para aumentar o conteúdo de ácidos graxos, tais como o ácido linolênico, que são geralmente benéficos para a saúde humana. Também

podem ser usadas para modificar pontos de fusão, solubilidade, e outras propriedades físicas de óleos comestíveis (JOHSON-GREEN, 2002).

Os ácidos mais importantes contidos nos óleos marinhos são o eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), que apresentam aplicações terapêuticas no tratamento de enfermidades inflamatórias auto-imunes e doenças cardiovasculares, e não podem ser obtidos por métodos convencionais de aquecimento, sem sofrer uma decomposição substancial. Da mesma forma, o ácido  $\gamma$ -linolênico, um importante produto nutricional encontrado em sementes oleaginosas, pode ser obtido pela hidrólise catalisada por lipases sob condições moderadas de temperatura (CASTRO et al., 2004).

Segundo Carvalho et al. (2003), a reação de interesterificação tem demonstrado aumentar significativamente os níveis de AGPI (ácidos graxos poliinsaturados) nos acilgliceróis resultantes. A obtenção de acilgliceróis contendo 70% de AGPI  $\omega$ 3, em especial ácido docosaexaenóico (DHA) 48% e ácido eicosapentaenóico (EPA) 12%, foi realizada via interesterificação de óleo de fígado de bacalhau e concentrados de AGPI livres, ou seus ésteres, catalisada por lipase imobilizada *Mucor miehei*. A mesma enzima foi utilizada para obtenção de óleo de sardinha contendo 25% de EPA e 40% de DHA após acidólise entre o óleo de sardinha e AGPI livres na ausência de solventes.

Ressalta-se também a potencialidade do emprego da interesterificação catalisada por lipases na síntese de lipídeos estruturados. Óleos e gorduras estruturados são produtos que contêm triglicerídeos sintetizados artificialmente com o objetivo de alterar as concentrações relativas de seus ácidos graxos constituintes assim como a posição, no esqueleto de glicerol, que cada grupo acil ocupa. Este tipo de produto apresenta vantagens do ponto de vista funcional e/ou nutricional sobre os óleos e gorduras naturais. A obtenção de triglicerídeos estruturados é feita através de interesterificação química ou enzimática entre dois diferentes óleos ou entre óleo e ácidos graxos livres ou na forma metilada. A síntese química, embora seja uma tecnologia há muito dominada pela indústria, apresenta várias desvantagens em relação ao processo enzimático: obtenção de produtos inespecíficos, uso de altas temperatura e pressão – o que gera subprodutos de cor e odor indesejáveis e implica em várias etapas de purificação subseqüentes. O uso de enzimas 1,3-específicas garante a obtenção de produtos específicos de acordo com os substratos utilizados o que vem a ser de grande importância na aplicação funcional e nutricional dos triglicerídeos estruturados (CASTRO et al., 2004).

O caso mais clássico de obtenção de triglicerídeos estruturados é o da produção de equivalentes de manteiga de cacau. Esta gordura vegetal tem características funcionais específicas (principalmente ponto de fusão) extremamente interessantes para aplicação em alimentos. A instabilidade dos preços e do fornecimento deste produto no mercado internacional levou ao interesse na produção artificial do mesmo. A manteiga de cacau é constituída principalmente pelos seguintes triglicerídeos: POP, POSt e StOSt (P=palmítico; O=oléico; St=esteárico), que juntos correspondem a quase 80% da composição da gordura. Partindo-se de um óleo que contenha principalmente ácido oléico na posição 2 é possível, na presença de lipases 1,3-específicas mimetizar esta composição com bastante sucesso (CASTRO et al., 2004).

A aplicação de lipases tem sido também preconizada na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral (SHARMA et al, 2001; HASAN, et al., 2006). Estas indústrias produzem um elevado teor de resíduos líquidos e sólidos, com odores desagradáveis, que prejudicam intrinsecamente e extrinsecamente as unidades industriais. Além disso, esses resíduos contêm elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Neste contexto, processos alternativos que visam a recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de extremo interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídeos, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (CASTRO et al., 2004).

Técnicas para melhorar a eficiência dos biodigestores vêm sendo empregadas, como tratamentos com adição de álcalis ou enzimas específicas, como as lipases, cuja função biológica é a hidrólise de ligações éster carboxílicas, presentes em acilgliceróis, com conseqüente liberação de ácidos graxos e glicerol. A adição da enzima lipase pode aumentar significativamente a eficiência deste processo, reduzindo os impactos ambientais gerados sobre os recursos hídricos, considerados atualmente como um recurso natural limitado, dotado de valor econômico. O emprego dessa técnica permite uma redução dos níveis de sólidos suspensos e lipídeos, o que possibilita melhores condições de operação no tratamento anaeróbio. Outra grande vantagem em se utilizar enzimas hidrolíticas, especificamente lipases, é a desobstrução de filmes de óleos em tubulações, resultando no aumento da vida útil dos equipamentos (MENDES et al., 2005).



Na indústria de polpa de papel o depósito de resina sobre os cilindros de secagem é, em muitos casos, um problema sério que diminui a qualidade do papel e a produtividade. O tratamento da polpa com lipase permite uma considerável melhora na produtividade com aumento da qualidade (SHARMA et al., 2001; HASAN et al., 2006).

Devido à grande versatilidade das lipases, essas enzimas têm sido aplicadas em processos biotecnológicos para produção de compostos de interesse industrial e de química fina. As reações de síntese catalisadas por lipases requerem uma quantidade reduzida de água em vez de sistemas anidros, pois a água é essencial para a catálise enzimática, devido à contribuição para as ligações não covalentes e pontes de hidrogênio, preservando a estrutura protéica. A quantidade de água influencia na solubilidade do substrato e dos produtos, causando efeito sobre a posição de equilíbrio e rendimento químico (SHARMA et al., 2001).

Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora, conforme atestam os processos em fase de implantação industrial (CASTRO et al., 2004).

Industrialmente, a esterificação por lipase foi comercializada pela Unichema International para produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza e qualidade, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato, que são ingredientes empregados na formulação de cremes, cosméticos e outros produtos de higiene. O processo em questão foi conduzido em reatores agitados, utilizando lipase imobilizada numa temperatura entre 50-70 °C. A água gerada durante a reação de esterificação foi removida por destilação a vapor. O processo permitiu a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subseqüentes (CASTRO et al., 2004).

Lipases também podem catalisar a síntese de ésteres de poliglicerol. Esses tipos de ésteres são ingredientes multifuncionais, sendo usados como emulsificantes, substitutos de gorduras, como meio de solubilização de vitaminas lipossolúveis para facilitar a incorporação destas em sistemas lipofóbicos. Podem ser utilizados em sorvetes, margarinas, coberturas, sobremesas e produtos de panificação (CASTRO et al., 2004).

Outras novas aplicações biotecnológicas das lipases estabelecidas com sucesso são a síntese de biopolímeros e de biodiesel (JAEGER & EGGERT, 2002).

Biopolímeros como polifenóis, polissacarídeos e poliésteres apresentam um alto grau de diversificação e complexidade. Além disso, estes compostos estão recebendo cada vez mais atenção por serem biodegradáveis e produzidos a partir de fontes naturais renováveis. As lipases e esterases são usadas como catalisadores de sínteses poliméricas (JAEGER & EGGERT, 2002).

O biodiesel é uma fonte alternativa de energia para transporte público, que tem sido produzida quimicamente usando-se óleos de várias plantas. O biodiesel é originário de fontes naturais renováveis e, ao mesmo tempo, reduz a produção de óxidos de enxofre. A conversão dos óleos vegetais para ésteres metílicos ou de outros álcoois de cadeia curta pode ser catalisada por uma única reação de transesterificação empregando lipase em solventes orgânicos (JAEGER & EGGERT, 2002; GHAMGUI, et al., 2004).

O uso de lipases para produção de biodiesel é de relevante importância, considerando-se o crescimento da utilização desse biocombustível em âmbito mundial, não somente pelo aspecto de meio ambiente, mas principalmente, por se tratar de uma fonte de energia renovável (CASTRO et al., 2004, HASAN, et al., 2006).

O diesel é constituído de hidrocarbonetos com número médio de carbonos em torno de quatorze. Os óleos vegetais são triésteres da glicerina, ou seja, produtos naturais da condensação da glicerina com ácidos graxos, cujas cadeias laterais de ácidos graxos têm número de carbonos variando entre dez e dezoito, com valor médio de quatorze, para os óleos mais abundantes. Além da presença do grupamento funcional do tipo éster, os óleos vegetais possuem peso molecular cerca de três vezes maior que o diesel (CASTRO et al., 2004).

Visando reduzir a alta viscosidade dos óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição; microemulsão com metanol ou etanol; decomposição térmica; craqueamento catalítico e reação de interesterificação com etanol ou metanol. Entre essas alternativas, a interesterificação é a melhor escolha, particularmente com monoálcoois (alcoólise), especificamente metanol ou etanol, promovendo a quebra da molécula dos triglicerídios, gerando mistura de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos correspondentes, liberando glicerina como subproduto (CASTRO et al., 2004).

Os ésteres de ácidos graxos obtidos são conhecidos como biodiesel e apresentam características físicas semelhantes às do óleo diesel, podendo ser utilizados em motores do ciclo diesel sem nenhuma adaptação (CASTRO et al., 2004, HASAN, et al., 2006).

O metanol é o álcool comumente usado nas reações de transesterificação catalisadas por álcalis, ácidos e enzimas (FUKUDA et al, 2001). Entretanto, no contexto brasileiro, o etanol tem força natural desde que o Brasil se tornou o maior produtor mundial, com uma tecnologia de produção bem estabelecida, grande capacidade industrial, com plantas instaladas em todo país e devido ao fato de que o etanol é obtido de um recurso renovável.

A biotransformação tem demonstrado ser uma ferramenta útil e competitiva para processos em escala industrial e para síntese orgânica. A principal razão de introduzir a biotransformação num processo de síntese orgânica é devido ao controle de tipo régio-seletivo e estéreo-seletivo que se podem realizar nos passos onde se utilizam enzimas como biocatalisadores. Estudos têm demonstrado a possibilidade de uso de um método alternativo para a produção de ésteres através de enzimas, tais como lipases (FEVRIER et al., 2001).

Segundo Cardenas et al. (2001) o maior interesse das lipases em síntese orgânica é sua habilidade de atuar em meio orgânico e sua especificidade por substratos, muitas vezes, substratos não naturais. A esterificação de ácido oléico com heptanol (síntese do heptil oleato) pode ser considerada como uma reação padrão para verificar a atividade das lipases em meio orgânico. Esta reação é utilizada para diferenciar lipases (atividade biocatalítica), esterases (baixa atividade biocatalítica) e proteases (sem atividade biocatalítica).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas 372 leveduras selvagens isoladas de amostras de solo, caules, frutos e principalmente flores colhidas de diversas regiões brasileiras, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Regiões nas quais foram isolados os microrganismos.

REGIÕES	LOCAL DE ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS
Mata Atlântica (SP)	I - Vegetação litorânea (município de Bertioga) II - Vegetação da Serra do Mar (município de São Sebastião)
Cerrado (GO)	Vegetação da “Chapada dos Veadeiros”
Pantanal (MT)	Vegetação ciliar e de várzeas do Rio Paraguai (município de Cáceres)
Floresta Amazônica (AM)	Vegetação de matas parcialmente influenciadas pelo homem (regiões circunvizinhas de Manaus)
Outros	Resíduo de Queijo e Xarope

Todas as culturas estão armazenadas no banco de culturas do Laboratório de Bioprocessos (LEB) – FEA/UNICAMP.

### 4.2 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASE

#### 4.2.1 Cultivo em Meio Sólido

Segundo método descrito por Freire (1996), as cepas de leveduras produtoras de lipase foram selecionadas através da formação de um halo transparente (zona opaca) ao redor das colônias quando cultivadas em placas contendo 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura, 2% de ágar e 0,1% de tributirina, pH 6,0 a temperatura de 30°C por 48 horas.

Após 48 horas de incubação, as placas com meio foram analisadas com o seguinte critério visual: produziram halo, não produziram halo, produziram halo grande, médio ou pequeno. Na Figura 2 é possível visualizar o halo de hidrólise formado ao redor das colônias de leveduras produtoras de lipase.

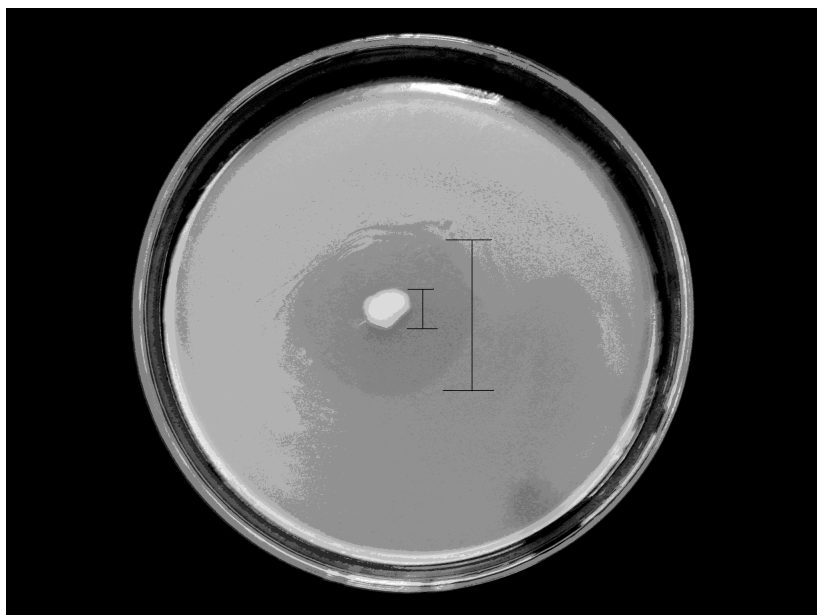


Figura 2. Halo de hidrólise formado ao redor das colônias de leveduras produtoras de lipase.

### 3.2.2 Cultivo em Meio Líquido

Depois de pré-selecionadas as leveduras produtoras de lipase, que apresentaram maior halo de hidrólise quando cultivadas em placas, as cepas foram então inoculadas em meio líquido contendo: 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura e 1% de óleo de oliva, pH 6,0, temperatura de 30°C durante 48 horas sob agitação de 150 rpm (FREIRE, 1996). Foram retiradas amostras nos tempos 0h, 12h, 24h, 36h e 48h de fermentação e posteriormente foi determinada a atividade lipolítica da enzima. As leveduras que apresentaram maiores atividades lipolíticas foram então selecionadas.

Após a seleção das leveduras (maior atividade lipolítica), estas foram novamente cultivadas em meio líquido citado anteriormente e paralelamente em meio líquido enriquecido contendo 5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura, 0,1% de sulfato de magnésio, 0,1% de nitrato de sódio, e 1% de óleo de oliva, ambos a pH 6,0, temperatura 30°C durante 48

horas e sob agitação de 150 rpm. Nos tempos 0h, 12h, 24h, 36h e 48h de fermentação foram retiradas amostras e posteriormente foi determinada a atividade lipolítica.

Esta etapa foi realizada para verificar um possível incremento da atividade lipolítica com o enriquecimento do meio de cultura quando comparado com o meio utilizado inicialmente (não enriquecido).

## **4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA**

### **4.3.1 Método Tilulométrico**

A atividade lipolítica foi determinada de acordo com o método descrito por Freire et al. (1997). O método é baseado na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no caldo fermentado bruto, sobre os triglicerídeos de óleo de oliva emulsionados em goma arábica.

Em frascos de 100 mL foram adicionados 19 mL de emulsão (5% de goma arábica e 5% de óleo de oliva) em tampão fosfato 100 mM pH 7,0. A esta mistura foi adicionado 1 mL do caldo fermentado contendo a enzima, incubando-se 30 minutos a 37°C. A reação foi paralisada com adição de 20 mL de solução acetona/etanol 1:1 v/v e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,05 N até pH final 11. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

### **4.3.2 Método Espectrofotométrico**

Este método baseia-se na hidrólise do p-nitrofenilpalmitato (pNPP) em p-nitrofenol (pNP) e ácido palmítico (KAMIMURA, 2000). A liberação do p-nitrofenol foi detectada espectrofotometricamente a 410 nm. Uma unidade de atividade foi definida como sendo 1  $\mu$ mol de pNP liberado do substrato pNPP / (mL.min).

Soluções utilizadas:

- Tampão Tris hidroximetilmetano em HCl-TRIS/HCl 50 mM a pH 8;
- Solução A: 27 mg de pNPP em 9 mL de isopropanol;

- Solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica dissolvidos em 450 mL de tampão TRIS/HCl. Estável por 6 semanas a temperatura de 4°C;
- Substrato: Sob agitação foi adicionado 1 mL da solução A em 9 mL da solução B;
- Mistura da reação: Foi adicionado 0,35 mL de solução enzimática em 3,15 mL de substrato em uma cubeta de vidro. Foram realizadas várias leituras até 30 minutos de reação em um espectrofotômetro a 410 nm;
- Branco: Foi adicionado 0,35 mL de tampão TRIS/HCl em 3,15 mL de substrato em uma cubeta de vidro.

Para a construção da curva padrão de p-nitrofenol foram utilizadas diferentes concentrações de p-nitrofenol em isopropanol. A mistura da reação foi realizada como descrito na metodologia citada acima, mas trocando a solução enzimática pelo tampão TRIS/HCl.

#### **4.4 PROCESSO FERMENTATIVO – CONTROLE ANALÍTICO**

Nas fermentações realizadas em meio líquido foram controlados as respostas fisiológicas dos microrganismos em estudo, através da metodologia de determinação de atividade lipolítica, medida de pH, concentração celular e determinação de proteína, conforme descritas a seguir. As amostras foram retiradas após 0h, 12h, 24h, 36h e 48h de cultivo, centrifugadas à 5000 rpm durante 10 minutos, e o sobrenadante foi submetido à diferentes determinações analíticas.

##### **4.4.1 Determinação da Atividade Lipolítica**

A atividade lipolítica foi determinada por dois métodos analíticos, sendo um titulométrico e outro espectrofotométrico, conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2.

##### **4.4.2 Medida de pH**

O pH foi medido em potenciômetro digital modelo Mettler Toledo 320, de modo a avaliar o perfil de variação do pH ao longo do tempo de cultivo.

#### **4.4.3 Concentração Celular**

As amostras coletadas foram diluídas em água e foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 600 nm. Após o término das fermentações, um volume conhecido do caldo fermentado foi centrifugado e a massa celular foi lavada com água destilada e seca em estufa numa placa de Petri, cujo peso inicial era conhecido, à 75°C até atingir peso constante (FREIRE et al., 1997).

#### **4.4.4 Determinação de Proteína**

A determinação da concentração de proteína no caldo fermentado centrifugado foi realizada através do Método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

### **4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LIPASE**

As enzimas selecionadas foram caracterizadas quanto ao perfil de temperatura e pH e estabilidade térmica e de pH.

#### **4.5.1 Perfil de Temperatura e pH**

O perfil de temperatura e pH na reação enzimática foi determinado através da atividade lipolítica descrita no item 4.3.1, utilizando planejamento experimental como ferramenta para a realização do estudo.

Esta metodologia permite uma direção às condições ótimas de operação muito mais rapidamente através do planejamento experimental do que a análise convencional univariável e permite avaliar os dados estatisticamente fornecendo confiabilidade nos resultados obtidos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Foi realizado um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com 2 variáveis (temperatura e pH) para os 3 microrganismo selecionados. A faixa de temperatura estudada variou de 27º à 47ºC e o pH variou de 5,2 à 8,0 conforme pode ser visualizado na Tabela 4.



Tabela 4. Valores utilizados no DCCR para determinação do pH e temperatura ótimas.

Níveis	- 1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	27	30	37	44	47
pH	5,2	5,6	6,6	7,6	8,0

#### 4.5.2 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da enzima foi realizada em termos de tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), incubando-se 15 mL do caldo fermentado livre de células em 15 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,0 ou 6,6 (conforme pH ótimo do microrganismo estudado), nas temperaturas de 30, 37, 45, 50 e 55°C (BURKERT, 2003). Foi determinada a atividade lipolítica, ao longo do tempo, utilizando o método descrito no item 4.3.1.

##### 4.5.2.1 Determinação da Constante de Desnaturação ( $K_d$ )

Os logaritmos naturais da atividade relativa  $U/U_0$  (atividade lipolítica em um determinado ponto  $U$ , dividida pela atividade lipolítica inicial  $U_0$ ) obtidos ao longo da estabilidade térmica item 4.5.2, foram plotados em função do tempo (minutos) para a realização do cálculo de  $K_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ). A regressão linear obtida dos dados experimentais obedece a Equação 01 e o valor da inclinação da reta equivale a constante  $K_d$  na temperatura avaliada.

$$\ln (U/U_0) = - K_d \cdot t + C_1 \quad (\text{Eq. 01})$$

Onde:  $\ln$  = logaritmo natural;  $U/U_0$  = atividade relativa;  $K_d$  = constante de desnaturação ( $\text{min}^{-1}$ );  $t$  = tempo (min).

#### 4.5.2.2 Determinação da meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ )

Uma vez determinado o valor de  $K_d$  (item 4.5.2.1) foi possível determinar a meia vida da enzima. Para a determinação da meia vida foi utilizada a Equação 02.

$$t_{1/2} = - \ln (0,5) / K_d \quad (\text{Eq. 02})$$

Onde:  $t_{1/2}$  = tempo de meia vida (min);  $\ln$  = logaritmo natural;  $K_d$  = constante de desnaturação ( $\text{min}^{-1}$ ).

#### 4.5.2.3 Determinação da Energia de Ativação da Desnaturação ( $E_{ad}$ )

Os valores de  $K_d$  obtidos segundo o item 4.5.2.1 foram linearizados de acordo com a metodologia proposta por Arrhenius na forma de  $\ln (K_d)$  versus  $1/T \cdot 10^3$ . A regressão linear obtida obedece a Equação 03, e o valor da inclinação desta equação foi multiplicado pela constante R (1,98 cal/mol.K) obtendo dessa forma o valor de  $E_{ad}$  expresso em Kcal/mol já que o eixo X está numa escala  $10^3$ .

$$\ln K_d = \ln K - E_{ad} / R.T \quad (\text{Eq. 03})$$

Onde:  $K_d$  = constante de desnaturação ( $\text{min}^{-1}$ );  $K$  = constante de Arrhenius;  $E_{ad}$  = energia de ativação de desnaturação (Kcal/mol);  $R$  = constante universal dos gases perfeitos (cal/mol.K);  $T$  = temperatura (K).

#### 4.5.3 Estabilidade de pH

A estabilidade da enzima em relação ao pH foi realizada em termos de tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), incubando-se 15 mL do caldo fermentado livre de células em 15 mL de tampão fosfato 100 mM em diferentes valores de pH (5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 8,0) nas temperaturas, 37, 44 e 47°C (conforme temperatura ótima do microrganismo estudado). Foi

determinada a atividade lipolítica, ao longo do tempo, utilizando o método descrito no item 4.3.1.

#### **4.5.3.1 Determinação da Constante de Desnaturação ( $K_d$ )**

A constante de desnaturação ( $K_d$ ) também foi determinada conforme o item 4.5.2.1 para os diferentes valores de pH estudados para posterior determinação do tempo de meia vida.

#### **4.5.3.2 Determinação da meia vida ( $t_{1/2}$ )**

A meia vida foi determinado conforme item 4.5.2.2 para os diferentes valores de pH estudados.

### **4.6 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE SUBSTRATO**

A especificidade de substrato da enzima lipase foi realizada através da determinação da atividade lipolítica (item 4.3.1) utilizando 56 mM de triglicerídeos ( $C_4$ ,  $C_8$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{18:1}$ ) como substratos (GUPTA et al., 2002; CASTRO-OCHOA et al., 2005). A atividade relativa foi calculada em relação a atividade lipolítica padrão, que utiliza óleo de oliva como substrato.

### **4.7 SÍNTESE DE ÉSTERES EM MEIO ORGÂNICO**

Para verificar a capacidade biocatalítica das lipases, foi realizada síntese de ésteres em meio orgânico (esterificação). Duas reações foram estudadas, a produção de heptil oleato e etil oleato na presença de solvente orgânico (isooctano).

#### **4.7.1 Síntese de Heptil Oleato**

A síntese do heptil oleato foi realizada para verificar a atividade catalítica das lipases na síntese de ésteres em meio orgânico. A mistura reacional foi composta de 20 mM de

ácido oléico, 20 mM de 1-heptanol, 3 mL de isooctano, e 100 mg de caldo fermentado liofilizado (enzima). A reação ocorreu à temperatura de 30°C com agitação vigorosa durante 24 horas. Amostras de 50 µL foram retiradas após 24 horas de reação e foram diluídas em 500 µL de isooctano. Os ésteres formados durante a reação foram quantificados por cromatografia gasosa em CG: VARIAN 3300, coluna Carbowax (30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm espessura de filme, J&W Scientific, Folsom Califórnia, USA). A temperatura do injetor foi 230°C, modelo de injeção razão split (1:10), volume injetado de 1µL, e temperatura do detector (FID) 250°C. Temperatura inicial foi de 40°C por 2 minutos passando a 220°C a 10°C/min, e a temperatura final mantida por 10 minutos. O 1-octanol foi utilizado como padrão interno (CARDENAS et al., 2001; CASA et al., 2006).

#### **4.7.2 Síntese de Etil Oleato**

A mistura reacional foi composta de 20 mM de ácido oléico, 20 mM de etanol, 3 mL de isooctano e 100 mg de caldo fermentado liofilizado (enzima). A reação ocorreu à temperatura de 30°C com agitação vigorosa durante 24 horas. Amostras de 50 µL foram retiradas após 24 horas de reação e foram diluídas em 500 µL de isooctano. Os ésteres formados durante a reação foram quantificados por cromatografia gasosa em CG: VARIAN 3300, coluna Carbowax (30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm espessura de filme, J&W Scientific, Folsom Califórnia, USA) conforme metodologia descrita anteriormente.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASE**

Para a seleção de leveduras produtoras de lipase, foram estudadas 372 cepas de leveduras silvestres isoladas de diferentes regiões do país. Primeiramente foi realizada uma pré-seleção em meio sólido e posteriormente as cepas selecionadas foram cultivadas em meio líquido.

#### **5.1.1 Seleção em Meio Sólido**

O uso de meios sólidos suplementados com triglicerídeos emulsificados é uma metodologia padrão para a seleção de microrganismos produtores de lipases, sendo freqüentemente utilizado a tributirina como substrato, que apresenta como indicativo de produção de lipase a presença de zonas transparentes ao redor das colônias (CARDENAS et al., 2001).

Um total de 372 leveduras isoladas de diversas regiões do país como: Cerrado, Pantanal, Floresta Amazônica, Mata Atlântica I (Vegetação Litorânea), Mata Atlântica II (Vegetação da Serra do Mar) e resíduos de queijo e xarope foram inoculadas em meio sólido para a seleção de microrganismos produtores de lipase. Estas foram pré-selecionadas através da formação de um halo transparente (quebra da emulsão) ao redor das colônias. Após 48 horas de incubação, as placas com meio foram analisadas com o seguinte critério visual: produziram halo, não produziram halo, produziram halo grande, médio ou pequeno.

A Tabela 5 apresenta os resultados encontrados na pré-seleção das leveduras cultivadas em meio sólido para as diferentes regiões do país. Das 372 leveduras estudadas, 207 apresentaram halo de hidrólise ao redor das colônias, representando 55,65% do total dos microrganismos inoculados como indicativo de produção de lipase. Estes 55,65% dos microrganismos que produziram halo podem ter sido induzidos pela tributirina presente no meio (neste caso utilizada como substrato). As leveduras que apresentaram halo foram subdivididas visualmente na presença de halo pequeno, médio e grande. Tendo destaque um total de 44 microrganismos que apresentaram os maiores halos.

Tabela 5. Critério de seleção das leveduras potencialmente produtoras de lipase nas diferentes regiões do país.

Regiões	Total MO	Não Produziram Halo	Produziram Halo	Halo Grande	Halo Médio	Halo Pequeno
Cerrado	120	52	68	10	36	22
Pantanal	34	16	18	3	12	3
Floresta Amazônica	80	64	16	4	7	5
Mata Atlântica I	94	23	71	20	22	29
Mata Atlântica II	42	9	33	6	9	18
Resíduo (Queijo e Xarope)	2	1	1	1	0	0
<b>Total</b>	<b>372</b>	<b>165</b>	<b>207</b>	<b>44</b>	<b>86</b>	<b>77</b>

Estes resultados podem ser melhor visualizados nas Figuras 3, 4, 5, 6 , 7 e 8 que apresentam o comportamento dos microrganismos de cada região do país estudada.

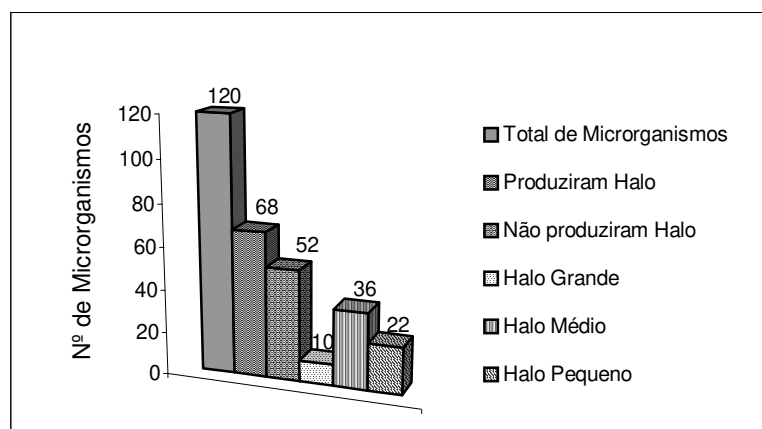


Figura 3. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região do Cerrado.

Das 120 leveduras isoladas na região do Cerrado, 56,67% apresentaram halo de hidrólise (68 microrganismos), indicando que estes microrganismos produziram lipase. Destes 68 microrganismos, 22 produziram halos pequenos, 36 halos médios e 10 apresentaram halos grandes.

A diferença de intensidade entre os halos pode ser provavelmente explicada devido à quantidade de lipase extracelular excretada pelo microrganismo, e ou também pela estabilidade da enzima (CARDENAS et al., 2001). Nesta região, foram então selecionadas as 10 leveduras que apresentaram maiores halos para posteriores fermentações em meio líquido.

Na região do Pantanal (Figura 4), dos 34 microrganismos isolados, 18 produziram halo, representando um total 52,94% de microrganismos produtores nesta região. Entre as leveduras produtoras de lipase, 3 apresentaram halos pequenos, 12 halos médios e 3 halos grandes, quando cultivadas em meio sólido. As 3 leveduras que apresentam maiores halos foram selecionadas para a etapa seguinte do trabalho.

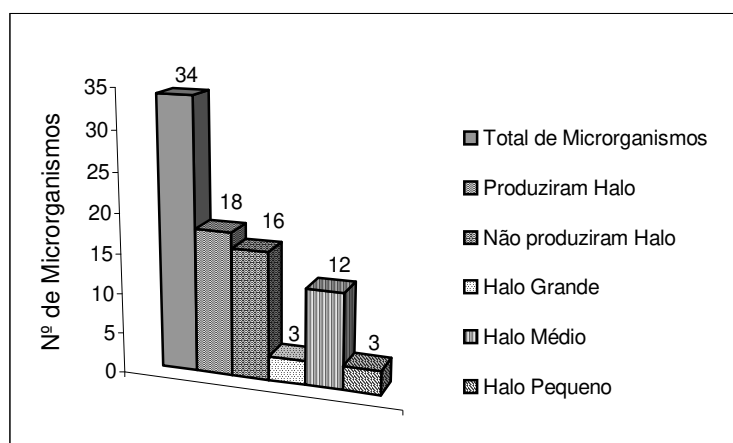


Figura 4. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região do Pantanal.

A Figura 5 apresenta o comportamento dos microrganismos isolados da Floresta Amazônica, onde se verifica que das 80 leveduras estudadas desta região, apenas 16 (20%) apresentaram halos de hidrólise ao redor das colônias. E destas 16 leveduras que apresentaram halos, 4 foram selecionadas para a seguinte etapa do trabalho devido a presença de halos grandes. Zanotto et al. (2007) estudaram 90 fungos isolados de plantas da região amazônica. Destes, 78 foram selecionados por apresentarem halos de hidrólise ao redor das colônias, no entanto somente 25 apresentaram bom crescimento em meio líquido.

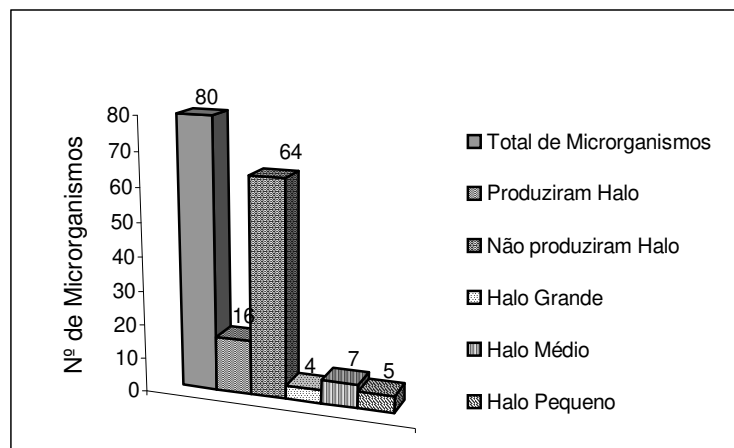


Figura 5. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região da Floresta Amazônica.

Em relação a Mata Atlântica I (Figura 6) das 94 leveduras estudadas, 71 apresentaram halos transparentes ao redor das colônias, indicando produção de lipase. Destas 71 leveduras, 20 apresentaram halos grandes, 22 halos médios e 29 halos pequenos. As 20 cepas que apresentaram maiores halos foram pré-selecionadas e cultivadas em meio líquido.

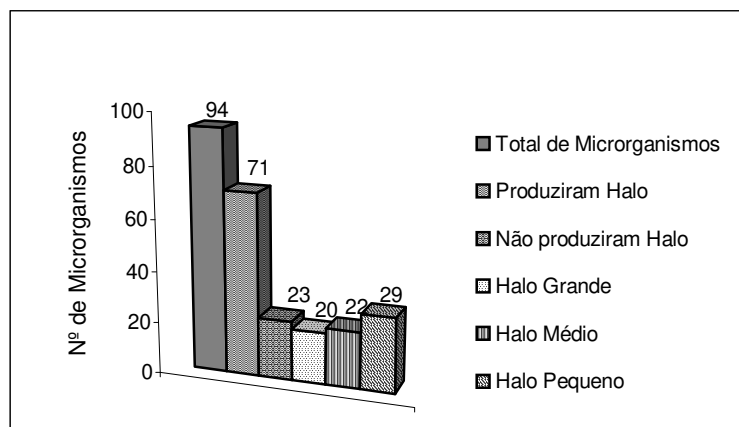


Figura 6. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região da Mata Atlântica I.

A Mata Atlântica II (Figura 7), região que compreende 42 leveduras silvestres foi a região que apresentou a maior porcentagem de microrganismos produtores de lipase (78,57%), correspondendo 33 microrganismos que apresentaram halos de hidrólise em meio sólido, sendo que destes, 18 produziram halos pequenos, 9 halos médios e 6 apresentaram



halos grandes. As leveduras que produziram maiores halos de hidrólise foram cultivadas em meio líquido para posterior determinação da atividade lipolítica.

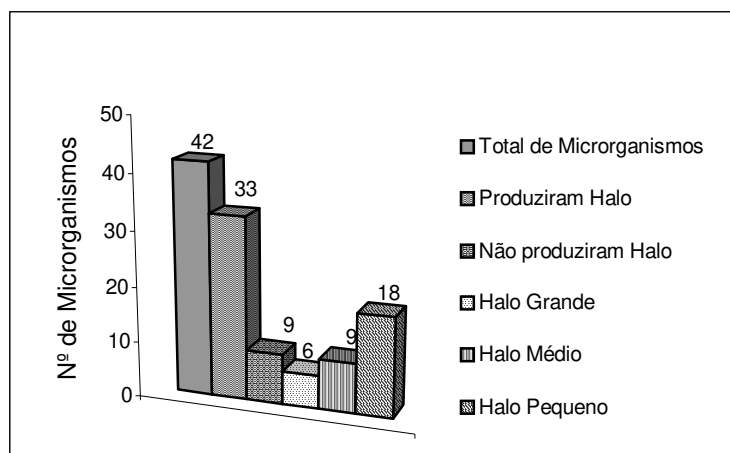


Figura 7. Produção de lipase pelas leveduras isoladas na região da Mata Atlântica II.

Além das 5 regiões estudadas, 2 cepas de leveduras foram isoladas de resíduo de queijo e xarope e também foram cultivadas em meio sólido para verificar a presença ou ausência de halo ao redor das colônias. Conforme a Figura 8, das 2 leveduras inoculadas, apenas a cepa isolada do resíduo de queijo apresentou halo ao redor das colônias, sendo este de espessura bastante significativa.

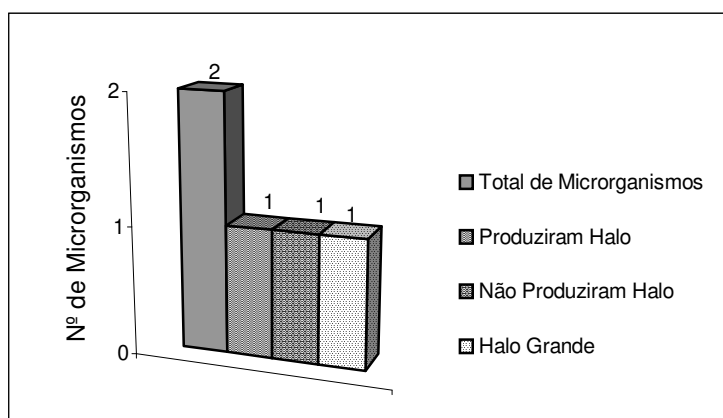


Figura 8. Produção de lipase pelas leveduras isoladas de resíduo de queijo e xarope.

Nesta etapa de seleção em meio sólido, das 372 leveduras estudadas inicialmente foi possível pré-selecionar 44 cepas, que apresentaram os maiores halos de hidrólise ao redor das colônias quando cultivadas em placas, sendo 10 leveduras isoladas da região do Cerrado,

3 do Pantanal, 4 da Floresta Amazônica, 20 da Mata Atlântica I, 6 da Mata Atlântica II e uma cepa isolada do resíduo de queijo. Freire (1996) também utilizou este critério de pré-seleção de microrganismos em meio sólido, selecionando apenas as cepas que apresentaram maiores halos para posteriores fermentações em meio líquido.

### 5.1.2 Seleção em Meio Líquido

A etapa seguinte do trabalho foi selecionar as leveduras pré-selecionadas em meio sólido (44 cepas), agora cultivadas em meio líquido durante 48 horas de fermentação. Foram realizadas tomadas de amostra em 0h, 12h, 24h, 36h e 48h de fermentação e posteriormente foi determinada a atividade lipolítica da enzima. Estes resultados estão expressos nas Figuras 9, 10, 11, 12 e 13 que apresentam os gráficos de atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as leveduras pré-selecionados. As leveduras estudadas foram nomeadas com letras e números aleatoriamente.

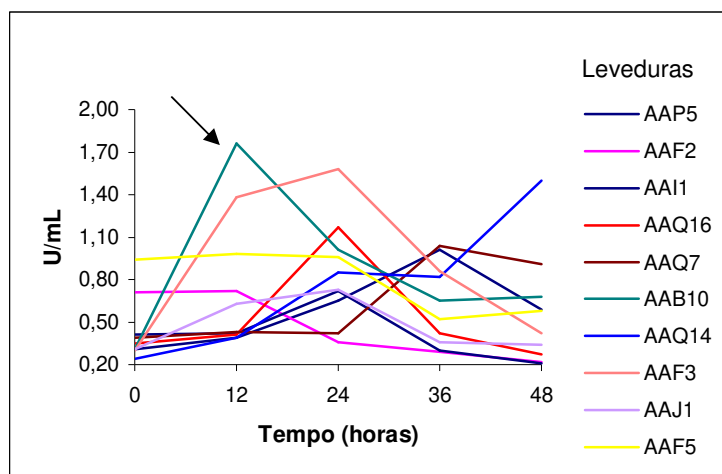


Figura 9. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 10 leveduras pré-selecionadas na região do Cerrado.

Conforme a Figura 9 verifica-se que a levedura nomeada como AAB10 foi a que apresentou maior atividade lipolítica (1,76 U/mL) logo nas primeiras 12 horas de fermentação dentre as 10 leveduras pré-selecionadas do Cerrado. Sendo selecionada como a levedura silvestre isolada na região do Cerrado como promissora fonte produtora de lipase.

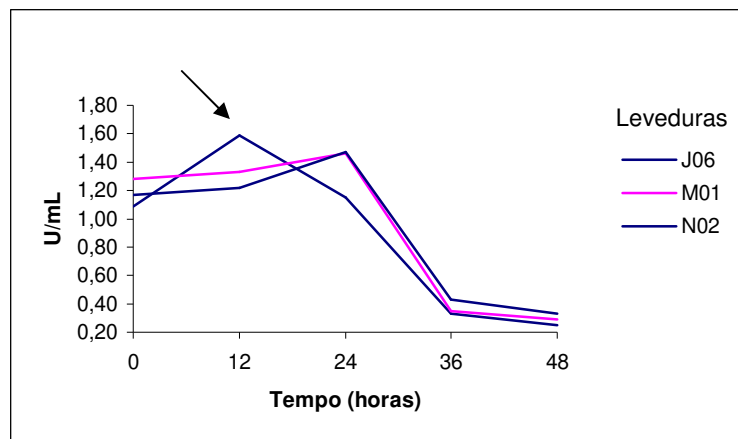


Figura 10. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 3 leveduras pré-selecionadas na região do Pantanal.

Em relação a região do Pantanal (Figura 10), dentre as 3 leveduras pré-selecionadas, destaca-se a cepa J06 que também apresentou a maior atividade lipolítica (1,59 U/mL) após 12 horas de fermentação. Segundo Cardenas et al. (2001) que estudou a seleção de cepas de fungos e leveduras produtoras de lipase, foram selecionados 14 microrganismos das 969 cepas microbianas isoladas. Dentre eles, *Arthroderma ciferi* foi quem apresentou a maior atividade lipolítica (1,43 U/mL) quando utilizado óleo de oliva como substrato e 1,89 U/mL quando utilizado a tributirina. Valores estes próximos aos valores de atividade encontrados para as cepas selecionadas da região do Cerrado e do Pantanal, onde também foi utilizado óleo de oliva como substrato.

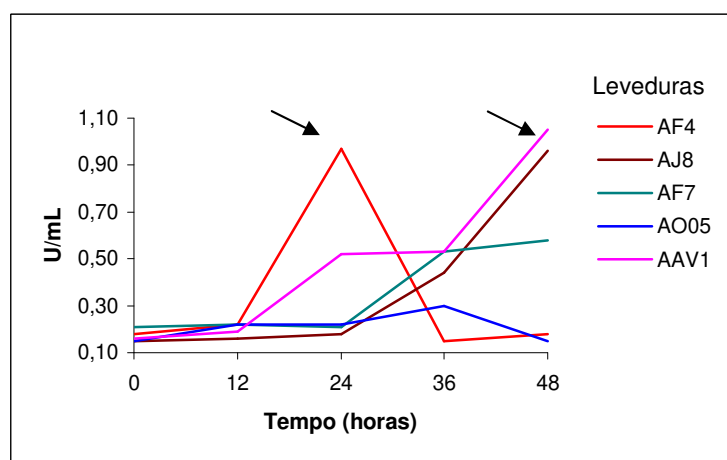


Figura 11. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 4 leveduras pré-selecionadas na região da Floresta Amazônica e 1 levedura isolada de resíduo de queijo.

A região da Mata Atlântica I foi a região estudada que apresentou maior número de microrganismos com potencial para produção de lipase. Sendo que das 20 cepas de leveduras pré-selecionadas em meio sólido, 5 tiveram destaque quanto a sua atividade lipolítica quando cultivadas em meio líquido. Conforme a Figura 12, as cepas T07 e AD12 apresentaram atividade lipolítica de 1,69 U/mL e 1,54 U/mL respectivamente após 12 horas de fermentação e as cepas U1, Z06 e AC02 apresentaram seus picos de atividade (1,53 U/mL, 2,05 U/mL e 1,92 U/mL respectivamente) após 24 horas de fermentação. Estes valores de atividades encontrados estão próximos aos registrados por Kartz et al. (1993), que utilizaram sistemas de fermentação de frascos agitados, e obtiveram atividades lipolíticas de 2,00 U/mL para os microrganismos *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus niger* quando determinadas as atividades em óleo de oliva EM temperatura de 37°C.

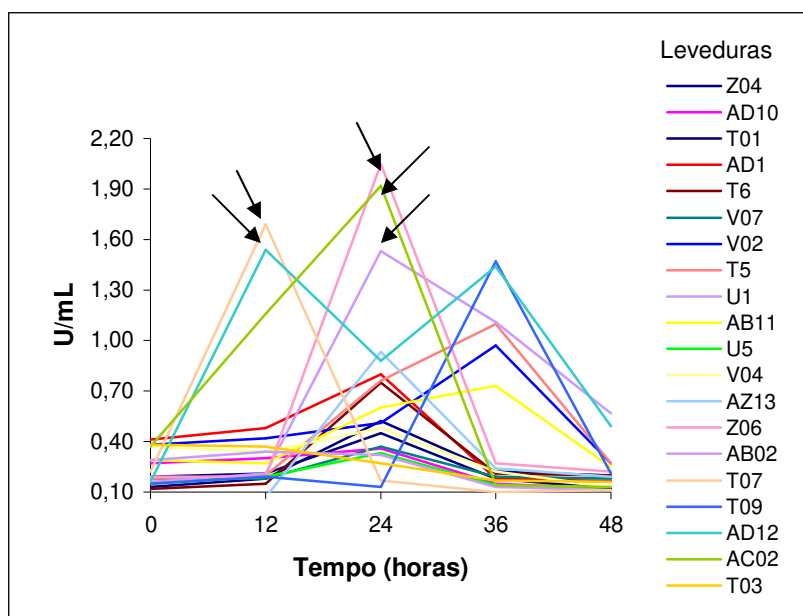


Figura 12. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 20 leveduras pré-selecionadas na região da Mata Atlântica I.

A Figura 13 apresenta os resultados de atividade lipolítica para as 6 leveduras pré-selecionadas em meio sólido da região da Mata Atlântica II. Analisando a Figura 13 é possível constatar que dentre as 6 leveduras silvestres pré-selecionada na região da Mata Atlântica II, 2 leveduras merecem destaque, a cepa AY3 que apresentou atividade lipolítica

máxima (1,81 U/mL) após 36 horas de cultivo e a cepa AY13 que registrou 1,95 U/mL também após 36 horas de fermentação.

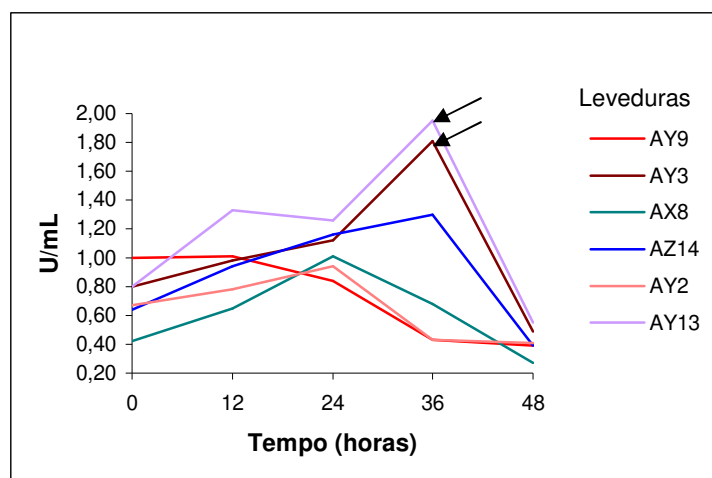


Figura 13. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 6 leveduras pré-selecionadas na região da Mata Atlântica II.

Realizada as fermentações em meio líquido, pôde-se selecionar 11 cepas de leveduras silvestres como sendo microrganismos com potencial para produção de lipase. Sendo 1 cepa da região do Cerrado, 1 da região do Pantanal, 1 da Floresta Amazônica, 1 de resíduo de queijo, 5 da Mata Atlântica I (vegetação litorânea) e 2 da região da Mata Atlântica II (vegetação da Serra do Mar). É importante salientar, que paralelamente foi realizado o cultivo de *Candida Lipolítica* CCT 6770, como microrganismo padrão, resultando em uma atividade lipolítica máxima de 2,17 U/mL após 12 horas de fermentação. Valores de atividades lipolíticas encontrados para os microrganismos selecionados apesar de não serem muito elevados estão bastante próximos ao valor encontrado para o microrganismo padrão, o que justifica assim a seleção destes microrganismos como produtores de lipase extracelular.

Na procura do aumento da produtividade de enzimas microbianas certamente a engenharia genética tem realizado importantes avanços com a obtenção de uma linhagem estável e excelente produtora de enzima, em estado selvagem, principalmente em países com grande biodiversidade como o Brasil. O aumento da produtividade de um microrganismo também pode ser atingido através de modificações no meio de cultura, condições e sistemas de produção, utilizando-se a cepa em estado selvagem (FREIRE, 1996).

A fim de melhorar os resultados de atividade encontrados para os microrganismos selecionados, as 11 cepas de leveduras silvestres selecionadas foram cultivadas novamente no meio de cultivo utilizado anteriormente (meio não enriquecido) e paralelamente num meio de cultivo enriquecido, onde se teve um aumento de 10 vezes na concentração de peptona utilizada no meio de cultura anterior (Figuras 14 e 15). Segundo Ohnishi et al. (1994), a produção de lipases fúngicas parece requerer altas concentrações de fonte de nitrogênio quando comparada à produção de outras enzimas. Dentre as principais fontes de nitrogênio citadas na literatura, a peptona vem sendo a mais utilizada.

Analisando a Figura 14 verifica-se que 4 microrganismos destacaram-se quando cultivados no meio não enriquecido, sendo eles: AC02, AAV1, AY3 com atividade registrada de 2,66 U/mL, 2,19 U/mL e 3,24 U/mL respectivamente após 24 horas de fermentação e AY13 com 2,27 U/mL após 36 horas de fermentação. Valores próximos e até mesmo superior aos encontrados para a *Candida Lipolítica* CCT 6770 (microrganismo utilizado como padrão) que nas mesmas condições apresentou atividade lipolítica de 2,90 U/mL após 24 horas de fermentação. Estes valores de atividades estão próximos aos citados por Cardenas et. al, 2001, que registraram atividades lipolíticas para as cepas fúngicas *Monascus mucoroides*, *Monascus sp.*, e *Fusarium oxysporum* de 3,02 U/mL, 2,35 U/mL, e 2,83 U/mL respectivamente quando utilizado óleo de oliva como substrato.

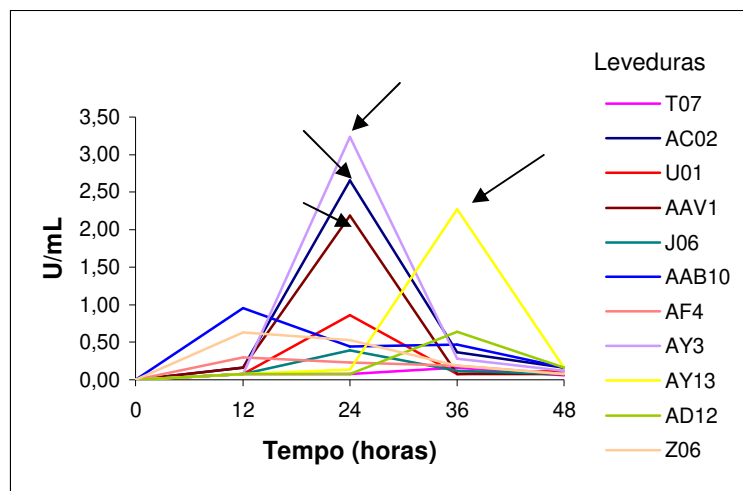


Figura 14. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 11 leveduras selecionadas quando cultivadas em meio não enriquecido.

Quando cultivados em meio enriquecido (Figura 15), também verifica-se que 4 cepas sobressaíram devido apresentarem as maiores atividades lipolíticas, sendo elas: T07 que apresentou atividade de 2,58 U/mL logo nas primeiras 12 horas de fermentação, AC02, U1, com atividade de 4,77 U/mL e 2,77 U/mL respectivamente após 24 horas de cultivo e a cepa AAV1 que após 36 horas de fermentação registrou atividade lipolítica de 2,88 U/mL. Já para a *Candida Lipolítica* CCT 6770 (microrganismos utilizado como padrão), foi registrada uma atividade de 5,28 U/mL após 24 horas de fermentação, quando cultivada no mesmo meio de cultivo e nas mesmas condições empregadas. De acordo com Maliszewska & Mastarlez (1992) o *Penicillium citrinum* registrou uma atividade lipolítica máxima de 4,80 U/mL quando cultivado em frascos agitados e determinada a atividade lipolítica em óleo de oliva, pH 7,0 e temperatura de 30°C.

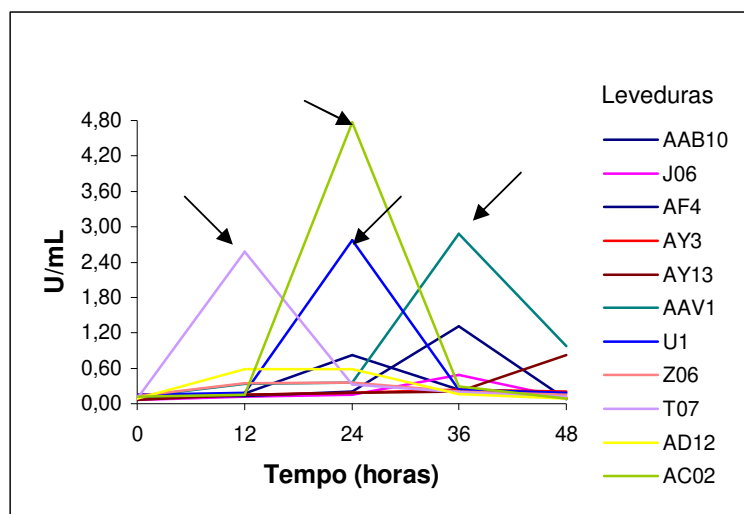


Figura 15. Atividade lipolítica em função do tempo de fermentação para as 11 leveduras selecionadas quando cultivadas em meio enriquecido.

Verifica-se que 2 cepas de leveduras destacaram-se em ambos os meios utilizados, por apresentarem as maiores atividade lipolíticas, sendo elas: AC02 e AAV1. Quando cultivada no meio não enriquecido a cepa nomeada AC02 apresentou máxima atividade de 2,66 U/mL após 24 horas de cultivo, esta atividade foi elevada no meio enriquecido após 24 horas de fermentação para 4,77 U/mL. Constata-se então que, para este microrganismo, o aumento do teor de peptona favoreceu a produção de enzima. Já para a cepa AAV1 também se obteve um aumento da atividade quando alterado o meio de cultivo, porém esta não foi

tão marcante, sendo registrada atividade de 2,19 U/mL após 24 horas de fermentação em meio não enriquecido e 2,88 U/mL após 36 horas de fermentação em meio enriquecido. Isto demonstra a influência significativa do meio de cultivo, que muitas vezes com o aumento de nutrientes favorece a produção de enzima, como também pode diminuir ou até inibir a produção da mesma, o que foi registrado para os demais microrganismos.

Além da composição do meio de cultura, outros fatores podem interferir na produção de enzimas, sendo eles: idade e concentração do inóculo, nível de aeração, agitação, pH e temperatura, que são parâmetros essenciais a serem investigados quando deseja-se aumentar a produtividade e conhecer mais profundamente a fisiologia do microrganismo produtor (Freire, 1996).

Através destes resultados pôde-se então selecionar 3 cepas de leveduras silvestres produtoras de lipase das 372 cepas iniciais estudadas. As cepas AC02 (Mata Atlântica I) e AAV1 (resíduo de queijo) que apresentaram elevadas atividades em ambos os meios de cultivo estudados. E também a cepa AY3 que apresentou a maior atividade registrada (3,24 U/ml) quando cultivada no meio não enriquecido após 24 horas de fermentação.

Após selecionadas 3 leveduras silvestres com potencial para produção de lipase, estas foram então caracterizadas. Para tanto, foi primeiramente acompanhado o processo fermentativo e após foram caracterizadas quanto a perfil de pH e temperatura, estabilidade térmica e de pH. Também foi realizada a determinação da especificidade de substrato das lipases e verificado a capacidade biocatalítica das enzimas através da síntese de ésteres em meio orgânico.

## **5.2 PROCESSO FERMENTATIVO**

Foram realizadas fermentações em meio líquido e controladas as respostas fisiológicas dos 3 microrganismos selecionados, sendo elas, atividade lipolítica, concentração celular, comportamento do pH e concentração de proteína.

Das 372 leveduras silvestres estudadas inicialmente, 3 microrganismos foram selecionados, sendo eles: AC02 e AAV1 que foram cultivados em meio enriquecido (aumento em 10 vezes na concentração de peptona) e AY3 que foi cultivado em meio não enriquecido.



As Figuras 16, 17 e 18 apresentam o comportamento dos microrganismos AC02, AAV1 e AY3 respectivamente, durante 48 horas de fermentação.

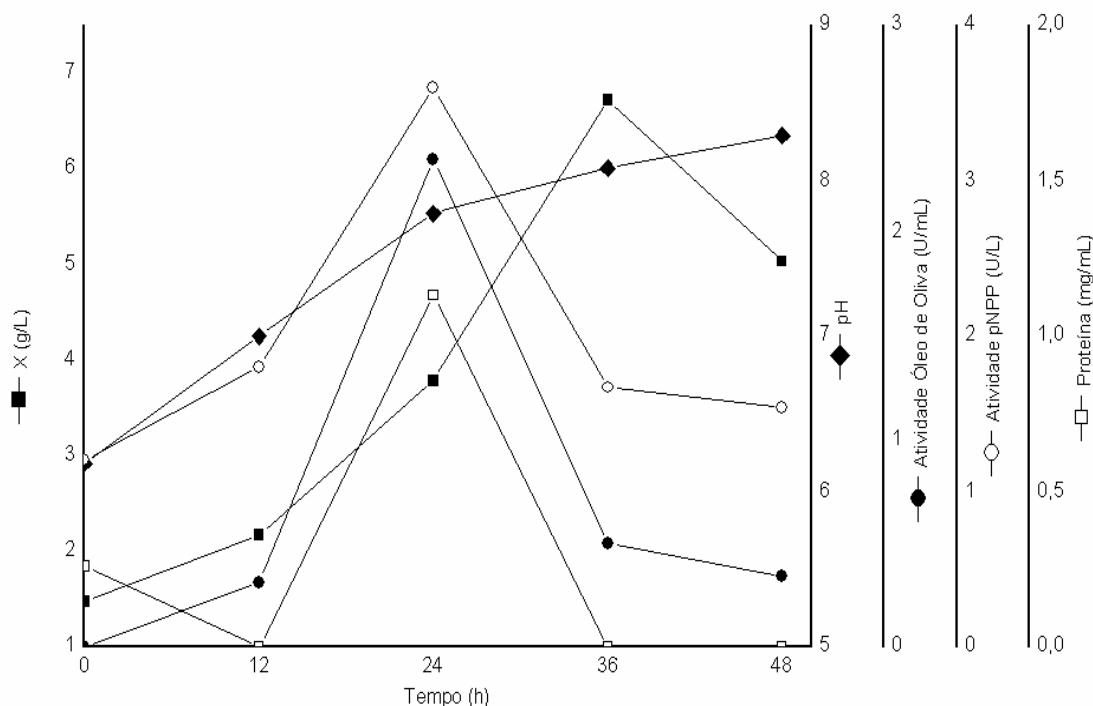


Figura 16. Comportamento do microrganismo AC02 durante o processo fermentativo.

Analisando a Figura 16 verifica-se que a cepa AC02 apresentou sua máxima concentração celular (6,72 g/L) em 36 horas de fermentação, porém sua máxima atividade lipolítica foi registrada em 24 horas de cultivo, para ambos os métodos de atividade utilizados na determinação. De acordo com Freire (1996), o mesmo comportamento foi verificado para os fungos filamentosos selecionados, onde sua máxima atividade lipolítica foi registrada em 24 horas de cultivo, devido ao fato das células estarem na fase exponencial de crescimento, onde apresentam sua maior atividade metabólica.

No método titulométrico de determinação lipolítica, que utiliza óleo de oliva como substrato, a máxima atividade foi 2,35 U/mL, enquanto que utilizando o método espectrofotométrico, que baseia-se na degradação do p-Nitrofenilpalmitato (pNPP) em Nitrofenol (pNP), a atividade lipolítica foi bastante inferior, sendo 3,60 U/L a máxima atividade registrada. Isso pode ser justificado pelo fato desta enzima ser produzida em meio de cultivo que utilizada como indutor o óleo de oliva, e por isso apresenta maior especificidade de

substrato pelo óleo de oliva do que pelo p-Nitrofenilpalmitato. Segundo Bhatnagar et al. (2005) as cepas isoladas de halobactérias apresentaram atividade lipolíticas em pNPP que variaram de 1,0 à 13,0 U/L, e em sua opinião, por mais que não sejam valores de atividade elevados, mas por terem apresentado a capacidade de hidrólise deste composto, e também apresentarem atividade frente ao óleo de oliva, podem ser consideradas como lipases verdadeiras.

Paralelamente verifica-se que a concentração de proteína no caldo fermentado decresce logo nas primeiras 12 horas de cultivo e apresenta um pico em 24 horas, justamente devido ao fato que neste período foi registrado a maior atividade lipolítica (produção de enzima) e decresce posteriormente devido ao esgotamento de nutrientes no meio de cultivo. Também pode-se verificar na Figura 16 o perfil do pH do meio de cultivo, apresentando um ligeiro aumento durante todo o cultivo, inicialmente partindo de 6,18 e após 48 horas de fermentação atingindo um pH de 8,29, com ápice de produção de lipase em 24 horas quando o pH registrado foi de 7,79. Segundo Freire (1996), este comportamento de pH é normal, quando se trata de produção de lipase, sendo registrado para fungos filamentosos (*Penicillium restrictum*), variações de 5,5 até 8,3. Diversos trabalhos reportados na literatura afirmam que a produção de lipase parece estar associada não só ao pH inicial do meio de cultivo, mas à sua variação durante o cultivo. Em geral a produção máxima da enzima ocorre similarmente quando o pH atinge valores entre 7,0 e 8,0 (OHNISHI et al., 1994; FREIRE, 1996), o mesmo foi registrado pela lipase do microrganismos AC02 em estudo (pH 7,8).

A Figura 17 apresenta o comportamento do microrganismo AAV1 durante o processo fermentativo. Verifica-se que este microrganismo apresentou um comportamento similar ao microrganismo citado anteriormente AC02. Sua máxima concentração celular (4,71 g/L) também foi registrada em 36 horas de fermentação, e sua máxima atividade lipolítica foi registrada em 24 horas de cultivo, para ambos os métodos de atividade utilizados na determinação. No método de determinação lipolítica que utiliza óleo de oliva como substrato, a máxima atividade registrada foi 1,50 U/mL inferior a lipase do microrganismo AC02 que registrou atividade de 2,35 U/mL. No método espectrofotométrico, a atividade lipolítica máxima foi 5,40 U/L, apesar de ser inferior a registrada no método titulométrico para a lipase do mesmo microrganismo, esta foi superior a registrada para a lipase da cepa AC02 que apresentou 3,60 U/L para o mesmo método analítico, demonstrando assim que a lipase deste microrganismo apresenta um maior especificidade hidrolítica frente ao p-Nitrofenilpalmitato quando comparado com o microrganismo AC02.

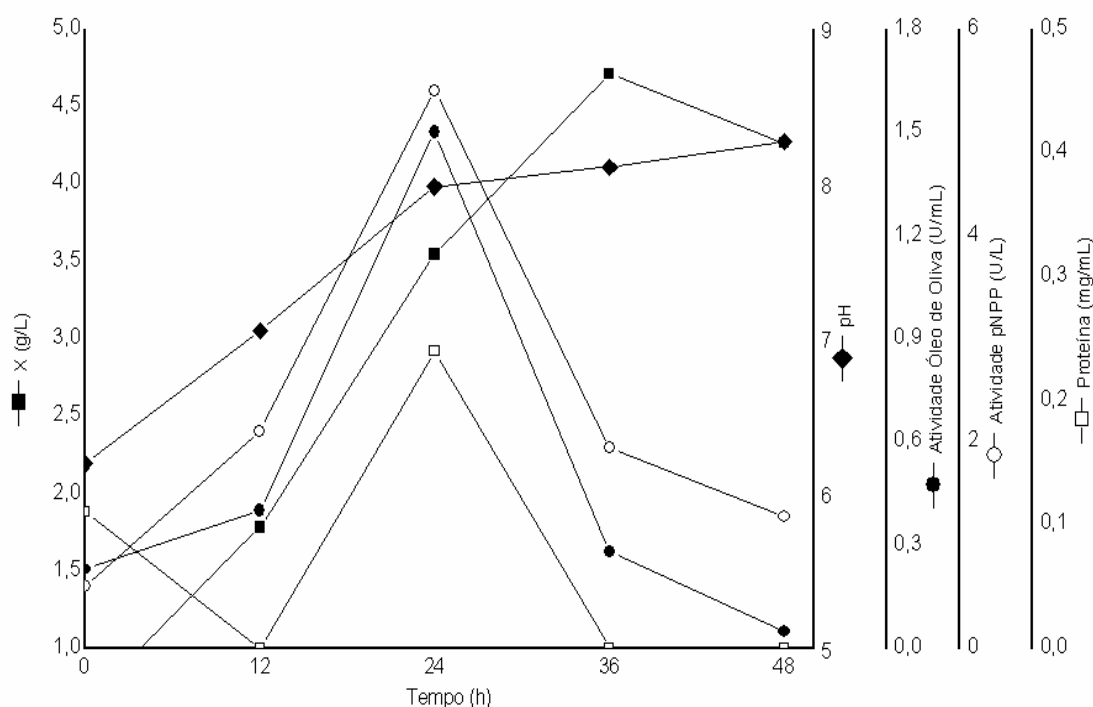


Figura 17. Comportamento do microrganismo AVV1 durante o processo fermentativo.

A concentração de proteína também apresentou o mesmo comportamento verificado anteriormente, decresceu logo nas primeiras 12 horas de cultivo, em 24 horas apresentou sua máxima concentração, decrescendo posteriormente. O comportamento do pH do meio de cultivo, apresentou um ligeiro aumento durante todo o cultivo conforme foi verificado para o microrganismo AC02. Tendo o ápice de produção de lipase em pH 8 dentro da faixa (7,0 e 8,0) mencionada por Ohnishi et al. (1994) e Freire (1996). No final da fermentação, isto é, após o esgotamento de nutrientes, o pH continua subindo, provavelmente devido à proteólise que origina aminoácidos que são desaminados liberando amônia para o caldo fermentado. De fato, a atividade proteolítica apresenta um crescimento na fase estacionária de crescimento especialmente na fase de lise celular (PIMENTEL et al., 1994; FREIRE, 1996).

O comportamento fisiológico do microrganismo AY3 durante o processo fermentativo foi ilustrado na Figura 18. Este microrganismo se difere dos outros dois citados anteriormente devido ao fato deste ser cultivado em meio não enriquecido (menor concentração de peptona).

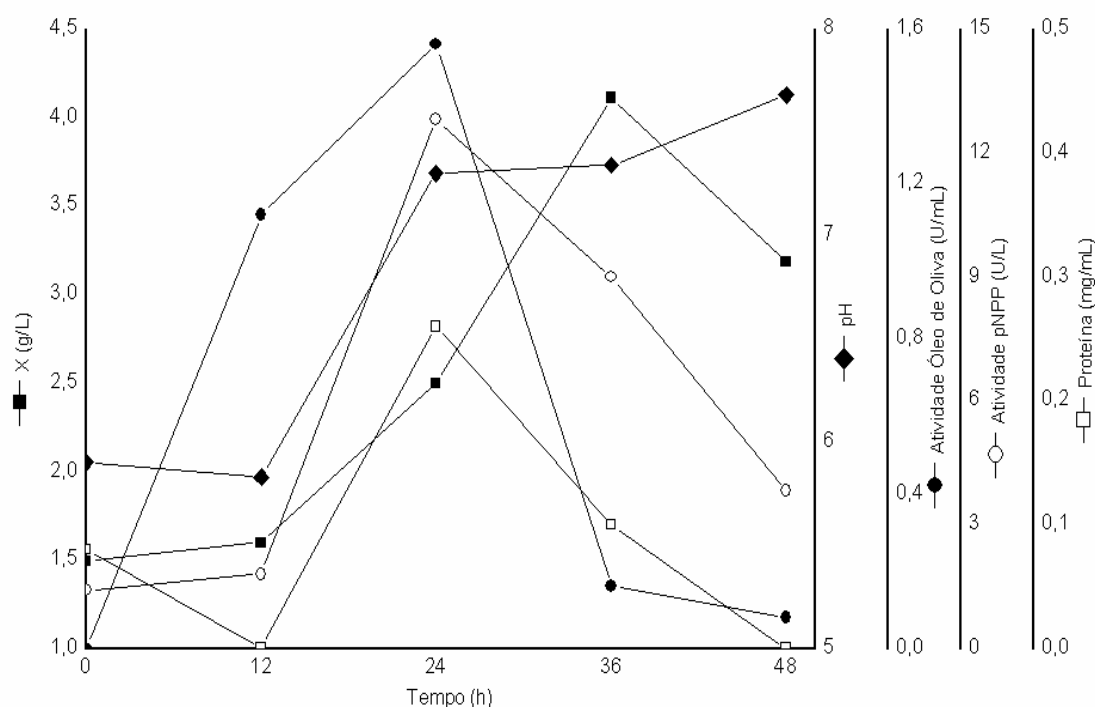


Figura 18. Comportamento do microrganismo AY3 durante o processo fermentativo.

Esta cepa AY3 apresentou sua máxima concentração celular (4,11 g/L) também em 36 horas de fermentação, e sua máxima atividade lipolítica foi registrada também em 24 horas de cultivo. No método titulométrico de determinação lipolítica, que utilizada óleo de oliva como substrato a máxima atividade registrada foi 1,56 U/mL, enquanto que utilizando o método espectrofotométrico, a máxima atividade lipolítica foi de 12,80 U/L. Este microrganismo também apresentou maior atividade lipolítica quando utilizado óleo de oliva como substrato, do que quando utilizado p-Nitrofenilpalmitato. Porém comparando com os outros microrganismos (AC02 e AAV1), este apresentou uma maior atividade em p-Nitrofenilpalmitato (12,80 U/L) do que os outros microrganismos estudados (3,60 e 5,40 U/L) respectivamente, demonstrando ser ainda mais específico para a degradação do p-Nitrofenilpalmitato em p-nitrofenol dos que as lipases provenientes dos microrganismos citados anteriormente.

Quanto a concentração de proteína no caldo fermentado, esta sempre apresentou mesmo perfil de comportamento para todas as cepas estudadas, registrando um pico em 24

horas, quando ocorre a maior produção de enzima. O perfil de pH do meio de cultivo diferenciou-se um pouco dos demais microrganismos em estudo, apresentando um pequeno decréscimo logo nas 12 primeiras horas de cultivo e depois foi aumentando gradativamente até atingir as 48 horas de fermentação. Esse comportamento de pH é similar ao registrado por Burkert (2003), onde o *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 em todos os ensaios realizados apresenta um decréscimo de pH nas primeiras horas de cultivo, aumentando após esse tempo durante o decorrer da fermentação. Porém apresentou em 24 horas de cultivo (máxima atividade lipolítica registrada) um pH de 7,30 também dentro da faixa de pH normalmente característica para produção de lipase (7,0 à 8,0) descrita por Freire (1996).

Verifica-se que para as lipases estudadas (AC02, AAV1, e AY3) após atingir o pico de atividade lipolítica em 24 horas de cultivo, ocorre uma brusca queda da atividade, e isto pode ser justificado por 2 fatores naturais, que atuam sinergicamente, proteólise e instabilidade ao pH. Pois junto com a proteólise conseqüentemente ocorreu o aumento do pH devido a liberação de amônia e assim desnaturando as enzimas que não são estáveis em pHs alcalinos (PIMENTEL et al., 1994; FREIRE, 1996).

### **5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS LIPASES**

A seguir serão apresentados os resultados obtidos na caracterização físico-química das lipases provenientes das 3 leveduras selecionadas, como perfil de temperatura e pH na reação enzimática, e estabilidade térmica e de pH.

#### **5.3.1 Perfil de Temperatura e pH**

Três microrganismos foram estudados: AC02 e AAV1 cultivados em meio enriquecido e, AY3 cultivado em meio não enriquecido.

A seguir estão descritos os resultados obtidos para o perfil de temperatura e pH utilizando planejamento experimental completo  $2^2 + 3$  pontos centrais e 4 axiais para cada microrganismo separadamente.

## ➤ **Microrganismo AC02**

Para a determinação do perfil de temperatura e pH, foi realizado um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com duas variáveis independentes (temperatura e pH) e tendo como variável resposta a atividade lipolítica da enzima produzida pelo microrganismo AC02 quando cultivado em meio enriquecido após 24 horas de fermentação.

Foi adotada a metodologia de planejamento estatístico conhecido como planejamento experimental para a determinação do perfil de temperatura e pH na atividade enzimática, por ser uma ferramenta bastante prática, que utiliza o menor número de ensaios possíveis e explora não apenas uma área isolada, mas sim toda a faixa de valores experimentais utilizados. Os níveis utilizados no DCCR e a matriz do planejamento experimental estão expressos nas Tabelas 6 e 7 respectivamente.

Tabela 6. Valores utilizados no DCCR para determinação do pH e temperatura ótimas para a lipase do microrganismo AC02.

<b>Níveis</b>	<b>- 1,41</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,41</b>
<b>pH</b>	5,2	5,6	6,6	7,6	8,0
<b>Temperatura (°C)</b>	27	30	37	44	47

Tabela 7. Matriz do DCCR e resposta para a lipase do microrganismo AC02.

<b>Ensaio</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>
1	-1	-1	0,67
2	1	-1	0,34
3	-1	1	1,04
4	1	1	2,70
5	0	0	2,41
6	0	0	2,60
7	0	0	2,52
8	-1,41	0	0,85
9	1,41	0	0,48
10	0	-1,41	0,38
11	0	1,41	2,24

Analisando a Tabela 7 verifica-se que os valores de atividade enzimática variaram de 0,34 à 2,70 U/mL. Esta variabilidade dos resultados é um indicativo de o que a enzima foi bastante sensível às variáveis estudadas, neste caso pH e temperatura. Os resultados obtidos nos pontos centrais (ensaio 5, 6 e 7) foram semelhantes, demonstrando que houve reprodutibilidade dos ensaios realizados.

A análise dos efeitos das variáveis estudadas e as interações entre elas foram realizadas e verificou-se que apenas o parâmetro pH linear não foi estatisticamente significativo ao nível de 5% de significância. Esta variável não significativa foi ignorada e foi possível construir a Tabela 8 que apresenta os coeficientes de regressão para a atividade lipolítica do microrganismo AC02.

Na Tabela 8 os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos associados à letra Q. Verifica-se que todos os coeficientes de regressão obtidos foram altamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 8. Coeficientes de regressão para a atividade lipolítica do DCCR da levedura AC02.

Parâmetros	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	p-valor	t(6)
<b>*Média</b>	2,509	0,185	$<1,00 \cdot 10^{-4}$	13,554
<b>*pH (Q)</b>	-0,875	0,135	$6,00 \cdot 10^{-4}$	-6,458
<b>*Temperatura (L)</b>	0,671	0,113	$1,00 \cdot 10^{-3}$	5,910
<b>*Temperatura (Q)</b>	-0,550	0,135	$6,60 \cdot 10^{-3}$	-4,064
<b>*pH x Temperatura</b>	0,497	0,160	$2,10 \cdot 10^{-2}$	3,103

\* Nível de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Para verificar a validade dos coeficientes e construção do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA) conforme a Tabela 9. Verifica-se que o F calculado ( $F_{\text{cac}}$ ) para a regressão foi 102,80, altamente significativo quando comparado com o F tabelado ( $F_{\text{tab}}$ ), 4,53. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi boa (93,84%), podendo-se então concluir que o modelo se ajusta aos dados experimentais.

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para a atividade lipolítica da levedura AC02.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>Calc</sub>
<b>Regressão</b>	9,406	4	2,351	102,80
<b>Resíduo</b>	0,617	6	0,103	
<b>Total</b>	10,023	10	1,002	

$$R^2 = 93,84; F_{\text{Tab Reg / Res (4; 6 ; 0,05)}} = 4,53; p\text{-valor} < 0,00001.$$

O modelo, com as variáveis codificadas que representa a atividade lipolítica em U/mL para o microrganismo AC02 em função da temperatura e pH na faixa estudada, é representado pela equação a seguir:

$$\text{Atividade lipolítica} = 2,509 - 0,875 \text{ pH}^2 + 0,671 \text{ Temperatura} - 0,550 \text{ Temperatura}^2 + 0,497 \text{ pH} \times \text{Temperatura}$$

Através do modelo foi possível calcular os valores previstos pelo modelo e comparar com os valores experimentais conforme Tabela 10.

Tabela 10. Valores de atividade lipolítica, experimentais e previstos pelo modelo, desvios e desvios relativos para o DCCR da levedura AC02.

Ensaio	Atividade Experimental (U/mL)	Atividade Prevista (U/mL)	Desvios	Desvios Relativos (%)
1	0,67	0,91	-0,24	-35,82
2	0,34	-0,08	0,42	124,71
3	1,04	1,26	-0,22	-20,96
4	2,70	2,25	0,45	16,59
5	2,41	2,51	-0,10	-4,11
6	2,60	2,51	0,09	3,50
7	2,52	2,51	0,01	0,44
8	0,85	0,77	0,08	9,48
9	0,48	0,77	-0,29	-60,29
10	0,38	0,47	-0,09	-23,54
11	2,24	2,36	-0,12	-5,43



Analisando a Tabela 10, constata-se que os menores desvios relativos registrados foram nos ensaios 5, 6 e 7, que são os pontos centrais do planejamento, demonstrando assim que os resultados apresentaram uma boa reprodutibilidade.

Os ensaios 2 e 9 apresentaram os maiores desvios (124,71% e -60,29% respectivamente), podendo ser justificado por estarem em faixa de pH bem superior ao ideal, o que afeta muito o comportamento da enzima. Isso pode ser melhor visualizado na Figura 19 que apresenta os valores de atividade lipolítica experimentais versus os valores previstos pelo modelo, onde verifica-se que 2 pontos estão mais afastados do ajuste do modelo.

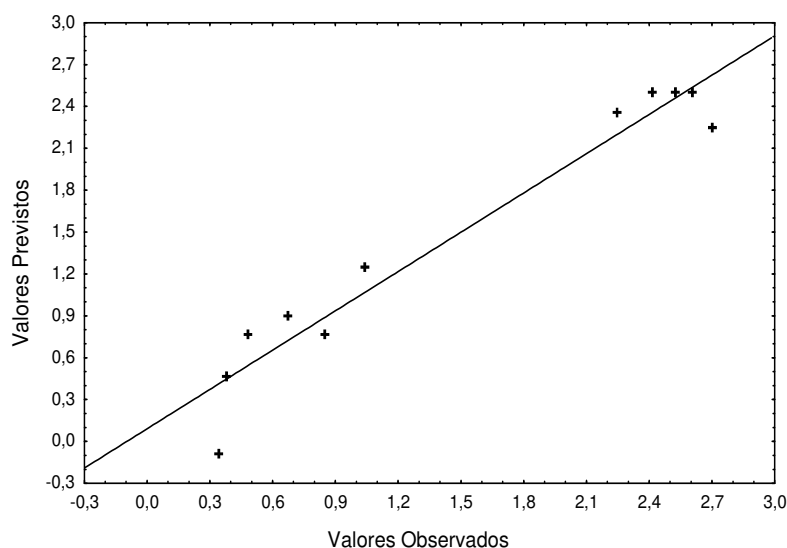


Figura 19. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo da levedura AC02.

Definido o modelo, foi possível gerar a superfície de resposta e curvas de contorno (Figuras 20 e 21) e obter as melhores condições de temperatura e pH na reação enzimática do microrganismo AC02, o que resultam em uma maior atividade lipolítica.

Foi possível verificar através da superfície de resposta e curvas de contorno que as faixas de temperatura e de pH obtidas como ótimas foram bastante amplas, o que possibilita a escolha de um determinado ponto como ótimo de acordo com a necessidade e viabilidade do processo. Para a variável temperatura a faixa ótima encontrada foi de 37 a 47°C e para o pH foi de 6,0 à 7,4. Estes valores estão de acordo aos registrados por Lotrakul & Dharmstithi (1997), que estudaram a lipase de *Aeromonas sobria* LP004, isolada do leite cru, e caracterizaram-na quanto as condições ótimas na reação enzimática e obtiveram o binômio 45°C e pH 6,0.

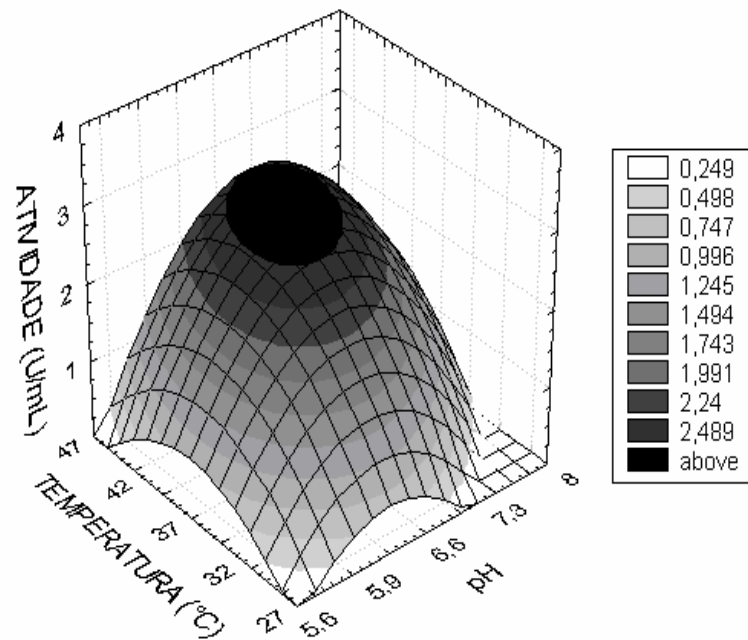


Figura 20. Superfície de resposta para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AC02.

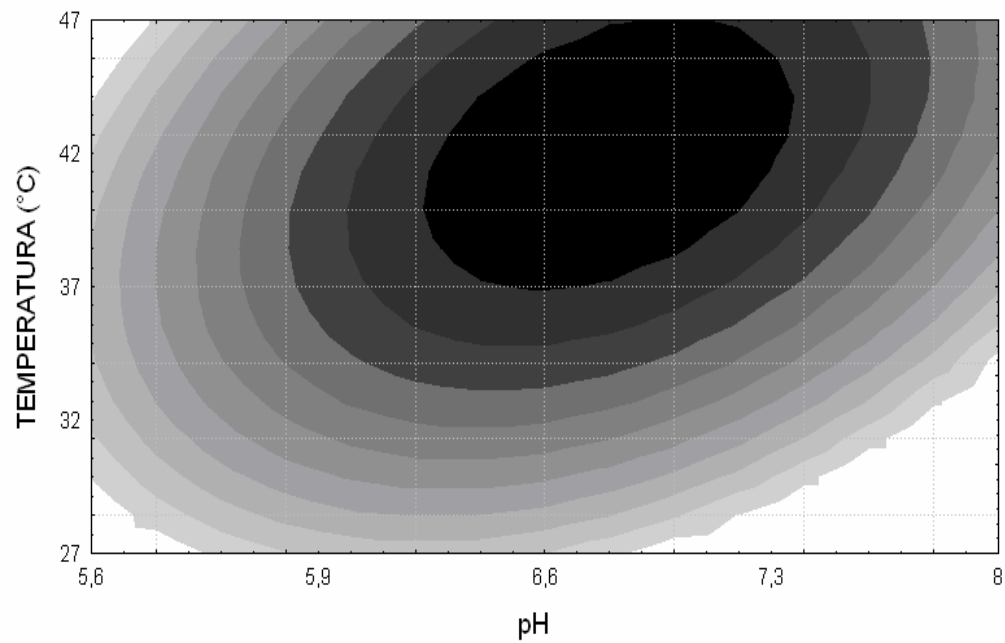


Figura 21. Curvas de contorno para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AC02.

Analisando a superfície de resposta e as curvas de contorno escolhemos a temperatura de 44°C e pH 7,0 como ótimos para a reação enzimática do microrganismo em estudo e verificamos a validação dos resultados através da realização da análise em triplicata desta condição escolhida, como está representada na Tabela 11.

Tabela 11. Validação dos resultados para a lipase produzida pela levedura AC02.

pH	Temperatura (°C)	Atividade (U/mL)
7,0	44	2,30
7,0	44	2,43
7,0	44	2,48
		Média = 2,40 U/mL

Conforme a Tabela 11, verifica-se uma boa reprodutibilidade dos resultados, validando assim o valor de temperatura e pH escolhidos como ótimos (44°C e 7,0) para a reação enzimática da lipase do microrganismo AC02. Burkert et al. (2003) que estudaram as condições ótimas de pH e temperatura na reação enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552, registrou um pH ótimo de 7,0 em tampão fosfato 100 mM, valor este que vem ao encontro do registrado pela lipase da levedura AC02, e uma temperatura ótima de 37°C, inferior a 44°C, porém dentro da faixa obtida como ótima para a lipase em estudo (37°C à 47°C).

### ➤ **Microrganismo AVV1**

Para a determinação do perfil de temperatura e pH, também foi realizado um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com duas variáveis independentes (temperatura e pH) e tendo como variável resposta a atividade lipolítica da enzima produzida pelo microrganismo AAV1 quando cultivado em meio enriquecido, após 24 horas de fermentação. Segundo Maldonado (2006), o estudo da temperatura e pH ótimos de uma enzima são fundamentais para sua aplicação em diferentes tipos de processos.

Os níveis utilizados no DCCR e a matriz do planejamento experimental estão expressos nas Tabelas 12 e 13 respectivamente.

Tabela 12. Valores utilizados no DCCR para determinação do pH e temperatura ótimas para a lipase do microrganismo AAV1.

<b>Níveis</b>	<b>- 1,41</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,41</b>
<b>pH</b>	5,2	5,6	6,6	7,6	8,0
<b>Temperatura (°C)</b>	27	30	37	44	47

Tabela 13. Matriz do DCCR e resposta para a lipase do microrganismo AAV1.

<b>Ensaio</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>
1	-1	-1	1,33
2	1	-1	0,53
3	-1	1	1,02
4	1	1	1,60
5	0	0	1,76
6	0	0	1,60
7	0	0	1,72
8	-1,41	0	0,96
9	1,41	0	0,75
10	0	-1,41	1,12
11	0	1,41	2,37

De acordo com a Tabela 13 verifica-se uma grande variabilidade entre os valores de atividade enzimática registrados no DCCR. Esta variabilidade entre os valores de atividade lipolítica (0,53 à 2,37 U/mL) pode ser considerada como um indicativo de o que a enzima foi bastante sensível às variáveis estudadas (pH e temperatura). Uma determinada enzima pode exibir diferentes comportamentos de acordo com a temperatura e pH em que atuam (MALDONADO, 2006).

No entanto, os resultados obtidos nos pontos centrais (ensaios 5, 6 e 7) apresentaram-se bastante próximos, demonstrando que houve reprodutibilidade dos ensaios realizados.

Foi realizada a análise dos efeitos das variáveis estudadas e as interações entre elas e verificou-se que o parâmetro pH linear e temperatura quadrática não foram estatisticamente significativos ao nível de 5% de significância. Estas variáveis não significativas foram então ignoradas e assim foi possível construir a Tabela 14 que apresenta os coeficientes de regressão para a atividade lipolítica do microrganismo AAV1.

A validação dos coeficientes da Tabela 14 foi realizada através da análise de variância (ANOVA) conforme expresso na Tabela 15.

Tabela 14. Coeficientes de regressão para a atividade lipolítica do DCCR da levedura AAV1.

Parâmetros	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	p-valor	t(7)
<b>*Média</b>	1,676	0,077	$<1,00.10^{-4}$	21,498
<b>*pH (Q)</b>	-0,461	0,074	$4,00.10^{-4}$	-6,153
<b>*Temperatura (L)</b>	0,316	0,065	$1,90.10^{-3}$	4,816
<b>*pH x Temperatura</b>	0,345	0,092	$7,40.10^{-3}$	3,721

\* Nível de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para a atividade lipolítica da levedura AAV1.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>Calc</sub>
<b>Regressão</b>	2,575	3	0,858	74,90
<b>Resíduo</b>	0,241	7	0,034	
<b>Total</b>	2,816	10	0,281	

$R^2 = 91,45$ ;  $F_{\text{Tab Reg / Res (3; 7; 0,05)}} = 4,35$ ; p-valor  $< 0,00001$ .

Analisando a Tabela 15, verifica-se que o F calculado ( $F_{\text{cac}}$ ) para a regressão foi 74,90, bastante significativo quando comparado com o F tabelado ( $F_{\text{tab}}$ ), 4,35. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi boa, correspondendo à 91,45%, validando assim o modelo proposto.

O modelo, com as variáveis codificadas que representa a atividade lipolítica (U/mL) para o microrganismo AAV1 em função da temperatura e pH na faixa estudada, é colocado a seguir:

$$\text{Atividade Lipolítica} = 1,676 - 0,461 \text{ pH}^2 + 0,316 \text{ Temperatura} + 0,345 \text{ pH} \times \text{Temperatura}$$

Através do modelo descrito acima foi possível calcular os valores previstos pelo modelo e comparar com os valores experimentais conforme Tabela 16.

Tabela 16. Valores de atividade lipolítica, experimentais e previstos pelo modelo, desvios e desvios relativos para o DCCR da levedura AAV1.

Ensaio	Atividade Experimental (U/mL)	Atividade Prevista (U/mL)	Desvios	Desvios Relativos (%)
1	1,33	1,24	0,09	6,47
2	0,53	0,55	-0,02	-4,53
3	1,02	1,19	-0,17	-16,27
4	1,60	1,88	-0,28	-17,25
5	1,76	1,68	0,08	4,77
6	1,60	1,68	-0,08	-4,75
7	1,72	1,68	0,04	2,56
8	0,96	0,76	0,20	20,89
9	0,75	0,76	-0,01	-1,26
10	1,12	1,23	-0,11	-9,86
11	2,37	2,12	0,25	10,48

Analisando a Tabela 16, verifica-se que os desvios relativos registrados em todos os ensaios do planejamento são pequenos, tendo como máximo desvio relativo registrado (20,89%) no ensaio 8, que é o ponto axial inferior de pH (5,2), demonstrando assim que os valores previstos pelo modelo estão bastante próximos ao resultados experimentais.

Isso pode ser melhor visualizado na Figura 22 que apresenta o comportamento dos valores experimentais frente aos valores previstos pelo modelo. Nesta Figura é possível verificar que os valores preditos pelo modelo foram semelhantes aos valores experimentais, validando-se mais uma vez o modelo proposto.

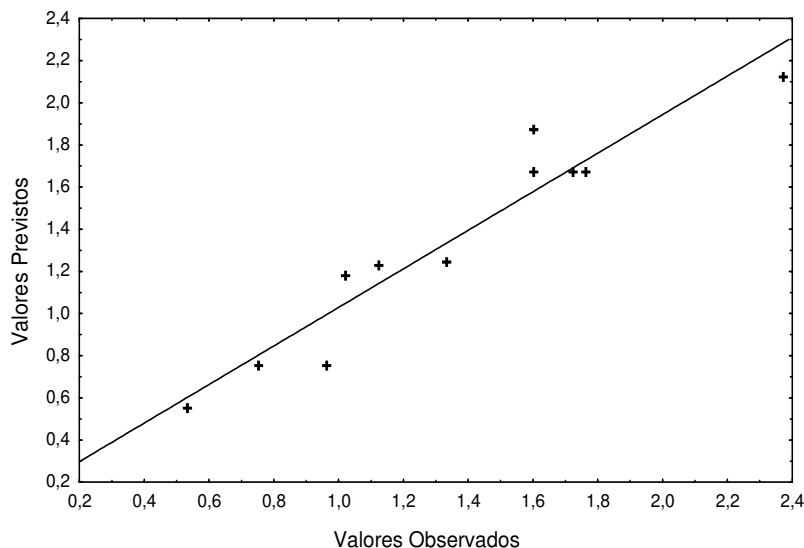


Figura 22. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo da levedura AAV1.

Com o modelo definido e validado pode-se construir a superfície de resposta e curvas de contorno para as variáveis estudadas (Figuras 23 e 24).

Construídas a superfície de resposta e curvas de contorno geradas pelo modelo pode-se obter as melhores condições de temperatura e pH na reação enzimática do microrganismo AAV1, o que resultam em uma maior atividade lipolítica.

Conforme as Figuras 23 e 24 não foi possível verificar a faixa ótima de temperatura para a reação enzimática, pois a faixa estudada não foi suficiente, sendo necessário deslocar a temperatura para níveis um pouco mais superiores, pois a área definida como ótima está deslocada nos níveis máximos de temperatura, com tendência de acréscimo da temperatura.

Porém para a variável pH foi possível estabelecer uma faixa ótima bastante ampla, que variou de 6,6 à 7,6. Entre os valores que compreendem esta faixa, escolhemos o pH 7,0 como ótimo para a reação enzimática do microrganismo AAV1, devido ao fato que na maioria das reações enzimáticas citadas na literatura para lipases, utiliza-se o pH 7,0 como padrão. Os valores obtidos para pH ótimo, igual a 7,0, já haviam sido obtidos para lipase de *Penicillium restrictum* por Freire et al. (1997) e para a lipase de *Geotrichum candidum* por Burkert (2003).

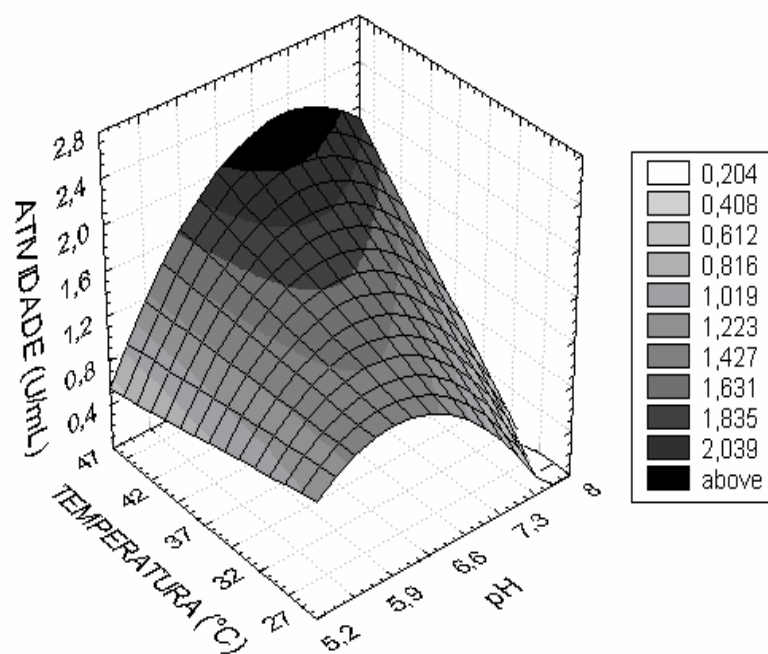


Figura 23. Superfície de resposta para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AAV1.

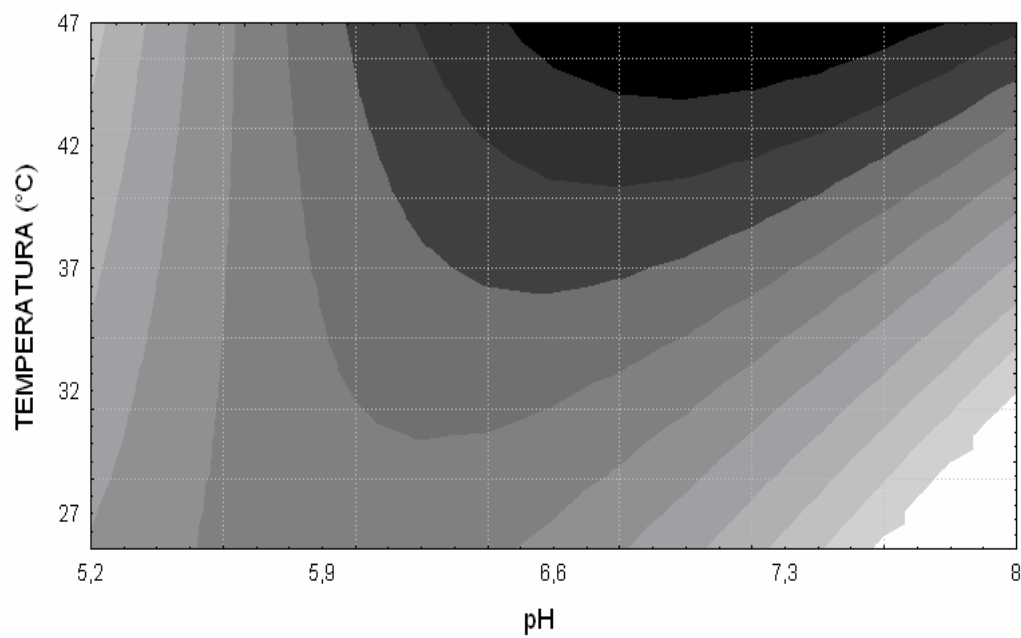


Figura 24. Curvas de contorno para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AAV1.



Definido o pH (7,0) realizamos mais um estudo, para determinar qual a temperatura ótima para este microrganismo. Para tanto, fixamos o pH em 7,0 e testamos 3 temperaturas isoladas, sendo elas 47°C (ponto axial superior de temperatura utilizado no planejamento anterior) e as temperaturas de 50 e 55 °C conforme pode ser visualizado na Tabela 17.

Tabela 17. Validação dos resultados para a lipase produzida pela levedura AAV1.

pH	Temperatura (°C)	Atividade (U/mL)
7,0	47	2,26
7,0	50	1,35
7,0	55	1,22

\*Média dos resultados realizados em triplicata.

Conforme a Tabela 17 verifica-se que mesmo deslocando a temperatura para níveis superiores, a temperatura ótima para a reação enzimática do microrganismo AAV1 foi 47°C, pois foi registrado valores de atividade lipolítica inferiores quando fixado o pH em 7,0 e elevada a temperatura para 50 e 55°C.

A validação dos resultados foi realizada em triplicata, sendo definida como ótimos o pH 7,0 e a temperatura de 47°C para a reação enzimática deste microrganismo em estudo. Esta mesma condição de temperatura (47°C) e de pH (7,0) foi observada por Maldonado (2006) que estudou o perfil de temperatura e pH na reação enzimática da lipase bruta de *Geotrichum candidum* obtida em da água de maceração de arroz, através de um planejamento experimental completo  $2^2 + 3$  pontos centrais e 4 axiais.

### ➤ **Microrganismo AY3**

Para a determinação do perfil de temperatura e pH, foi realizado novamente um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com duas variáveis independentes (temperatura e pH) e tendo como variável resposta a atividade lipolítica da enzima produzida pelo microrganismo AY3 quando cultivado em meio não enriquecido após 24 horas de fermentação.

Os níveis utilizados no DCCR e a matriz do planejamento experimental estão expressos nas Tabelas 18 e 19 respectivamente.

Tabela 18. Valores utilizados no DCCR para determinação do pH e temperatura ótimas para a lipase do microrganismo AY3.

Níveis	- 1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	5,2	5,6	6,6	7,6	8,0
Temperatura (°C)	27	30	37	44	47

Tabela 19. Matriz do DCCR e resposta para a lipase do microrganismo AY3.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U/mL)
1	-1	-1	0,82
2	1	-1	0,97
3	-1	1	1,02
4	1	1	1,07
5	0	0	1,73
6	0	0	1,52
7	0	0	1,63
8	-1,41	0	0,65
9	1,41	0	0,59
10	0	-1,41	0,88
11	0	1,41	1,28

Conforme a Tabela 19 verifica-se que os valores de atividade enzimática não apresentaram grandes variações, principalmente nos ensaios 5, 6 e 7 (pontos centrais), onde os valores registrados de atividade lipolítica foram bastante semelhantes (boa reprodutibilidade), além de que, nesses ensaios foram registradas as maiores atividades lipolíticas para a lipase deste microrganismo em estudo.

A análise dos efeitos das variáveis estudadas e as interações entre elas foi realizada e verificou-se que o parâmetro pH linear e a interação entre pH e temperatura não foram

estatisticamente significativos em nível de 5% de significância. Estas variáveis não significativas foram ignoradas e foi possível construir a Tabela 20 que apresenta os coeficientes de regressão para a atividade lipolítica do microrganismo AY3.

Tabela 20. Coeficientes de regressão para a atividade lipolítica do DCCR da levedura AY3.

Parâmetros	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	p-valor	t(7)
<b>*Média</b>	1,626	0,060	$<1,00.10^{-4}$	27,002
<b>*pH (Q)</b>	-0,474	0,044	$<1,00.10^{-4}$	-10,772
<b>*Temperatura (L)</b>	0,108	0,036	$2,19.10^{-2}$	2,932
<b>*Temperatura (Q)</b>	-0,243	0,044	$8,00.10^{-4}$	-5,522

\* Nível de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Para verificar a validade dos coeficientes e posterior construção do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA) conforme a Tabela 21. Observa-se que a porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi muito boa (94,92%) e que o F calculado ( $F_{\text{cac}}$ ) para a regressão foi 155,13 altamente significativo quando comparado com o F tabelado ( $F_{\text{tab}}$ ), 4,35, podendo-se então concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 21. Análise de variância (ANOVA) para a atividade lipolítica da levedura AY3.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{Calc}}$
<b>Regressão</b>	1,423	3	0,474	155,13
<b>Resíduo</b>	0,076	7	0,011	
<b>Total</b>	1,499	10	0,149	

$R^2 = 94,92$ ;  $F_{\text{Tab Reg / Res (3; 7; 0,05)}} = 4,35$ ; p-valor  $< 0,000001$ .

O Modelo com as variáveis codificadas que representa a atividade lipolítica em U/mL para o microrganismo AY3 em função da temperatura e pH na faixa estudada, é colocado a seguir:

$$\text{Atividade Lipolítica} = 1,626 - 0,474 \text{ pH}^2 + 0,108 \text{ Temperatura} - 0,243 \text{ Temperatura}^2$$

Através do modelo foi possível calcular os valores previstos pelo modelo e comparar com os valores experimentais conforme Tabela 22 e Figura 25.

Tabela 22. Valores de atividade lipolítica, experimentais e previstos pelo modelo, desvios e desvios relativos para o DCCR da levedura AY3.

<b>Ensaio</b>	<b>Atividade Experimental (U/mL)</b>	<b>Atividade Prevista (U/mL)</b>	<b>Desvios</b>	<b>Desvios Relativos (%)</b>
1	0,82	0,80	0,02	2,32
2	0,97	0,80	0,17	17,42
3	1,02	1,02	0,00	0,29
4	1,07	1,02	0,05	4,95
5	1,73	1,63	0,10	6,01
6	1,52	1,63	-0,11	-6,97
7	1,63	1,63	0,00	0,25
8	0,65	0,68	-0,03	-5,18
9	0,59	0,68	-0,09	-15,87
10	0,88	0,99	-0,11	-12,57
11	1,28	1,30	-0,02	-1,19

Analisando a Tabela 22 constata-se que os desvios relativos registrados em todo o planejamento experimental foram inferiores a 18% e isso demonstra que os valores previstos pelo modelo foram muito semelhantes aos valores experimentais, validando assim o modelo proposto. Conforme pode ser verificado mais uma vez na Figura 25, onde os valores observados se aproximam dos valores previstos pelo modelo.

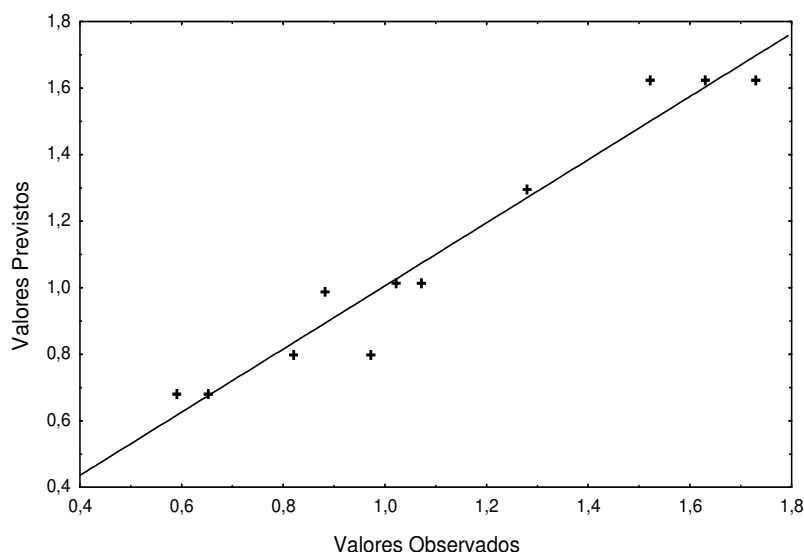


Figura 25. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo da levedura AY3.

Com o modelo definido e validado pôde-se construir a superfície de resposta para as variáveis estudadas. Através da superfície de resposta e curvas de contorno geradas pelo modelo (Figuras 26 e 27) pode-se obter as melhores condições de temperatura e pH na reação enzimática do microrganismo AY3.

A faixa ótima encontrada para a temperatura na reação enzimática foi de 34 a 44°C e para o pH foi de 6,0 à 7,0. As faixas de temperatura e de pH obtidas como ótimas foram bastante amplas, o que possibilita a escolha de um determinado ponto como ótimo de acordo com a necessidade e viabilidade do processo. Esses valores estão de acordo com os reportados por Pastore et al. (2003), onde o extrato bruto de lipase de *Rhizopus* sp. apresentou condições ótimas de atividade à 40°C em valores de pH entre 6,0 e 6,5. Freire (1996), quando estudou a temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática da lipase de *Penicillium restrictum*, registrou atividade lipolítica máxima em pH 7,0 e temperatura de 37°C. Segundo Abbas et al. (2002), a lipase de *Mucor* sp. isolada do fruto da palmeira apresentou como condições ótimas para a obtenção de maiores atividades lipolíticas, pH 7,0 e temperatura de 35°C.

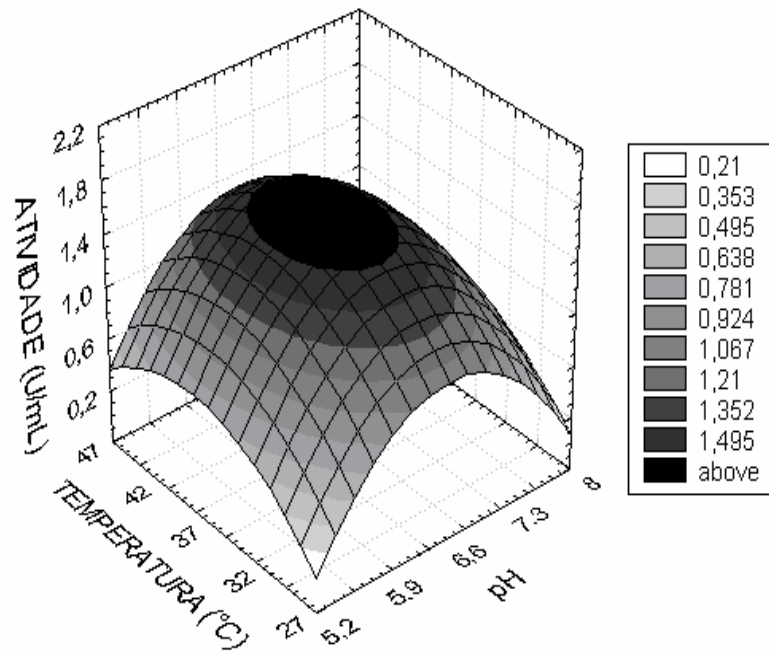


Figura 26. Superfície de resposta para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AY3.

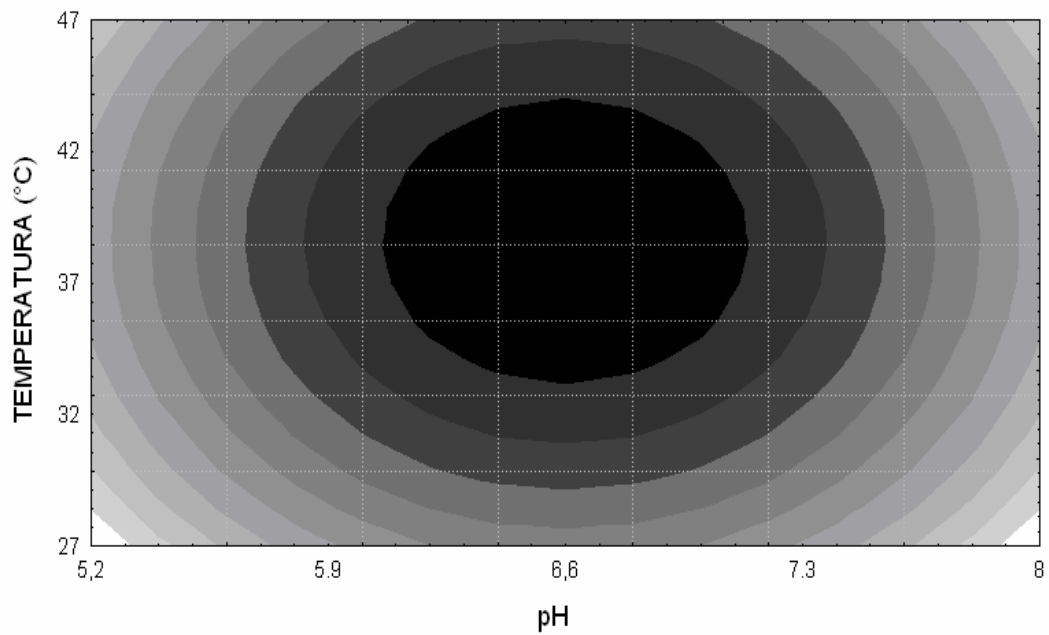


Figura 27. Curvas de contorno para a atividade lipolítica em função do pH e temperatura da levedura AY3.

Dente a faixa obtida como ótimo para a temperatura e pH, escolhemos a temperatura de 37°C e pH 6,6 (pontos centrais do planejamento) como ótimos para a reação enzimática do microrganismo em estudo. A validação dos resultados foi realizada através da análise em triplicata desta condição escolhida (Tabela 23).

Tabela 23. Validação dos resultados para a lipase produzida pela levedura AY3.

pH	Temperatura (°C)	Atividade (U/mL)
6,6	37	1,70
6,6	37	1,60
6,6	37	1,65
		Média = 1,65 U/mL

Conforme a Tabela 23 verifica-se uma boa reprodutibilidade dos resultados, validando assim o valor de temperatura e pH escolhidos como ótimos (37°C e 6,6) para a reação enzimática do microrganismo AY3. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Maldonado (2006) quando estudou o perfil de temperatura e pH da lipase bruta de *Geotrichum candidum* produzida em meio contendo Prodexlac, e apresentou máxima atividade lipolítica nos ensaios dos pontos centrais, com temperatura de 37°C e tampão fosfato 100 mM pH 7,0.

As lipases das leveduras selecionadas (AC02, AAV1 e AY3) quando caracterizadas quanto ao perfil de pH e temperatura na atividade enzimática apresentaram comportamentos distintos. Para a lipase da cepa AC02, obtemos como condições ótimas para a reação enzimática pH 7,0 e temperatura 44°C, e para a lipase do microrganismo AAV1, que foi cultivada em meio enriquecido com peptona da mesma forma que a levedura AC02, também obtemos como ótimo o pH 7,0 porém uma temperatura um pouco mais elevada, 47°C. Já para lipase da levedura AY3, cultivada em meio não enriquecido, as condições ótimas de temperatura e pH na reação enzimática foram 37°C e 6,6 respectivamente. Tal fato demonstra que lipases obtidas de diferentes fontes podem exibir diferentes propriedades, especialmente em relação a temperatura e pH ótimo de atuação, e que alterações na composição do meio de cultivo influenciam diretamente no comportamento das enzimas (MALDONADO, 2006).

### 5.3.2 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica das lipases proveniente dos 3 microrganismos selecionados (AC02, AAV1 e AY3) foi estudada através da determinação do tempo de meia vida da enzima. De cada solução incubada foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados e determinou-se as constantes de desnaturação ( $K_d$ ), meia vida ( $t_{1/2}$ ) e energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) em função das temperaturas analisadas. Levando-se em consideração que em altas temperaturas a desnaturação da enzima é importante e que a cinética de desnaturação é de primeira ordem.

#### ➤ Microrganismo AC02

Este microrganismo apresentou como ótimo pH = 7,0 para a reação enzimática, então o caldo fermentado foi incubado em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 em diferentes temperaturas: 30, 37, 45, 50, 55 °C. A cada tempo pré-determinado foram retiradas amostras e determinadas a atividade lipolítica (U) e atividade relativa ( $U/U_0$ ) da enzima em estudo.

Os resultados obtidos com as incubações em diferentes temperaturas estão expressos nas Tabelas 24 à 28. Foi graficado o logarítmico natural da atividade relativa ( $U/U_0$ ) em função do tempo para posterior determinação do valor  $K_d$  para cada temperatura estudada. Um exemplo do cálculo do  $K_d$  é mostrado através da Figura 28 para a temperatura de 55°C.

Tabela 24. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 30°C.

Tempo (min)	Atividade (U/mL)	U/U <sub>0</sub>	- ln (U/U <sub>0</sub> )
0	2,24	1,000	0,000
60	2,11	0,942	0,059
180	2,02	0,902	0,103
360	1,92	0,857	0,154
540	1,85	0,826	0,191
1440	1,06	0,473	0,748
1620	0,64	0,286	1,252
1800	0,48	0,214	1,542
2880	0,32	0,143	1,944



Tabela 25. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 37°C.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>U/Uo</b>	<b>- ln (U/Uo)</b>
0	1,92	1,000	0,000
30	1,82	0,948	0,053
60	1,42	0,740	0,301
90	1,27	0,661	0,414
120	1,15	0,599	0,512
240	0,67	0,349	1,053

Tabela 26. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 45°C.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>U/Uo</b>	<b>- ln (U/Uo)</b>
0	1,79	1,000	0,000
3	1,60	0,894	0,112
5	1,18	0,659	0,417
8	0,9	0,503	0,687
10	0,77	0,430	0,844
15	0,67	0,374	0,983

Tabela 27. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 50°C.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>U/Uo</b>	<b>- ln (U/Uo)</b>
0	1,76	1,000	0,000
1	1,41	0,801	0,222
3	1,06	0,602	0,507
5	0,96	0,545	0,607
8	0,80	0,455	0,787
10	0,32	0,182	1,704

Tabela 28. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação a temperatura de 55°C.

Tempo (min)	Atividade (U/mL)	U/Uo	- ln (U/Uo)
0	2,14	1,000	0,000
2	1,66	0,776	0,254
4	1,25	0,584	0,538
5	1,02	0,476	0,742
8	0,32	0,149	1,904
10	0,19	0,089	2,419

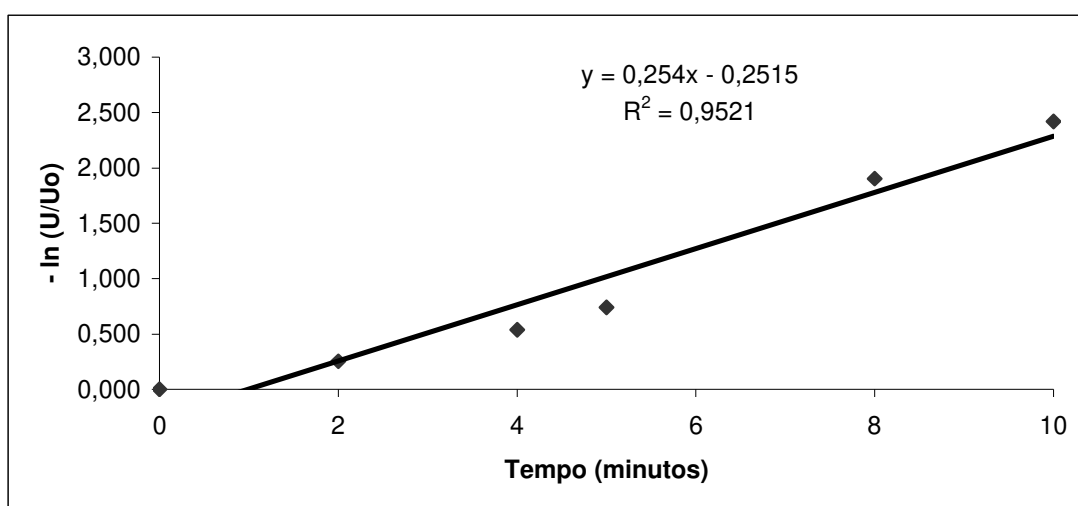


Figura 28. Efeito da temperatura em função do tempo de incubação para a lipase do microrganismo AC02, para cálculo da constante de desnaturação ( $K_d$ ) na  $T = 55^\circ\text{C}$ .

Através da Figura 28 foi possível calcular a constante de desnaturação para a temperatura de  $55^\circ\text{C}$ , onde a inclinação da reta equivale ao valor de  $K_d = 0,254 \text{ min}^{-1}$ . Com o valor de  $K_d$  foi possível calcular a meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ ) para a temperatura de  $55^\circ\text{C}$ , através da Equação 02 citada no item 4.5.2.2, obtendo  $t_{1/2} = 2,729$  minutos ou 0,045 horas. Da mesma forma foi calculado o  $K_d$  e  $t_{1/2}$  para cada temperatura estudada.

Calculados os valores de  $K_d$  para cada temperatura estudada foi possível construir a Tabela 29, que apresenta os valores de  $K_d$  e suas respectivas temperaturas e também o logarítmico natural de  $K_d$  para posterior construção da Figura 29 e assim ser possível

calcular a energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da enzima através da metodologia de Arrhenius conforme Equação 03 citada no item 4.5.2.3.

Tabela 29. Valores de  $K_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ) e suas respectivas temperaturas para a lipase do microrganismo AC02.

Temperatura (°C) (K)		$1/T \cdot 10^3$	$K_d (\text{min}^{-1})$	$-\ln(K_d)$
55	328	3,049	$2,54 \cdot 10^{-1}$	1,370
50	323	3,096	$1,40 \cdot 10^{-1}$	1,963
45	318	3,145	$7,22 \cdot 10^{-2}$	2,628
37	310	3,226	$4,50 \cdot 10^{-3}$	5,404
30	303	3,300	$7,00 \cdot 10^{-4}$	7,264

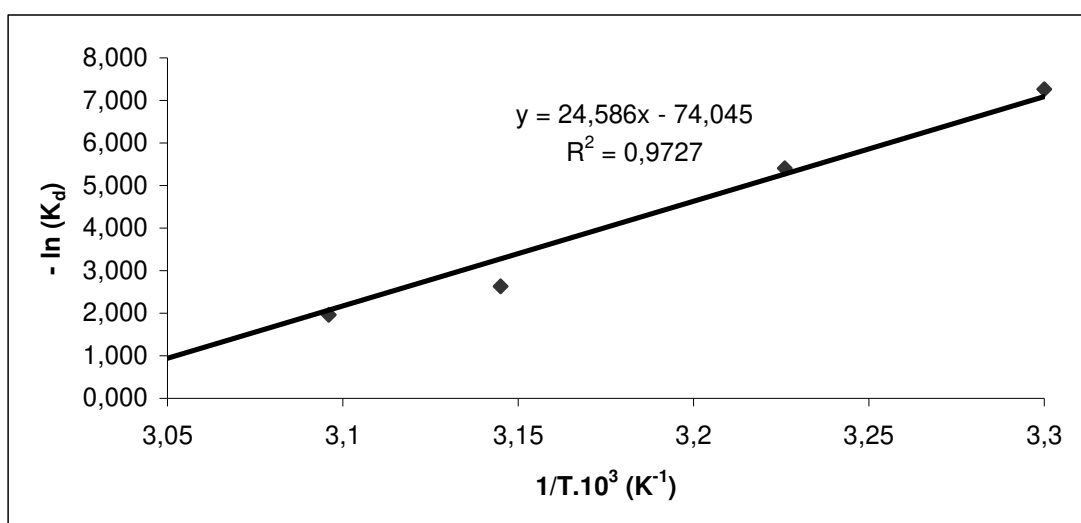


Figura 29. Linearização dos valores de  $K_d$  em função da temperatura (K) para o cálculo da energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da lipase do microrganismo AC02.

A partir da Figura 29 foi possível calcular a energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) igualando a equação da reta ( $\ln K_d = 74,045 - 24586.1/T$ ) com a equação de Arrhenius ( $\ln K_d = \ln K - E_{ad}/RT$ ). Obtendo-se então  $E_{ad}/R = 24586$ , e multiplicando pela constante de gases ( $R = 1,98 \text{ cal/mol.K}$ ) obtemos  $E_{ad} = 48,68 \text{ Kcal/mol}$  ou  $203,68 \text{ KJ/mol}$ . Este valor de energia de ativação de desnaturação registrado para a lipase do microrganismo AC02 está de

acordo segundo Doran (2002), que relata que  $E_{ad}$  normalmente assume valores elevados para a maioria das enzimas, cituando-se na faixa entre 170 e 400 KJ/mol.

Também foi possível obter a equação final de Arrhenius, para tanto calculamos o valor de K (constante de Arrhenius) a partir de  $\ln K = 74,045$  e obtemos  $K = 1,436 \times 10^{32}$ . Desta forma, a expressão obtida para determinar os valores de  $K_d$  estimados está expressa na Equação abaixo.

$$K_d = 1,436 \times 10^{32} \exp^{(-24586/T)} \quad (\text{Eq. 04})$$

A partir da Equação 04 foi possível estimar os valores de  $K_d$  e meia vida em função da temperatura conforme expresso na Tabela 30.

Tabela 30. Valores experimentais e estimados da constante de desnaturação ( $k_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para as temperaturas estudadas para o microrganismo AC02.

Temperatura (°C)	$K_d$ experimental (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ experimental (h)	$K_d$ estimado (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ estimado (h)
55	$2,54 \cdot 10^{-1}$	0,045	$4,01 \cdot 10^{-1}$	0,029
50	$1,40 \cdot 10^{-1}$	0,082	$1,26 \cdot 10^{-1}$	0,092
45	$7,22 \cdot 10^{-2}$	0,160	$3,8 \cdot 10^{-2}$	0,304
37	$4,50 \cdot 10^{-3}$	2,567	$5,20 \cdot 10^{-3}$	2,222
30	$7,00 \cdot 10^{-4}$	16,503	$8,00 \cdot 10^{-4}$	14,440

Como pode-se verificar na Tabela 30, os valores de  $K_d$  e consequentemente  $t_{1/2}$  estimados pela Equação 04 não são iguais aos experimentais, porém próximos, isto deve-se pelo fato dos valores de  $K_d$  experimentais serem calculados a partir da linearização dos valores de atividade relativa, e quanto maior o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da linearização, mais próximos serão os valores experimentais dos estimados.

Verifica-se também que a medida que se aumenta a temperatura, menor é a estabilidade da enzima, assim podemos dizer que a enzima proveniente da levedura nomeada AC02 é mais estável a baixas temperaturas, como a 30°C, onde apresentou um  $K_d = 7,00 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  e um tempo de meia vida de 16,503 horas. A lipase deste microrganismo AC02 mostrou-se bem menos estável que a lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552

reportada por Burkert (2003) que apresentou um  $t_{1/2} = 38,51$  horas a 30°C e pH 7,0 e também menos estável que a lipase de *Penicillium restrictum*, reportada por Freire et al. (1997), que registrou um  $t_{1/2} = 4800$  horas a 30°C e pH 7,0.

### ➤ **Microrganismo AAV1**

Este microrganismo também apresentou como ótimo para a reação enzimática pH = 7,0, então o caldo fermentado foi incubado em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 em diferentes temperaturas: 30, 37, 45, 50, 55 °C. A cada tempo pré-determinado foram retiradas amostras e determinadas a atividade lipolítica (U) e atividade relativa ( $U/U_0$ ) da enzima em estudo. Com os resultados obtidos nas incubações foi possível graficar o logarítmico natural da atividade relativa ( $U/U_0$ ) em função do tempo para determinação da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e a meia vida ( $t_{1/2}$ ) para cada temperatura estudada, conforme foi demonstrado para o microrganismo AC02 anteriormente.

Calculados os valores de  $K_d$  para cada temperatura estudada, foi possível construir a Tabela 31, que apresenta os valores de  $K_d$  e suas respectivas temperatura e também o logarítmico natural de  $K_d$  para posterior construção da Figura 30 e assim calcular a energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da enzima através da metodologia de Arrhenius conforme Equação 03 citada no item 4.5.2.3.

Tabela 31. Valores de  $K_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ) e suas respectivas temperaturas para a lipase do microrganismo AAV1.

Temperatura (°C)    (K)		$1/T \cdot 10^3$	$K_d (\text{min}^{-1})$	$-\ln (K_d)$
55	328	3,049	$1,68 \cdot 10^{-1}$	1,785
50	323	3,096	$8,79 \cdot 10^{-2}$	2,431
45	318	3,145	$5,41 \cdot 10^{-2}$	2,917
37	310	3,226	$4,10 \cdot 10^{-3}$	5,497
30	303	3,300	$6,00 \cdot 10^{-4}$	7,419

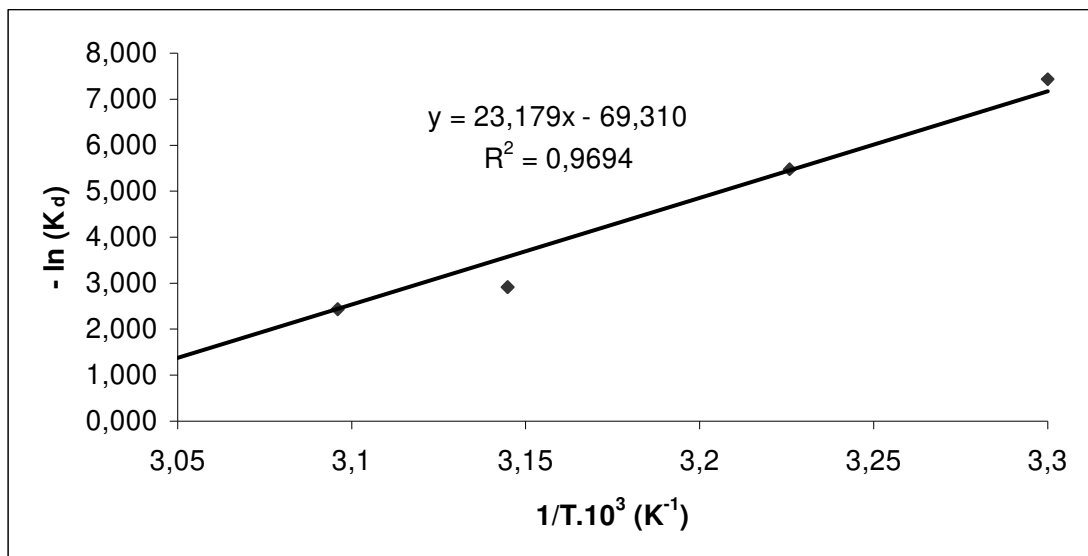


Figura 30. Linearização dos valores de  $K_d$  em função da temperatura (K) para o cálculo da energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da lipase do microrganismo AAV1.

Analisando a Figura 30 foi possível calcular a energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) igualando a equação da reta ( $\ln K_d = 69,310 - 23179.1/T$ ) com a equação de Arrhenius ( $\ln K_d = \ln K - E_{ad}/RT$ ). Obtendo-se então  $E_{ad}/R = 23179$ , e multiplicando pela constante de gases ( $R = 1,98 \text{ cal/mol.K}$ ) obtemos  $E_{ad} = 45,89 \text{ Kcal/mol}$  ou  $192,02 \text{ KJ/mol}$ . Burkert (2003) registrou para a lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 uma energia de ativação de desnaturação de  $330,12 \text{ KJ/mol}$ , superior a  $E_{ad}$  registrada para a lipase em estudo (AAV1), demonstrando que esta enzima é bem menos estável termicamente que a lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552.

Calculado a energia de ativação de desnaturação foi possível obter a equação final de Arrhenius, para tanto calculamos o valor de K (constante de Arrhenius) a partir de  $\ln K = 69,310$  e obtemos  $K = 1,262 \times 10^{-30}$ . Desta forma, a expressão obtida para determinar os valores de  $K_d$  estimados está expressa na Equação abaixo.

$$K_d = 1,262 \times 10^{-30} \exp^{(-23179/T)} \quad (\text{Eq. 05})$$

A partir da Equação 05 foi possível estimar os valores de  $K_d$  e meia vida em função da temperatura analisada. Os valores estimados de  $K_d$  e  $t_{1/2}$  foram semelhantes aos valores experimentais principalmente nas temperaturas de 50°C e 37°C (Tabela 32).

Tabela 32. Valores experimentais e estimados da constante de desnaturação ( $k_d$ ) a meia vida ( $t_{1/2}$ ) para as temperaturas estudadas para o microrganismo AAV1.

Temperatura (°C)	$K_d$ experimental ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ experimental (h)	$K_d$ estimado ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ estimado (h)
55	$1,68 \cdot 10^{-1}$	0,069	$2,57 \cdot 10^{-1}$	0,045
50	$8,79 \cdot 10^{-2}$	0,131	$8,62 \cdot 10^{-2}$	0,134
45	$5,41 \cdot 10^{-2}$	0,213	$2,79 \cdot 10^{-2}$	0,414
37	$4,10 \cdot 10^{-3}$	2,818	$4,20 \cdot 10^{-3}$	2,750
30	$6,00 \cdot 10^{-4}$	19,254	$7,00 \cdot 10^{-4}$	16,504

Conforme a Tabela 32, a enzima deste microrganismo (AAV1) apresentou o mesmo comportamento do microrganismo anterior, a medida que se aumenta a temperatura, menor é a estabilidade da enzima. De acordo com Maldonado (1996) a lipase de *Geotrichum candidum* perde estabilidade em temperaturas superiores a 37°C, com valores de meia vida que diminuem consideravelmente com o aumento da temperatura.

A lipase do microrganismo AAV1 é mais estável a baixas temperaturas, como a 30°C, onde apresentou um  $K_d = 6,00 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  e uma meia vida de 19,25, superior ao valor encontrado para a enzima do microrganismo AC02 que foi de 16,50 horas, demonstrando ser um pouco mais estável (aproximadamente 3 horas a mais) que a enzima citada anteriormente.

### ➤ **Microrganismo AY3**

Este microrganismo apresentou como ótimo pH = 6,6 para a reação enzimática, então o caldo fermentado foi incubado em tampão fosfato 100 mM pH 6,6 em diferentes temperaturas: 30, 37, 45, 50, 55 °C. Conforme citado anteriormente, a cada tempo pré-determinado foram retiradas amostras e determinada a atividade lipolítica (U) e atividade relativa ( $U/U_0$ ) da enzima em estudo. Com os resultados obtidos nas incubações foi possível

graficar o logarítmico natural da atividade relativa ( $U/U_0$ ) em função do tempo para posterior determinação da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para cada temperatura estudada, conforme foi demonstrado para o microrganismo AC02 anteriormente.

Os valores de  $K_d$  foram calculados para cada temperatura estudada igualmente como foi calculado para os microrganismos AC02 e AAV1 e então foi possível construir a Tabela 33, que apresenta os valores de  $K_d$  e suas respectivas temperatura e também o logarítmico natural de  $K_d$  para posterior construção da Figura 31 e calcular a energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da enzima através da metodologia de Arrhenius conforme Equação 03 citada no item 4.5.2.3.

Tabela 33. Valores de  $K_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ) e suas respectivas temperaturas para a lipase do microrganismo AY3.

Temperatura (°C)	(K)	$1/T \cdot 10^3$	$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$-\ln(K_d)$
55	328	3,049	$2,96 \cdot 10^{-1}$	1,219
50	323	3,096	$1,69 \cdot 10^{-1}$	1,778
45	318	3,145	$6,64 \cdot 10^{-2}$	2,712
37	310	3,226	$4,80 \cdot 10^{-3}$	5,339
30	303	3,300	$7,00 \cdot 10^{-4}$	7,264

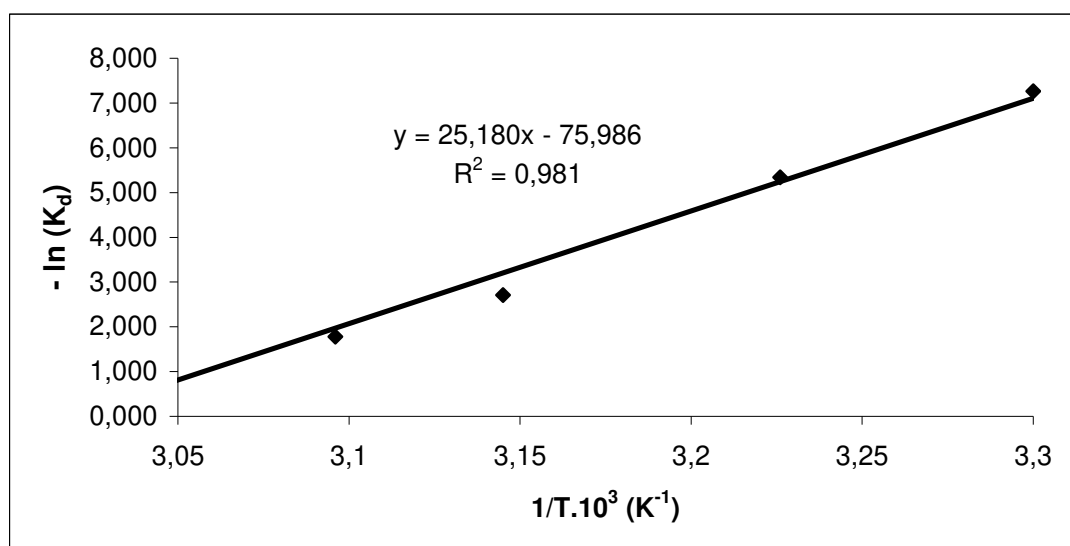


Figura 31. Linearização dos valores de  $K_d$  em função da temperatura (K) para o cálculo da energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da lipase do microrganismo AY3.



Através da Figura 31 foi calculada a energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) igualando a equação da reta ( $\ln K_d = 75,986 - 25180.1/T$ ) com a equação de Arrhenius ( $\ln K_d = \ln K - E_{ad}/RT$ ). Obtendo-se então  $E_{ad}/R = 25180$  e multiplicando pela constante de gases ( $R = 1,98 \text{ cal/mol.K}$ ) obtemos  $E_{ad} = 49,86 \text{ Kcal/mol}$  ou  $208,60 \text{ KJ/mol}$ . Esta energia de ativação de desnaturação foi superior as outras lipases estudadas (AC02 e AAV1) que apresentaram  $E_{ad}$  de  $203,68 \text{ KJ/mol}$  e  $192,02 \text{ KJ/mol}$  respectivamente, demonstrando assim que esta lipase proveniente da cepa AY3 necessita de uma maior energia para sua desnaturação do que as demais lipases estudadas.

Para a determinação da equação final de Arrhenius, calculamos o valor de K (constante de Arrhenius) a partir de  $\ln K = 75,986$  e obtemos  $K = 1,001 \times 10^{33}$ . Desta forma, a expressão obtida para determinar os valores de  $K_d$  estimados está expressa na Equação abaixo.

$$K_d = 1,001 \times 10^{33} \exp^{(-25180/T)} \quad (\text{Eq. 06})$$

A partir da Equação 06 estimamos os valores de  $K_d$  e meia vida em função da temperatura conforme expresso na Tabela 34.

Tabela 34. Valores experimentais e estimados da constante de desnaturação ( $k_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para as temperaturas estudadas para o microrganismo AY3.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b><math>K_d</math> experimental (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> experimental (h)</b>	<b><math>K_d</math> estimado (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> estimado (h)</b>
55	$2,96.10^{-1}$	0,039	$4,57.10^{-1}$	0,025
50	$1,69.10^{-1}$	0,069	$1,39.10^{-1}$	0,083
45	$6,64.10^{-2}$	0,174	$4,09.10^{-2}$	0,282
37	$4,80.10^{-3}$	2,407	$5,30.10^{-3}$	2,180
30	$7,00.10^{-4}$	16,503	$8,00.10^{-4}$	14,440

Na Tabela 34, verifica-se valores de  $K_d$  experimentais foram semelhantes ao valores estimados pela Equação 06, e que a enzima deste microrganismo também foi mais estável em 30°C, onde apresentou um  $K_d = 7,00 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  e um tempo de meia vida de 16,503 horas igual aos valores de  $K_d$  e  $t_{1/2}$  encontrado para a enzima do microrganismo AC02 a 30°C.

As lipases dos 3 microrganismos selecionados (AC02, AAV1 e AY3) apresentaram comportamentos bem semelhantes, sendo mais estáveis á baixas temperaturas conforme pode ser visualizado na Tabela 35 e Figura 32.

Tabela 35. Valores experimentais de meia vida ( $t_{1/2}$ ) nas diferentes temperaturas estudadas para as lipases provenientes dos 3 microrganismos selecionados.

	ACO2 (pH 7,0)	AAV1 (pH 7,0)	AY3 (pH 6,6)
Temperatura (°C)	$t_{1/2}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)
55	0,045	0,069	0,039
50	0,082	0,131	0,069
45	0,160	0,213	0,174
37	2,567	2,818	2,407
30	16,503	19,254	16,503

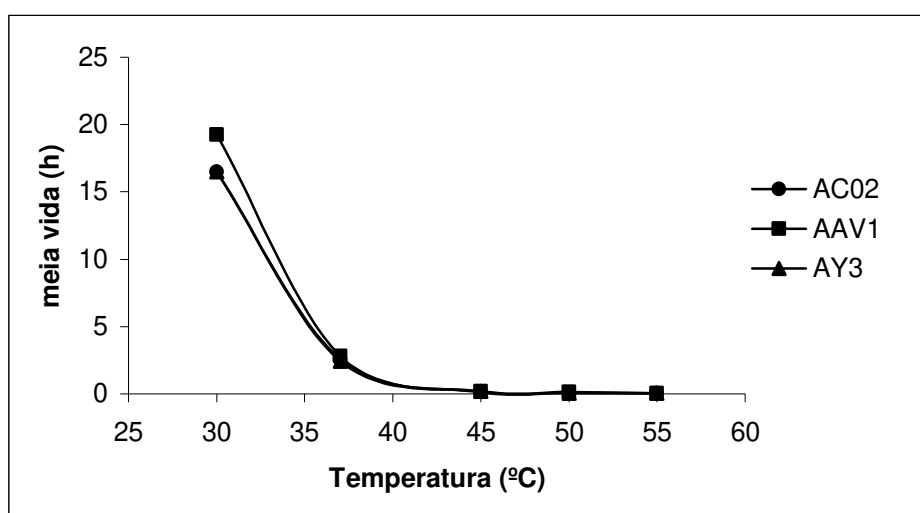


Figura 32. Perfil de estabilidade térmica para as lipases provenientes dos microrganismos AC02, AAV1 e AY3.

De acordo com a Figura 32, verifica-se que as lipases estudadas apresentaram o mesmo perfil de estabilidade térmica, sendo mais estáveis à 30°C e apresentando meia vida inferior à 20 horas de incubação. E quando aumentada a temperatura para 37°C cai ainda mais a meia vida das lipases, sendo registrado meias vidas em torno de 2 a 3 horas de incubação para as 3 lipases estudadas. Segundo Abbas et al. (2002) que estudaram a lipase de *Mucor* sp. isolada do fruto da palmeira e avaliaram a sua estabilidade térmica, registram na temperatura de 30°C a maior estabilidade da enzima.

Segundo Freire (1996) a lipase do *Penicillium restrictum* mostrou-se bastante estável nas temperaturas de 30°C e 37°C, com meias vidas de 4808 e 67 horas respectivamente, valores estes superiores aos registrados para as lipases estudadas.

Segundo Carvalho et al. (2005) as lipases de *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium solitum* são estáveis (mantém 100% da atividade) na faixa de temperatura de 35 à 45°C, sendo praticamente inativadas à 70 °C.

Os valores ótimos de atividade e estabilidade reportados na literatura, em geral, situam-se na faixa de 30°C e 40°C, com exceção das lipases provenientes de fungos termófilos como *Humicola lanuginosa*, estáveis em temperaturas superiores a 55°C (FREIRE, 1996). Isto demonstra que as lipases estudadas (AC02, AAV1 e AY3) estão dentro da faixa ótima de estabilidade reportada pela literatura.

É importante salientar que as propriedades cinéticas e de estabilidade das enzimas podem variar simplesmente em função da origem, do meio de cultura utilizado ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo. Estas variações também dependem das condições do ensaio, como tempo de incubação, pH e temperatura, do método e do substrato utilizado, tornando muitas vezes difícil comparação (CARVALHO et al., 2005).

### 5.3.3 Estabilidade de pH

A estabilidade de pH das lipases proveniente dos 3 microrganismos selecionados (AC02, AAV1 e AY3) foi estudada através da determinação da meia vida da enzima. De cada solução incubada foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados e determinou-se as constantes de desnaturação ( $K_d$ ) e meia vida ( $t_{1/2}$ ) em função dos pHs analisado.

Cada microrganismo estudado apresentou uma temperatura ótima para a reação enzimática. A enzima do microrganismo AC02 teve como ótima a temperatura de 44°C, para a lipase do microrganismo AAV1 foi registrada uma temperatura ótima de 47°C, enquanto que para o microrganismo AY3 a temperatura ótima foi de 37°C. Logo, o caldo fermentado de cada microrganismo (AC02, AAV1 e AY3) foi incubado em sua temperatura ótima (44°C, 47°C e 37°C respectivamente) em diferentes valores de pH de tampão fosfato 100 mM (5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 8,0). A cada tempo pré-determinado foram retiradas amostras e determinadas a atividade lipolítica (U) e atividade relativa ( $U/U_0$ ) da enzima em estudo.

Os resultados obtidos com as incubações em diferentes pHs para o microrganismo AC02 a temperatura de 44°C estão expressos nas Tabelas 36 à 40. Graficou-se o logarítmico natural da atividade relativa ( $U/U_0$ ) em função do tempo para posterior determinação do valor  $K_d$  para cada pH estudado. Um exemplo do cálculo do  $K_d$  é mostrado através da Figura 33 para o pH 8,0.

Tabela 36. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 5,5.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>U/U<sub>0</sub></b>	<b>- ln (U/U<sub>0</sub>)</b>
0	2,43	1,000	0,000
3	2,00	0,823	0,195
5	1,77	0,728	0,317
10	1,00	0,412	0,887
15	0,83	0,342	1,073
30	0,43	0,177	1,732

Tabela 37. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 6,0.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>U/U<sub>0</sub></b>	<b>- ln (U/U<sub>0</sub>)</b>
0	2,43	1,000	0,000
5	1,87	0,769	0,263
10	1,30	0,535	0,625
15	1,14	0,467	0,761
30	0,77	0,317	1,149
60	0,33	0,136	1,995

Tabela 38. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 6,5.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>U/Uo</b>	<b>- ln (U/Uo)</b>
0	2,00	1,000	0,000
5	1,80	0,900	0,105
10	1,47	0,735	0,308
15	1,27	0,635	0,454
30	1,10	0,550	0,598
60	0,63	0,315	1,155

Tabela 39. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 7,0.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>U/Uo</b>	<b>- ln (U/Uo)</b>
0	2,33	1,000	0,000
5	2,23	0,957	0,044
10	2,03	0,871	0,138
15	1,86	0,798	0,226
30	1,50	0,640	0,446
60	1,20	0,515	0,664
120	0,67	0,288	1,245

Tabela 40. Atividade lipolítica em função do tempo de incubação em pH 8,0.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>U/Uo</b>	<b>- ln (U/Uo)</b>
0	2,07	1,000	0,000
5	1,90	0,918	0,086
10	1,40	0,676	0,392
15	1,13	0,546	0,605
30	0,86	0,415	0,879
60	0,53	0,256	1,363

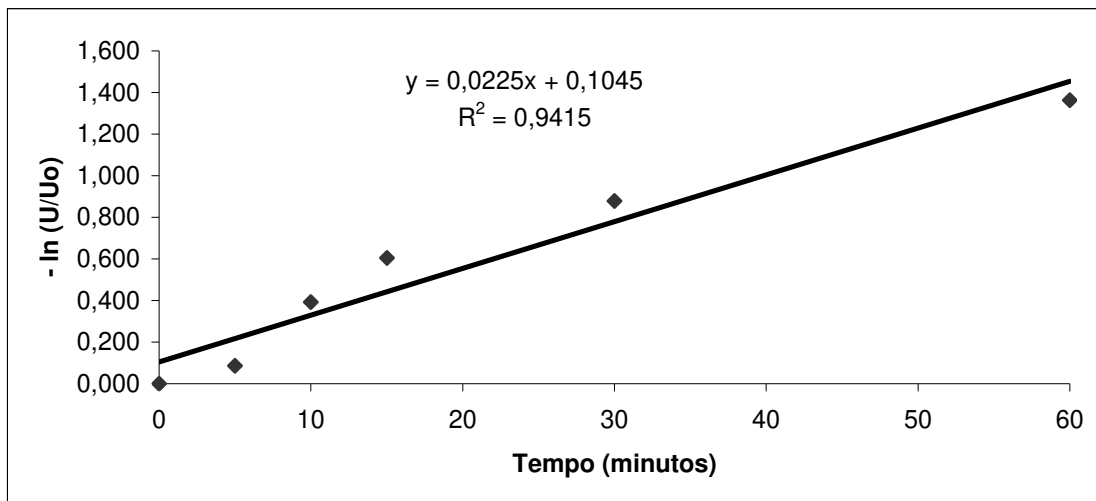


Figura 33. Efeito do pH em função do tempo de incubação para a lipase do microrganismo AC02, para cálculo da constante de desnaturação ( $K_d$ ) no pH 8,0.

Através da Figura 33 foi possível calcular a constante de desnaturação para a o pH 8,0, onde a inclinação da reta equivale ao valor de  $K_d = 0,0225 \text{ min}^{-1}$ . Com o valor de  $K_d$  foi possível calcular o tempo de meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ ) para o pH 8,0, através da Equação 02 citada no item 4.5.2.2, obtendo  $t_{1/2} = 30,806$  minutos ou 0,513 Horas. Da mesma forma foi calculado o  $K_d$  e  $t_{1/2}$  para cada pH avaliado na enzima proveniente do microrganismo AC02 e também para as enzimas dos demais microrganismos (AAV1 e AY3) em diferentes valores de pH.

Os resultados da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e meia vida ( $t_{1/2}$ ) dos diferentes pHs estudados (5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 8,0) para as lipases provenientes dos 3 microrganismos seleccionados (AC02, AVV1 e AY3) estão expressos na Tabela 41.

As lipases dos microrganismo seleccionados apresentaram temperaturas elevadas como ótimas para a reação enzimática, e em função desta temperatura foram incubados para a determinação da estabilidade de pH e por isso apresentaram meia vida não muito elevados (Tabela 41), pois a estabilidade da enzima é em função da temperatura e do pH estudado, sendo que em temperaturas mais baixas, se obtêm maiores estabilidades.

Tabela 41. Valores experimentais da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e de meia vida ( $t_{1/2}$ ) nos diferentes pHs estudados para as lipases provenientes dos 3 microrganismos seleccionados.

pH	AC02 (T=44°C)		AAV1 (T=47°C)		AY3 (T=37°C)	
	K <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (h)	K <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (h)	K <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (h)
8,0	2,25.10 <sup>-2</sup>	0,513	1,32.10 <sup>-2</sup>	0,875	8,20.10 <sup>-3</sup>	1,409
7,0	1,02.10 <sup>-2</sup>	1,133	6,80.10 <sup>-3</sup>	1,699	4,40.10 <sup>-3</sup>	2,625
6,5	1,85.10 <sup>-2</sup>	0,624	1,22.10 <sup>-2</sup>	0,947	3,00.10 <sup>-3</sup>	3,851
6,0	3,15.10 <sup>-2</sup>	0,367	1,39.10 <sup>-2</sup>	0,831	1,10.10 <sup>-2</sup>	1,050
5,5	5,85.10 <sup>-2</sup>	0,195	2,41.10 <sup>-2</sup>	0,479	2,31.10 <sup>-2</sup>	0,500

Conforme a Tabela 41 verifica-se que a lipase do microrganismo AY3 teve um comportamento diferente das demais lipases estudadas, apresentando maior estabilidade em pH 6,5 enquanto que as lipases das leveduras AC02 e AAV1 apresentaram maior estabilidade em pH 7,0. Isso pode ser justificado, devido ao fato das lipases (AC02 e AAV1) terem apresentado como ótimo para a reação enzimática pH de 7,0 como foi demonstrado anteriormente na realização do planejamento experimental. Já a lipase da leveduras AY3 apresentou um pH ótimo de 6,6 para reação enzimática no estudo anterior, justificando assim a maior estabilidade em pH 6,5 onde registrou um tempo de meia vida de 3,851 horas.

Estes resultados registrados de estabilidade de pH vêm ao encontro dos registrados para lipases fúngicas segundo Carvalho et al. (2005), onde as lipases de *Geotrichum candidum* e *Penicillium solitum* são estáveis em valores de pH que variam de 5,5 à 7,5. Já as lipases de *Aspergillus niger* mantêm sua atividade em valores de pH de 6,0 à 8,0.

Abbas et al. (2002) registraram para a lipase de *Mucor* sp. estabilidade numa faixa de pH de 5,0 à 7,0 após 24 horas de incubação, apresentado perdas de atividade enzimática menores que 20%.

Geralmente a maioria das lipases fúngicas apresentam uma faixa ótima de atividade e estabilidade ao pH que oscilam entre 6,0 e 8,0. Entretanto são encontradas lipases provenientes de *Aspergillus* e *Rhizopus* que são estáveis em pHs menores que 4,5 e outras produzidas por *Aspergillus* e *Penicillium* que apresentam boas estabilidades em pHs maiores que 8,5 (FREIRE,1996).

O comportamento da meia vida em relação aos pHs estudados para as e enzimas selecionadas pode ser melhor visualizado na Figura 34.

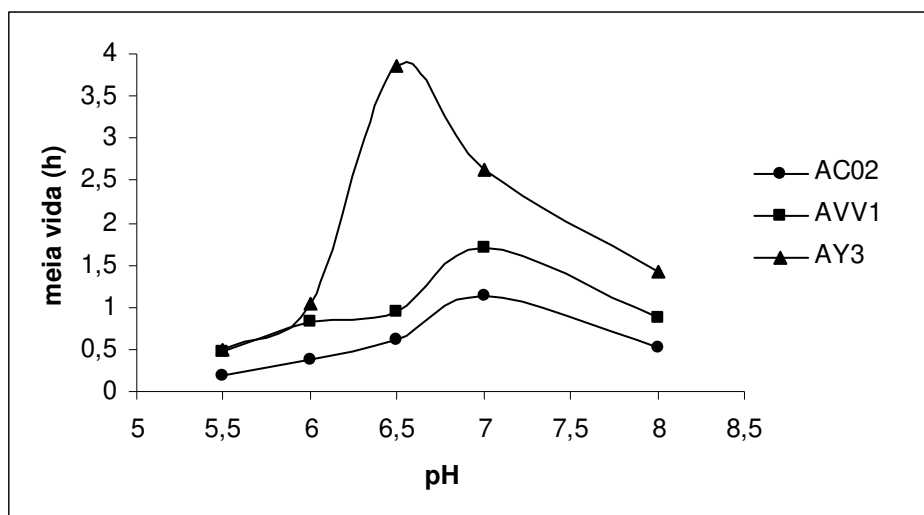


Figura 34. Perfil de estabilidade de pH para as lipases provenientes dos microrganismos AC02, AAV1 e AY3.

De acordo com a Figura 34, constata-se que o microrganismo AY3 apresentou maiores meias vidas em todos os pHs estudados quando comparado com as demais lipases analisadas, apresentando maior estabilidade a pH 6,5. Isso deve-se pelo fato que esta enzima foi incubada a uma temperatura de 37°C, inferior às temperaturas de incubação das demais enzimas, proporcionando assim maiores resultados de estabilidade. Quando comparado à lipase do microrganismo AC02, que foi incubada a 44°C e, com a lipase do microrganismo AAV1, incubada a 47°C, verifica-se que por maior que seja a temperatura de incubação, a enzima (AAV1) apresentou maior estabilidade em todos os pH estudados do que a enzima (AC02), que foi incubada em temperatura inferior.

O binômio pH e temperatura tem sido amplamente estudado e considerado um fator de grande influência na atividade e estabilidade das enzimas. As lipases de *Aspergillus* têm demonstrado propriedades cinéticas e de estabilidade bastante diversificadas, podendo simplesmente variar em função da origem, método de ensaio empregado, tempo de incubação entre outros (CARVALHO et al., 2005).

No entanto as lipases das 3 cepas estudadas registraram maiores estabilidades de pH dentro da faixa ótima de pH (6,0 à 8,0) reportada pela literatura segundo Freire (1996). Sendo que para as lipases provenientes dos microrganismos AC02 e AAV1 apresentaram maior estabilidade em pH 7,0 enquanto que a lipase (AY3) apresentou maior estabilidade em pH 6,5.



## 5.4 ESPECIFICIDADE DE SUBSTRATO

O estudo da especificidade de substrato das lipases provenientes das 3 leveduras selecionadas (AC02, AAV1 e AY3) foi realizado através da determinação da atividade lipolítica (item 4.3.1) utilizando como substratos triglicerídeos com diferentes cadeias de carbono ( $C_4$ ,  $C_8$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{18:1}$ ) conforme Figura 35. A atividade relativa foi calculada em relação atividade lipolítica padrão, que utiliza óleo de oliva como substrato (100%).

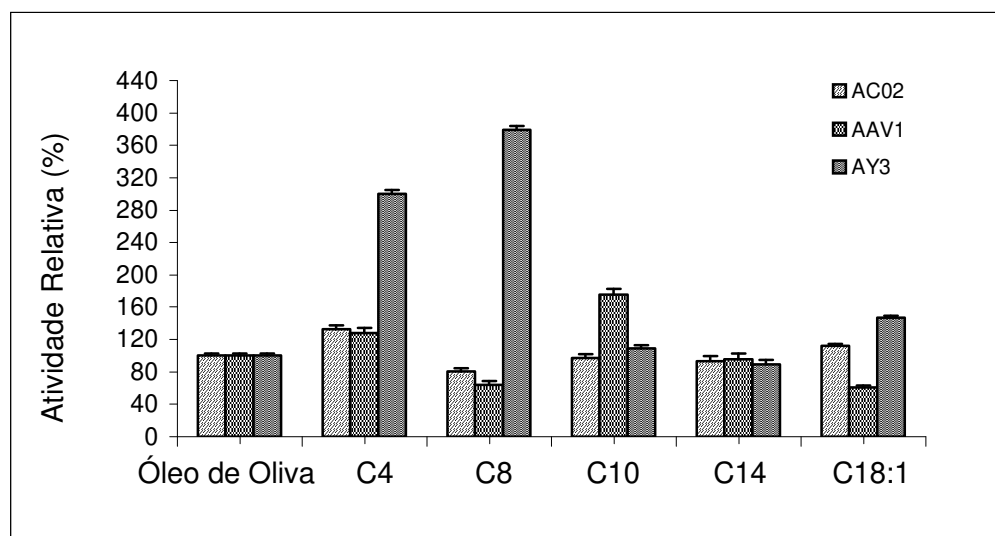


Figura 35. Atividade Relativa das lipases (AC02, AAV1 e AY3) em diferentes triglicerídeos.

De acordo com a Figura 35, a lipase da levedura AY3 registrou maior atividade relativa (378,9%) em tricaprilina ( $C_8$ ), demonstrando grande especificidade por este triglicerídeo. Este comportamento com maior especificidade em triglicerídeos com 8 carbonos também foi verificado por Abbas et al. (2002), onde a lipase do *Mucor* sp. apresentou maior atividade em tricaprilina ( $C_8$ ) quando comparado com diversas fontes de lipídeos, demonstrando assim ser mais específica para a degradação de triglicerídeos de cadeia média.

A lipase proveniente da cepa AY3 também apresentou atividade lipolítica 3 vezes superior em tributirina ( $C_4$ ) quando comparado com óleo de oliva, demonstrando maior especificidade por triglicerídeos de curta e média cadeia. Porém também apresentou especificidade em relação a trioleína ( $C_{18:1}$ ) registrando uma atividade relativa de 146,6%,

apresentou também especificidade por triglicerídeos de cadeia longa com insaturação. Estes resultados são semelhantes aos registrados por Baron et al. (2007) quando estudaram a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 e verificaram que a atividade hidrolítica da lipase aumentava com o decréscimo da cadeia acíclica. Onde a maior atividade lipolítica foi registrada em tributirina (C<sub>4</sub>), depois em tricaprilina (C<sub>8</sub>) e por fim em trioleína (C<sub>18:1</sub>). Yu et al. (2007) estudaram a lipase de *Yarrowia lipolytica* (YLip2) e verificaram a especificidade de substrato da enzima em diferentes triglicerídeos à 40°C e pH 8,0. Sendo registrada a maior atividade específica em tributirina (C<sub>4</sub>), e conforme o aumento da cadeia carbônica foi diminuindo a atividade da enzima.

A lipase da levedura nomeada AAV1 apresentou uma atividade relativa de 128,2% em tributirina (C<sub>4</sub>), 175,7% em tricoprina (C<sub>10</sub>) e 95,6% em trimiristina (C<sub>14</sub>) demonstrando assim ser específica por triglicerídeos de curta, média e longa cadeia. Um comportamento semelhante foi registrado para a lipase (AC02) que registrou uma atividade relativa de 133,10% em tributirina (C<sub>4</sub>), 97,2% em tricoprina (C<sub>10</sub>) e 112,30% em trioleína (C<sub>18:1</sub>), apresentando especificidade por substratos de diferentes cadeia de carbonos, sem grandes variações em função do número de carbonos. Estes resultados são semelhantes aos registrados segundo Xu (2000), onde as lipases de *Aspergillus niger*, *Candida lipolytica*, e *Humicola lanuginosa* são específicas para substratos de curta, média e longa cadeia de carbonos.

Ciafardini et al. (2006) verificaram atividade lipolítica de espécies de leveduras provenientes de óleo de oliva extra virgem, e verificaram as espécies *S. cerevisiae* e *W. californica* apresentaram especificidade em diferentes triglicerídeos (trioleína e tripalmitina) em também em p-Nitrofenilpalmitato.

Gupta et al. (2002) verificaram a especificidade de substrato na lipase de *Bacillus stearothermophilus* (BSL) e na lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) quando submetidos a diferentes triglicerídeos como substratos, registrando maiores atividades lipolíticas para triglicerídeos de longa cadeia carbônica para ambas as lipases. Porém a lipase BCL apresentou maior especificidade por triglicerídeos de cadeia longa insaturados e a lipase BSL apresentou maior especificidade por triglicerídeos de cadeia longa saturados.

Segundo os autores Foglia et al. (1993), Pabai et al. (1995) e Castro et al. (2004), o caso mais clássico é da lipase de *Geotrichum candidum* que é específica para ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação na posição cis-9.

Entretanto, as carboxilesterases se diferem entre si através da sua especificidade a diferentes substratos e propriedades cinéticas. A descoberta de lipases com especificidades diferentes das já reportadas na literatura, através de programas de isolamento e seleção, pode ampliar ainda mais o campo de aplicação nas áreas de química fina e de óleos e gorduras. Esta propriedade de atuarem seletivamente sobre seus substratos depende da fonte da enzima e apresentam, a exemplo das demais propriedades gerais, uma grande diversidade (FREIRE, 1996, CASTRO et al., 2004).

## 5.5 SÍNTESE DE ÉSTERES EM MEIO ORGÂNICO

Para verificar a capacidade biocatalítica das lipases, foi realizada síntese de ésteres em meio orgânico (esterificação). Duas reações foram estudadas, a produção de heptil oleato e etil oleato na presença de solvente orgânico (isooctano). Essas reações de síntese foram realizadas por preparações brutas de lipases liofilizadas das 3 leveduras selecionadas (AC02, AAV1 e AY3) e também por uma enzima comercial (Lipozyme IM).

### 5.5.1 Síntese de Heptil Oleato

A síntese do heptil oleato é um ótimo teste comparativo de seletividade, considerado como uma reação padrão para verificar a atividade biocatalítica das lipases em meio orgânico (CARDENAS et al., 2001).

A mistura reacional foi composta de 20 mM de ácido oléico e 20 mM de heptanol, utilizado como solvente orgânico o isooctano e como padrão interno o octanol. A porcentagem de esterificação das lipases foi calculada através da concentração de álcool consumido, neste caso, heptanol, conforme Equação 07.

$$\xi = \frac{(C_0 - C)}{C_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 07})$$

Onde:  $\xi$  = porcentagem de esterificação;  $C_0$  = concentração inicial de álcool;  $C$  = concentração residual de álcool.

Através da Equação 07 e da concentração residual de heptanol foi possível calcular a porcentagem de esterificação das lipases utilizadas na reação de síntese conforme expresso na Tabela 42.

Tabela 42. Valores residuais de heptanol nas amostras e porcentagem de esterificação.

<b>Amostras</b>	<b>*Heptanol Residual (mM)</b>	<b>% Esterificação</b>
ACO2	16,0 ± 0,11	20
AAV1	14,0 ± 0,03	30
AY3	13,7 ± 0,04	31,5
Comercial	6,0 ± 0,05	70

\*Concentração de heptanol residual multiplicada por 10 (diluição).

Os cromatogramas das amostras (ACO2, AAV1, AY3 e Comercial) e os tempos de retenção dos compostos da mistura reacional estão em Anexos 1, 3, 5 e 7 respectivamente.

Conforme a Tabela 42, as enzimas das 3 cepas de leveduras estudadas apresentaram capacidade biocatalítica, sendo consideradas então lipases verdadeiras. Segundo Cardenas et al. (2001) a esterificação de ácido oléico com heptanol (síntese do heptil oleato) é uma reação padrão utilizada para diferenciar lipases (atividade biocatalítica), esterases (baixa atividade biocatalítica < 10%) e proteases (sem atividade biocatalítica).

Domínguez de Maria et al. (2002) estudaram a síntese do heptil oleato como método utilizado para diferenciar lipases de esterases. Verificaram que as lipases de *C. rugosa* e *P. cepacia* foram as enzimas que apresentaram maiores porcentagem de esterificação entre 60 e 90%, enquanto que a esterase de *S. cerevisiae* apresentou apenas 8% de esterificação.

A enzima AY3 apresentou a melhor porcentagem de esterificação (31,5%) quando comparada com as lipases ACO2 e AAV1 que apresentaram 20% e 30% de esterificação. Porém esta lipase apresentou um percentual de esterificação inferior quando comparado com a enzima comercial (Lipozyme IM) que apresentou 70% de esterificação. Isso pode ser justificado pelo fato que as amostras de lipase provenientes das leveduras selecionadas, não foram purificadas e apresentavam atividades lipolíticas bem inferiores que a comercial.

Entretanto as lipases estudadas (ACO2, AAV1 e AY3) apresentaram capacidade biocatalítica, consideradas então lipases verdadeiras, porém inferiores as registradas nas mesmas condições reacionais e após 24 horas de reação por Cardenas et al. (2001) que

registraram percentuais de esterificação para diversas lipases estudadas entre 44 e 91%. Sendo a mínima conversão em éster registrada para o microrganismo *A. murorum* (44%) e a máxima conversão (91%) para o microrganismo *F. poae*. Sendo necessária uma otimização das condições reacionais para aumentar a conversão de ésteres das leveduras em estudo em trabalhos futuros, pois neste trabalho tínhamos apenas o intuito de verificar se essas lipases apresentavam ou não capacidade biocatalítica.

### 5.5.2 Síntese de Etil Oleato

A síntese do etil oleato foi realizada em comparativo com a síntese do heptil oleato para verificar qual álcool utilizado na mistura reacional proporciona maior porcentagem de esterificação.

A mistura reacional foi composta de 20 mM de ácido oléico e 20 mM de etanol, utilizado como solvente orgânico o isooctano e como padrão interno o octanol. A porcentagem de esterificação das lipases foi calculada através da concentração de álcool consumido, neste caso, etanol, conforme Equação 07 citada anteriormente.

Através da Equação 07 e da concentração residual de etanol foi possível calcular a porcentagem de esterificação das lipases utilizadas na reação de síntese conforme expresso na Tabela 43.

Tabela 43. Valores residuais de etanol nas amostras e porcentagem de esterificação.

<b>Amostras</b>	<b>*Etanol Residual (mM)</b>	<b>% Esterificação</b>
ACO2	9,1 ± 0,03	54,5
AVV1	9,7 ± 0,08	51,5
AY3	11,6 ± 0,10	42
Comercial	5,2 ± 0,02	74

\*Concentração de etanol residual multiplicada por 10 (diluição).

Os cromatogramas das amostras (ACO2, AAV1, AY3 e Comercial) e os tempos de retenção dos compostos da mistura reacional estão em Anexos 2, 4, 6 e 8 respectivamente.

Analisando a Tabela 43, verifica-se que a enzima AC02 apresentou a melhor porcentagem de esterificação (54,5%) quando comparada com as lipases AAV1 e AY3 que apresentaram 51,5% e 42% respectivamente. Porém estes percentuais de esterificação também foram inferiores a enzima comercial (Lipozyme IM) que apresentou 74% de esterificação. Estes resultados estão próximos aos registrados por Sandoval & Marty (2007) que avaliaram métodos de seleção para avaliar a atividade de síntese das lipases, sendo realizada a reação de esterificação de ácido oléico com etanol. A maior atividade de síntese foi registrada para a cepa de *Y. lipolytica* JMY329 que apresentou atividade de 4,3 U/mL e 58% de esterificação.

Bucalá et al. (2006) realizaram um planejamento experimental para verificar as melhores condições de esterificação do etil oleato para a lipase de *Candida antarctica* do tipo B. As variáveis analisadas foram: relação molar entre etanol e ácido oléico, temperatura, concentração de água e concentração de enzima imobilizada. As porcentagens de esterificação ao longo do planejamento variaram de 10,8% à 90,8%, demonstrando o quão o processo é influenciado pelas variáveis em estudo. A melhor condição registrada foi: temperatura de reação de 45°C, razão molar igual a 10, concentração de água nula e 10% de enzima imobilizada.

Vários estudos vêm sendo realizados utilizando etanol para produção de ésteres (esterificação) ou para produção de biodiesel a partir de óleos vegetais (interesterificação). Costa Filho et al. (2007) estudaram a produção de biodiesel a partir da alcóolise enzimática de óleo de soja com etanol, catalisada por lipase comercial do tipo B *Candida antarctica* (Novozyme 435). Foi realizado um planejamento experimental onde avaliaram temperatura, agitação e fração molar dos substratos na conversão da alcóolise enzimática de óleo de soja em biodiesel, sendo registrada uma conversão máxima de 61,8%.

As enzimas apresentam diferentes comportamentos, dependendo das condições operacionais empregadas, da relação molar entre os substratos, solventes empregados e concentração de água (BUCALÁ et al. 2006).

Nas reações de síntese, tais como esterificação e interesterificação, para se obter maior concentração de produto é essencial utilizar solvente orgânico no qual o coeficiente de partição do produto seja elevado. Essas reações são geralmente consideradas possíveis em solventes imicíveis em água e que apresentam log P (logaritmo do coeficiente de partição) maior que 4 (FACCIO, 2004). No nosso estudo foi utilizado o isooctano como solvente, e de

acordo com Faccio (2004) o isooctano apresenta um  $\log P = 4,5$ , o que proporcionou um bom rendimento de na conversão de éter.

No entanto comparando as 2 reações de síntese realizadas, foi possível verificar que as maiores porcentagens de esterificação ocorreram quando foi utilizado etanol ao invés de heptanol como componente reacional. Isso pode ser justificado pelo fato de ser um álcool de cadeia mais curta, sendo assim mais facilmente assimilado pelas lipases, podendo variar de acordo com a origem e especificidade da enzima. Contudo, este resultado foi favorável, pois no cenário Brasileiro, o etanol tem grande força desde que o Brasil se tornou o maior produtor mundial, e também devido ao fato de que o etanol é obtido de um recurso renovável (FACCIO, 2004).

## 6 CONCLUSÕES

A primeira etapa de seleção das 372 leveduras silvestres foi o cultivo em meio sólido, sendo utilizando como critério para selecionar as leveduras produtoras de lipase, a presença de halos de hidrólise ao redor das colônias. As leveduras que apresentaram maiores halos (44 leveduras) foram pré-selecionadas como produtoras de lipase extracelular e posteriormente foram selecionadas em meio líquido;

Outro critério utilizado para selecionar as leveduras mais produtoras de lipase, foi através da determinação da atividade lipolítica da enzima no decorrer das 48 horas de fermentação líquida. Nesta etapa das 44 cepas pré-selecionadas, 11 cepas mereceram importante destaque, sendo elas: AAB10 (Cerrado), J06 (Pantanal), AF4 (Floresta Amazônica), AAV1 (Resíduo de Queijo), U1, Z06, T07, AD12, AC02 (Mata Atlântica I) e AY3, AY13 (Mata Atlântica II) que apresentaram as maiores atividades lipolíticas, sendo consideradas como microrganismos com potencial promissor para produção de lipase;

Através do estudo realizado em 2 meios de cultivos distintos (enriquecido e não enriquecido), pode-se então selecionar 3 cepas de leveduras silvestres dentre as 11 pré-selecionadas, sendo: AC02 e AAV1 que apresentaram as maiores atividades lipolíticas no meio enriquecido, deste modo altas concentrações de peptona foram favoráveis para a produção de lipase para estes microrganismos. E a levedura AY3 que apresentou maiores atividades lipolíticas quando cultivada em meio não enriquecido;

De um total de 372 microrganismos isolados de amostras do solo, caules, frutos e principalmente flores colhidas de diversas regiões brasileiras, foi possível selecionar apenas 3 cepas de leveduras que produziram maiores atividades em meio líquido. O que demonstra o quão árduo é o trabalho de isolamento e seleção de microrganismo para produção de uma enzima;

Na segunda etapa do trabalho, as lipases provenientes das leveduras selecionadas foram caracterizadas físico-quimicamente e apresentaram comportamentos distintos. Para a lipase produzida pelo microrganismo AC02, obtemos como condições ótimas para a reação enzimática pH 7,0 e temperatura 44°C, para a lipase do microrganismo AAV1, também obtemos como ótimo o pH 7,0 porém uma temperatura um pouco mais elevada, 47°C. Enquanto que para a enzima produzida pela levedura AY3, as condições ótimas de temperatura e pH na reação enzimática foram 37°C respectivamente;



Quanto a estabilidade térmica as lipases dos 3 microrganismos selecionados apresentaram perfil semelhantes de estabilidade térmica, sendo mais estáveis à baixas temperaturas (30°C), com tempo de meia vida inferior à 20 horas. Porém a lipase da levedura AAV1 apresentou ser um pouco mais estável em todas as temperaturas analisadas quando comparada com as demais lipases estudadas;

Em relação a estabilidade de pH a lipase proveniente do microrganismo AY3 apresentou maior estabilidade ao pH 6,5 enquanto que as lipases dos microrganismos AC02 e AVV1 apresentaram maior estabilidade em pH 7,0;

Na determinação da especificidade de substrato da enzima proveniente do microrganismo AY3, foi registrado um atividade lipolítica 3 vezes superior quando utilizado tributirina (C<sub>4</sub>) e tricoprilina (C<sub>8</sub>) como substratos quando comparado com óleo de oliva, demonstrando maior especificidade por triglicerídeos de cadeia curta e média, porém também apresentou especificidade por triglicerídeos de cadeia longa insaturados, mas com menor intensidade quando comparada com triglicerídeos de média e curta cadeia. Enquanto que as lipases das leveduras nomeadas AC02 e AAV1 apresentaram especificidade por substratos de diferentes cadeias de carbonos, curta, média e longa, não apresentam grandes variações em função do número de carbonos;

As enzimas das 3 cepas de leveduras estudadas apresentaram capacidade biocatalítica, sendo consideradas então lipases verdadeiras. Porém apresentaram capacidade biocatalítica inferior quando comparado com a enzima comercial (Lipozyme IM). No entanto foram registradas maiores porcentagens de esterificação quando utilizado etanol ao invés de heptanol como componente reacional;

A procura de novas lipases através de programas de seleção de microrganismos produtores é de fundamental importância, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade como o Brasil, para o descobrimento de novas enzimas com maiores estabilidades e seletividades, podendo ser usadas para biocatálise e ampliar ainda mais o campo de aplicação dessas enzimas.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados e conclusões obtidas neste trabalho, segure-se como trabalhos futuros:

- Otimização do meio de cultura e das condições experimentais para produção de lipase aumentando assim a atividade lipolítica da enzima;
- Estudos de purificação da lipase e caracterização da lipase purificada;
- Estudos de avaliação de suportes para imobilização da lipase e caracterização da enzima imobilizada;
- Otimização das condições reacionais de síntese orgânica;
- Identificação das leveduras selecionadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and Characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp* strain isolated palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 968-975, 2002.
- BARON, A. M.; ARIZAGA, G. G. A.; WYPYCH, F.; MITCHELL, D. A.; KTIEGER, N. Estabilidade térmica de lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11 em meios aquo-restritos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. *Anais...* Curitiba: CIETEP, 2007.
- BHATNAGAR, T.; BOUTAIBA, S.; HACENE, H.; CAYOL, J. L.; FARDEAU, M. L.; OLLIVIER, B.; BARATTI, J. C. Lipolytic activity from Halobacteria: Sreening and hydrolase production. *FEMS Microbiology Letters*, v. 248, p. 133-140, 2005.
- BUCULÁ, V.; FORESTI, M. L.; TRUBIANO, G.; FERREIRA, M. L.; BRIOZZO, M.; BOTTINI, S. Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions. *Enzyme and microbial Technology*, v. 38, p. 914-920, 2006.
- BURKERT, J. F. M.; MALDONADO, R. R.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Caracterização Bioquímica da Lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4., 2001, Campinas. *Anais...* Campinas: UNICAMP, 2001, 162 p.
- BURKERT, J. F. M. *Otimização das Condições de Produção de Lipase por Geotrichum candidum* NRRL-Y 552. 2003. 172 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2003.
- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 77-84, 2004.
- CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 14, p. 111-123, 2001.

- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quim. Nova*, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.
- CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Quim. Nova*, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- CASA, R. M.; SINISTERRA, J. V.; MONTERO, J. M. S. Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 599-609, 2006.
- CASTRO, H., F.; MENDES, A., A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRIGUEZ-GOMEZ, C. VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 648-654, 2005.
- CHEN, W.; LIU, C. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 2, p. 153-160, 1996.
- CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, v. 23, p. 60-67, 2006.
- COSTA FILHO, E. H.; FERREIRA, A., L., O.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo da produção de biodiesel utilizando lipase do tipo B de *Candida antarctica* Imobilizada. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. *Anais...* Curitiba: CIETEP, 2007.
- DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principle*. Academic Press: New York, 439 p., 2002.
- DOMÍNGUEZ DE MARIA, P.; MARTINEZ-ALZAMORA, F.; MORENO, S. P.; VALERO, F.; RUA, M. L.; SANCHEZ-MONTERO, S. P.; SINISTERRA, J. V.; ALCANTARA, A. R. Heptyl oleate synthesis as useful tool to discriminate between lipases, proteases and other hydrolases in crude preparations. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 283-288, 2002.
- FACCIO, C. *Estudo da produção de éteres etílicos a partir da alcóólise de óleo vegetais*. 2004. 86p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de

- Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, 2004..
- FEVRIER, P.; GUEGAN, P.; YVERGNAUX, F.; CALLEGARI, J. P.; DUFOSSE, L.; BINET, A. Evaluation of regioselectivity of lipases based on synthesis reaction conducted with propyl alcohol, isopropyl alcohol and propylene glycol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 445-453, 2001.
- FOGLIA, T. A.; PETRUSO, K.; FEAIRHELLER, S. H. Enzymatic interesterification of tallow-sunflowers oil mixtures. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 70, p. 281-285, 1993.
- FREIRE, D. M. G. *Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por Penicillium restrictum*. 1996. 174p. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 1996.
- FREIRE, D. M. G.; GOMES, P. M.; BON, E. P. S.; LIPPEL SAN'T ANNA Jr., G. L. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. *Revista de Microbiologia*, v. 28, n. 1, p. 6-12, 1997.
- FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. *Rev. Bras. Farm.*, v. 81, p. 48-56, 2000.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n.5, p. 405-416, 2001.
- GEOK, L. P.; RAZAK, C. N. A.; RAHMAN, R. N. Z. A.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. Isolation and screening of and extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 73-77, 2003.
- GHAMGUI, H.; CHAABOUNI, M. K.; GARGOURI, Y. 1-Butyloleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 355-363, 2004.
- GHOTRA, B. S.; DYAL, S. D.; NARINE, S. C. Lipid shortenings: a review. *Food Res. Int.*, v. 35, p. 1015-1048, 2002.
- GUPTA, R.; BRANDOO, S.; RATHI, P.; SAXENA, R. K. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 51, p. 115-120, 2002.

- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 34, p. 762-781, 2004.
- HASAN, F.; AHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 637-641, 2002.
- HERNALSTEENS, S. Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. 2006. 186 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2006.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 390-397, 2002.
- JOHSON-GREEN, P. *Introduction to food biotechnology*. 1. ed. New York: CRC Press LLC, 293 p., 2002.
- LEAL, M. C. M. R. *Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios*. 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Engenharia Química da COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2000.
- LEE, B. H. *Fundamentals of food biotechnology*. 1. ed. New York: VCH Publishers, 431 p., 1996.
- LOTRAKUL, P.; DHARMSTHITI. Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 13, p. 163-166, 1997.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-175, 1951.
- KAMIMURA, E. S. *Modelagem e Simulação do Processo de Purificação de Lipase por Cromatografia de Afinidade*. 2000. 221 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2000.
- KARTZ, L., MARCIN, C., ZITANO, L., KING, J., PRICE, K., GRINBERG, N., BHUPATHY, M., MC NAMARA, J., BERGAN, J., GREASHAM, R., CHARTRAIN, M. Screening and

- selection of a microbial lipase for the stereospecific hydrolysis of Verlukast. *Journal of Industriel Microbiology*, v. 11, p. 89-94, 1993.
- KO, W. H.; WANG, I. T.; ANN, P. J. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 37, p. 597-599, 2005.
- MALISZEWSKA, I. & MASTARLEZ, P. Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum*. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 14, p. 190-193, 1992.
- MALDONADO, R. R. *Produção, purificação e caracterização da lipase de Geotrichum candidum obtida a partir de meios industriais*. 2006. 131 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2006.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; JUNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios. *Quim. Nova*, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. *Quim. Nova*, v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.
- OHNISHI, K., YOSHIDA, Y., SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 77, n. 5, p. 490-495, 1994.
- PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: Partial purification, characterization and interesterification of buffer fat. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 43, n. 1, p. 42-51, 1995.
- PALMA, M. B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, v. 84-86, p. 1137-1145, 2000.
- PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciê. Tecnol. Aliment.*, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.
- PEDERSON, S. B.; HOLMER, G. Studies of The Fatty Acid Specificity of the Lipase from *Rhizomucor Miehei* Toward 20:1n-9, 20:5n-3, 22:1n-9 and 22:6n-3. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 72, p. 239-243, 1995.

- PIMENTEL, M. C. B.; KRIEGER, N.; COELHO, L. C. C. B.; FONTANA, J. O.; MELO, E. H. M.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Appl. Biochem. and biotechnol.*, v. 49, p. 56-74, 1994.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. 1. ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 326 p., 2005.
- SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 390-393, 2007.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SHU, C. H.; XU, C. J.; LIN, G. C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 734-738, 2006.
- TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 459-465, 2003.
- XU, X. Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalysed Reactions: a Review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, p. 287-303, 2000.
- YU, M.; LANGE, S.; RICHTER, S.; TAN, T.; SCHMID, R. D. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein expression and Purification*, v. 53, p. 255-263, 2007.
- ZANOTTO, S. P.; LISBÔA, L. U. S.; NASCIMENTO, M. G.; CAVALLAZZI, J. R. P.; MARTINS, M. K.; PEREIRA, J. O. Seleção de fungos isolados de plantas da região amazônica, fornecedores de lipases para biotransformações. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. *Anais...* Curitiba: CIETEP, 2007.



## ANEXOS

**Anexo 1. Ilustração do cromatograma da amostra AC02 utilizando heptanol na reação e respectivos tempos de retenção dos compostos reacionais.**

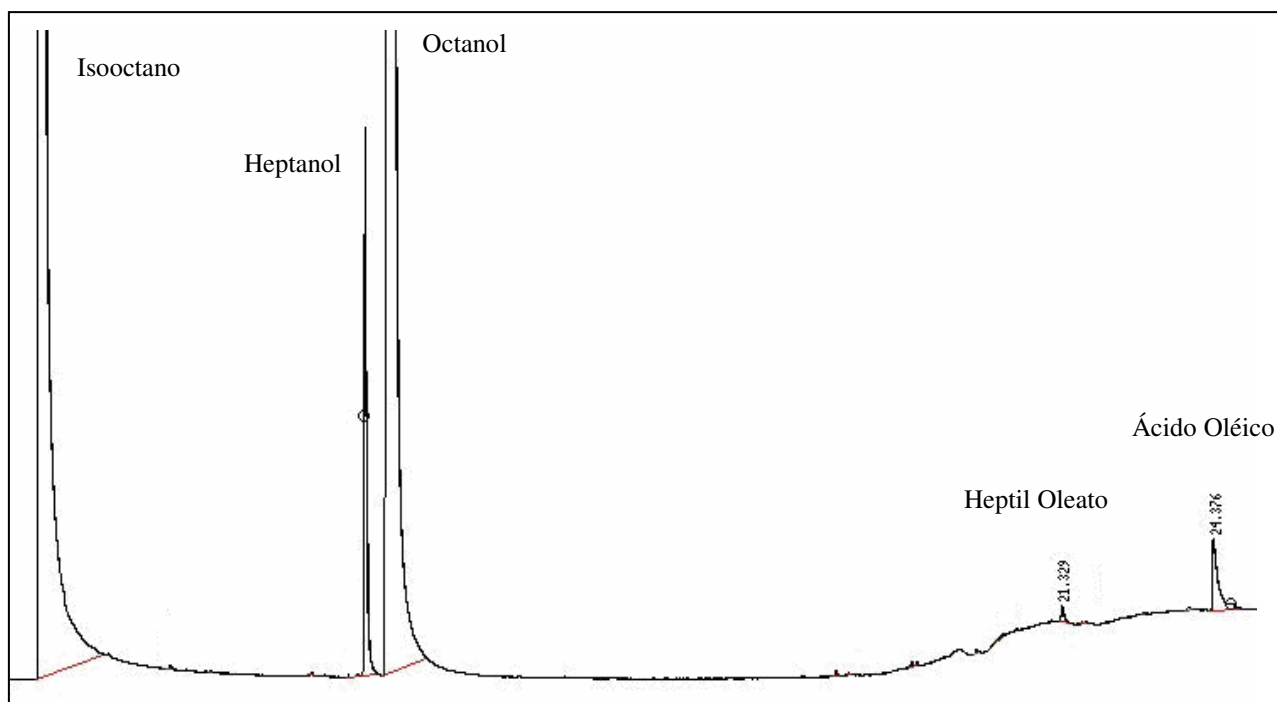


Figura 1. Cromatograma da amostra ACO2 utilizando heptanol na mistura reacional.

Tabela 1. Tempo de retenção dos compostos da amostra AC02 / heptanol.

Pico	Tempo de retenção	Composto
1	0,831	Isooctano
2	7,303	Heptanol
3	7,851	Octanol (padrão Interno)
4	21,326	Heptil Oleato
5	24,376	Ácido oléico

**Anexo 2. Ilustração do cromatograma da amostra AC02 utilizando etanol na reação e respectivos tempos de retenção dos compostos reacionais.**

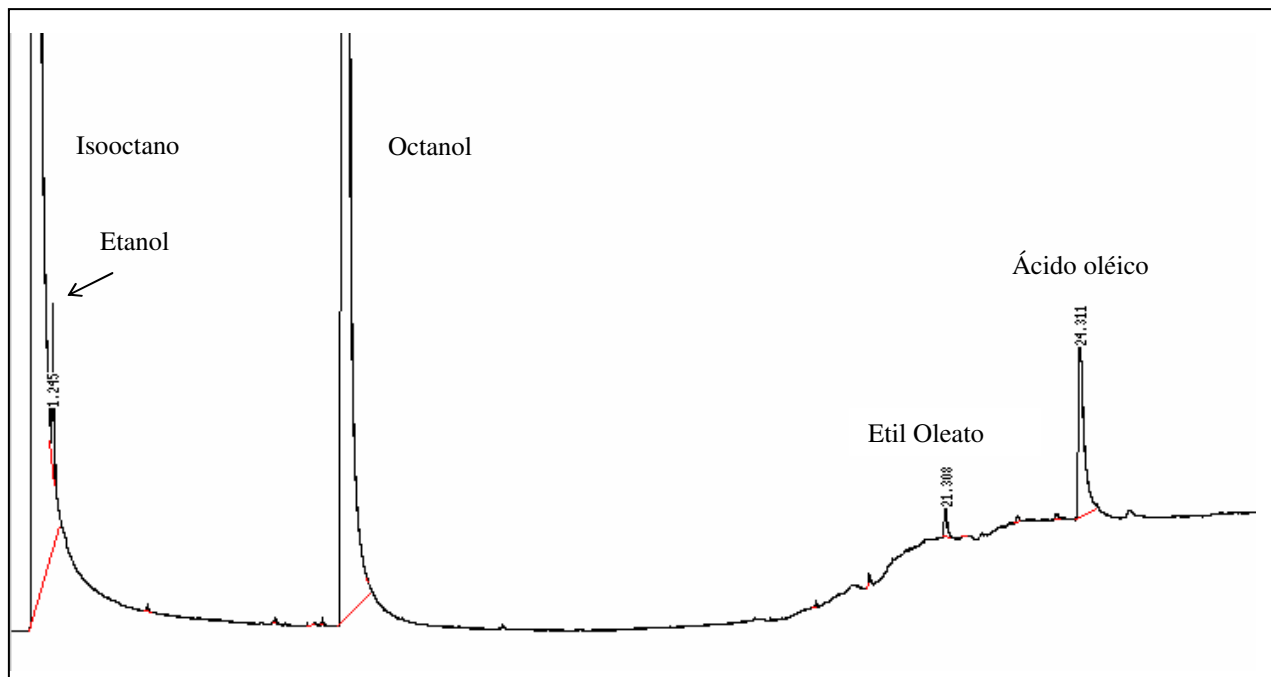


Figura 2. Cromatograma da amostra ACO2 utilizando etanol na mistura reacional.

Tabela 2. Tempo de retenção dos compostos da amostra AC02 / etanol.

Pico	Tempo de retenção	Composto
1	0,833	Isooctano
2	1,245	Etanol
3	7,853	Octanol (Padrão Interno)
4	21,308	Etil Oleato
5	24,311	Ácido oléico

**Anexo 3. Ilustração do cromatograma da amostra AAV1 utilizando heptanol na reação e respectivos tempos de retenção dos compostos reacionais.**

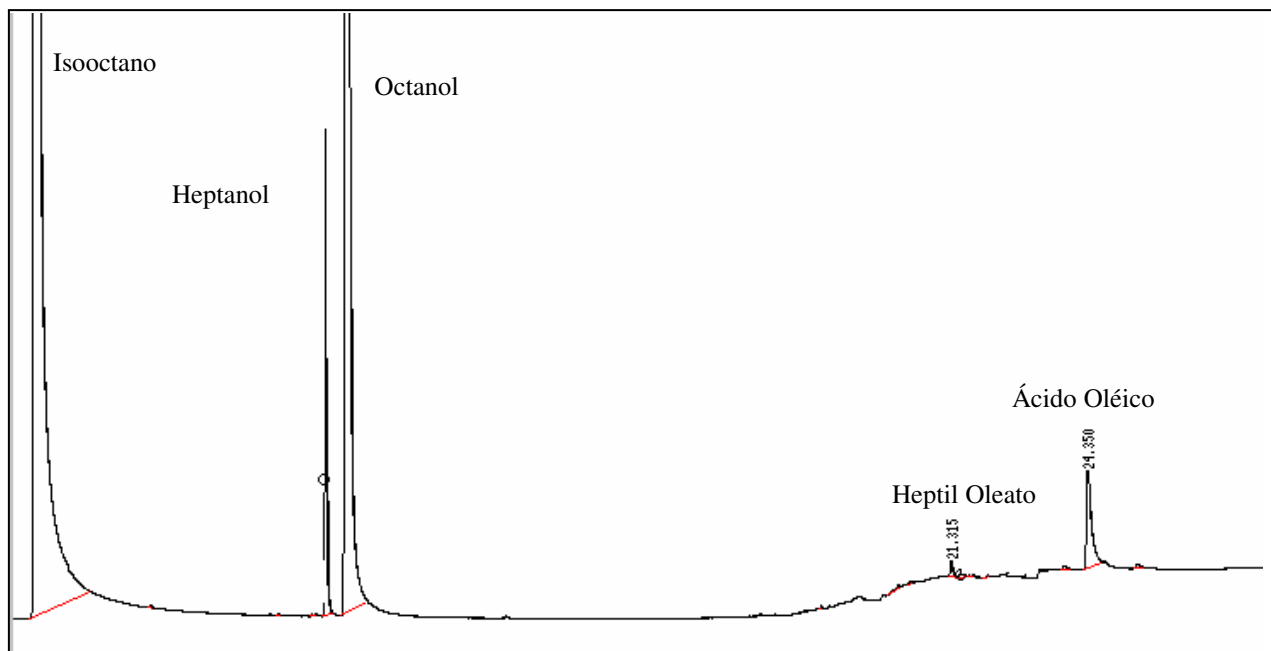


Figura 3. Cromatograma da amostra AVV1 utilizando heptanol na mistura reacional.

Tabela 3. Tempo de retenção dos compostos da amostra AAV1 / heptanol.

Pico	Tempo de retenção	Composto
1	0,829	Isooctano
2	7,308	Heptanol
3	7,859	Octanol (padrão Interno)
4	21,315	Heptil Oleato
5	24,350	Ácido oléico

**Anexo 4. Ilustração do cromatograma da amostra AAV1 utilizando etanol na reação e respectivos tempos de retenção dos compostos reacionais.**

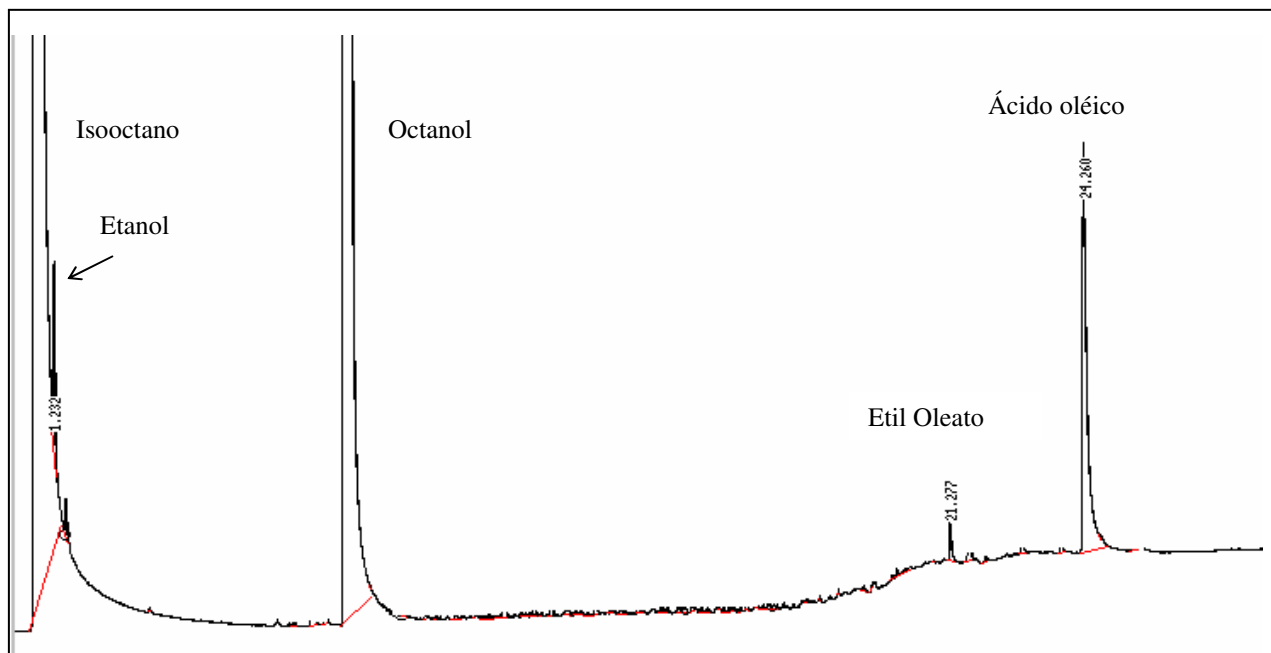


Figura 4. Cromatograma da amostra AVV1 utilizando etanol na mistura reacional.

Tabela 4. Tempo de retenção dos compostos da amostra AAV1 / etanol.

Pico	Tempo de retenção	Composto
1	0,839	Isooctano
2	1,232	Etanol
3	7,855	Octanol (Padrão Interno)
4	21,277	Etil Oleato
5	24,260	Ácido oléico

**Anexo 5. Ilustração do cromatograma da amostra AY3 utilizando heptanol na reação e respectivos tempos de retenção dos compostos reacionais.**

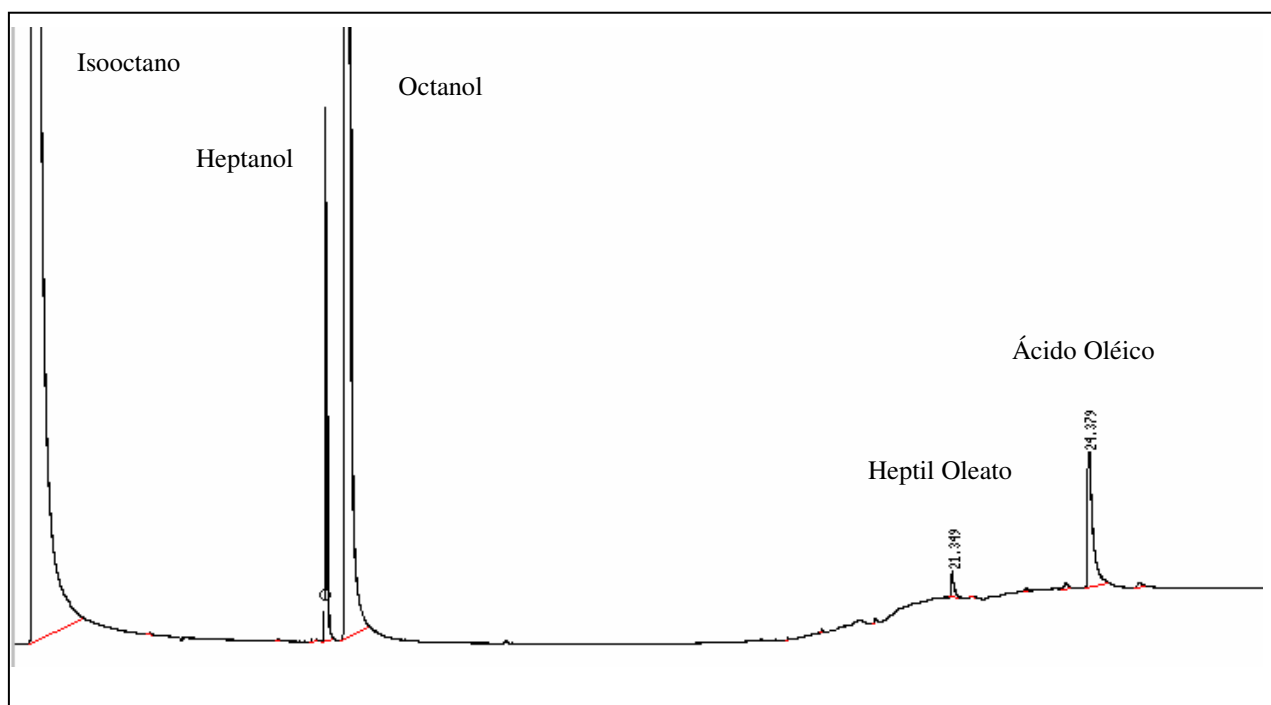


Figura 5. Cromatograma da amostra AY3 utilizando heptanol na mistura reacional.

Tabela 5. Tempo de retenção dos compostos da amostra AY3 / heptanol.

Pico	Tempo de retenção	Composto
1	0,832	Isooctano
2	7,305	Heptanol
3	7,854	Octanol (padrão Interno)
4	21,349	Heptil Oleato
5	24,379	Ácido oléico

**Anexo 6. Ilustração do cromatograma da amostra AY3 utilizando etanol na reação e respectivos tempos de retenção dos compostos reacionais.**

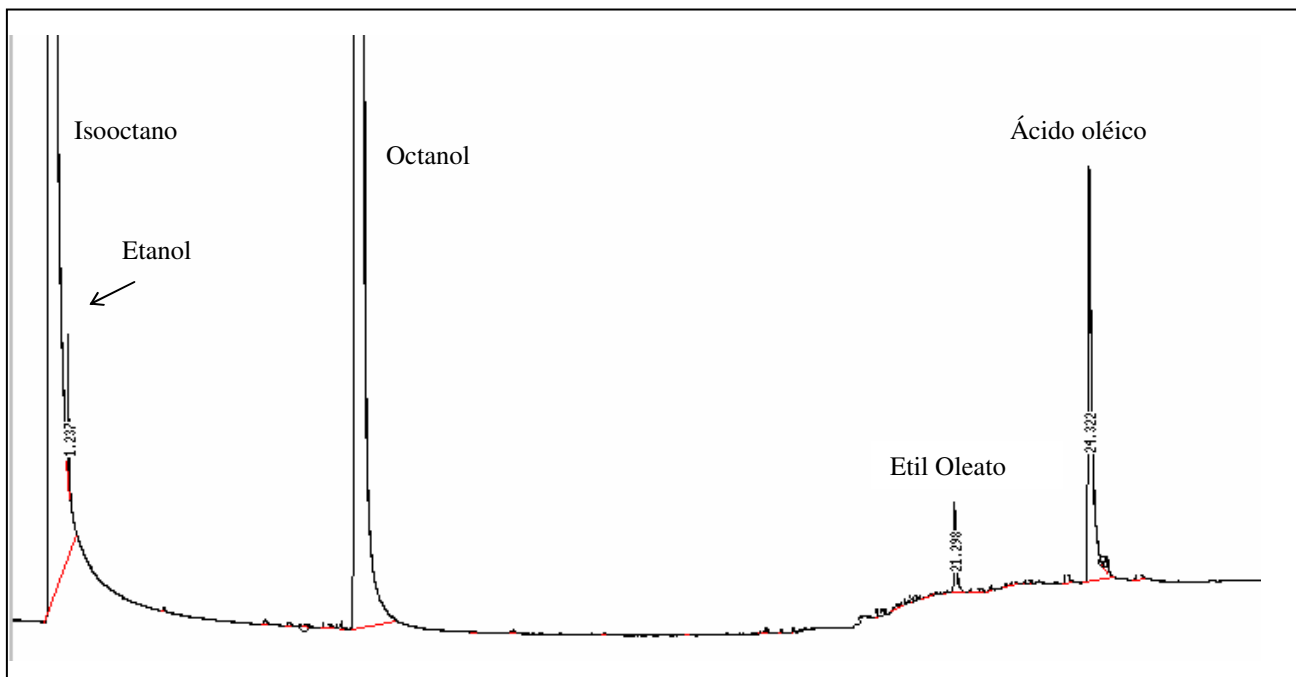


Figura 6. Cromatograma da amostra AY3 utilizando etanol na mistura reacional.

Tabela 6. Tempo de retenção dos compostos da amostra AY3 / etanol.

Pico	Tempo de retenção	Composto
1	0,831	Isooctano
2	1,237	Etanol
3	7,855	Octanol (Padrão Interno)
4	21,298	Etil Oleato
5	24,322	Ácido oléico

**Anexo 7. Ilustração do cromatograma da amostra comercial (Lipozyme IM) utilizando heptanol na reação e respectivos tempos de retenção dos compostos reacionais.**

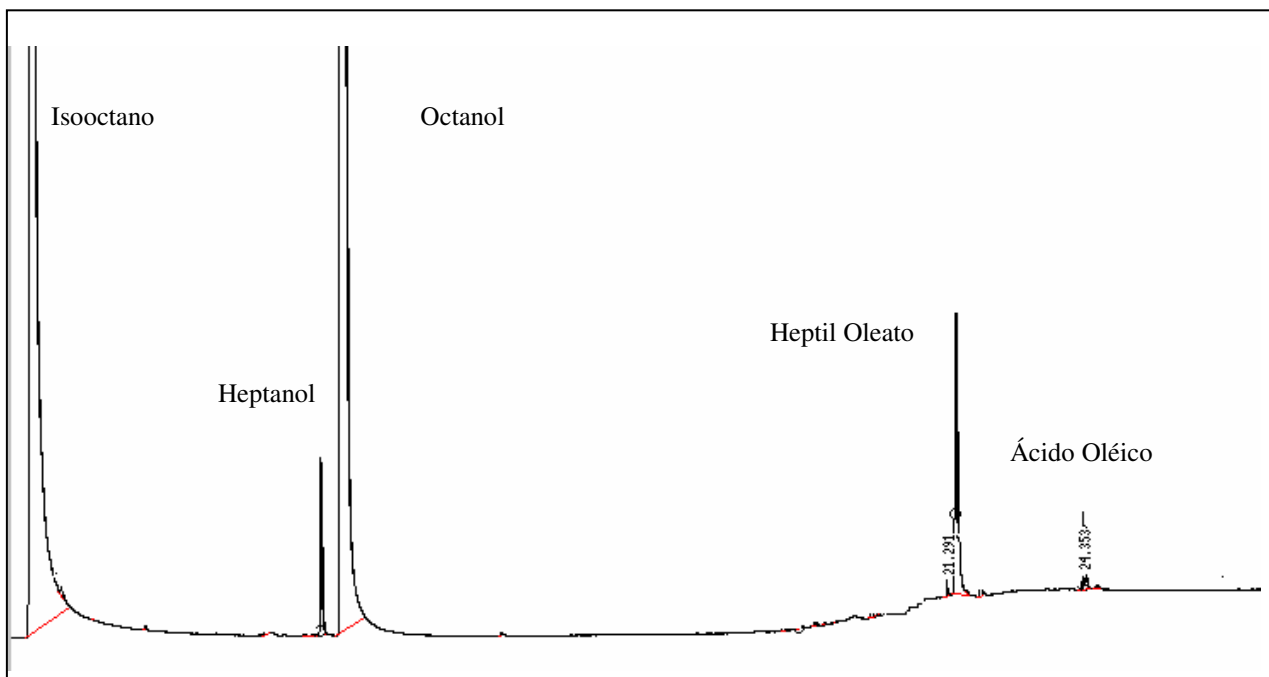


Figura 7. Cromatograma da amostra Comercial utilizando heptanol na mistura reacional.

Tabela 7. Tempo de retenção dos compostos da amostra comercial / heptanol.

Pico	Tempo de retenção	Composto
1	0,828	Isooctano
2	7,310	Heptanol
3	7,849	Octanol (padrão Interno)
4	21,291	Heptil Oleato
5	24,353	Ácido oléico

**Anexo 8. Ilustração do cromatograma da amostra comercial (Lipozyme IM) utilizando etanol na reação e respectivos tempos de retenção dos compostos reacionais.**

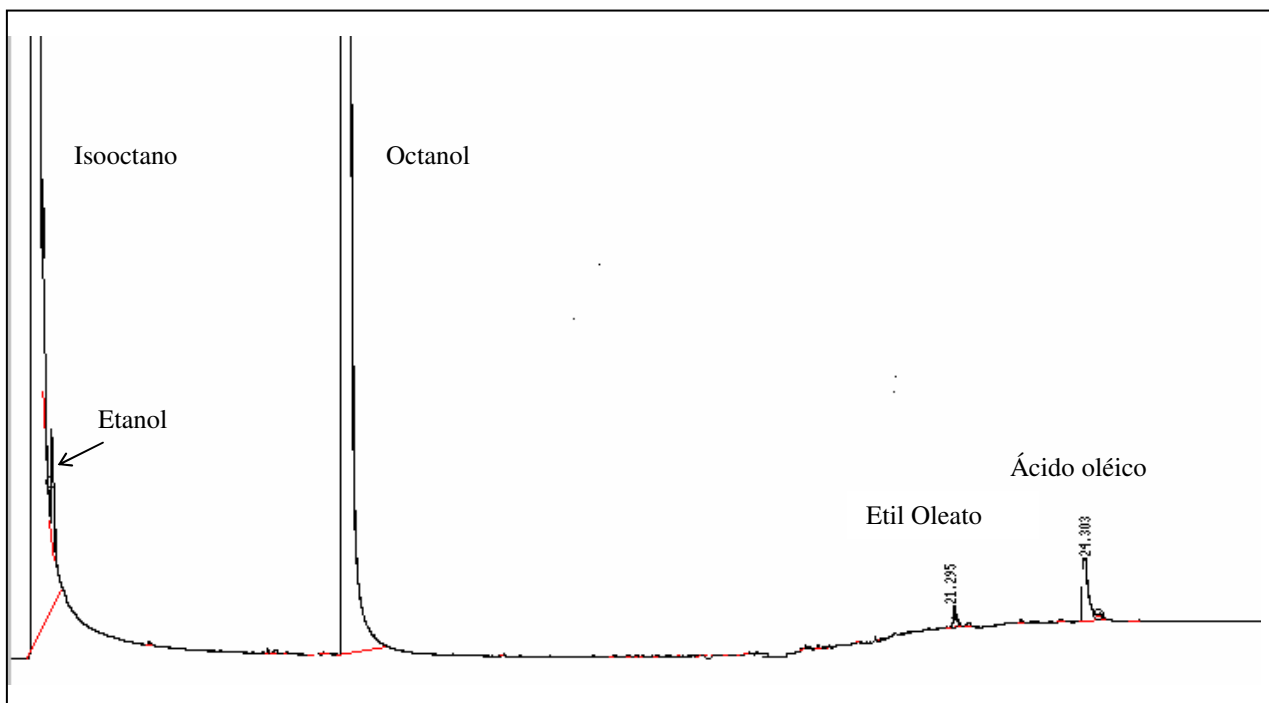


Figura 8. Cromatograma da amostra Comercial utilizando etanol na mistura reacional.

Tabela 8. Tempo de retenção dos compostos da amostra comercial / etanol.

Pico	Tempo de retenção	Composto
1	0,832	Isooctano
2	1,215	Etanol
3	7,848	Octanol (Padrão Interno)
4	21,295	Etil Oleato
5	24,303	Ácido oléico



## Anexo 9. Curva de calibração de heptanol.

Tabela 9. Valores das áreas para curva de calibração de heptanol.

mM Heptanol	*Áreas
6,25	434499
3,13	199520
1,56	96470
0,78	49424
0,39	27531

\*Média dos valores em Duplicata.

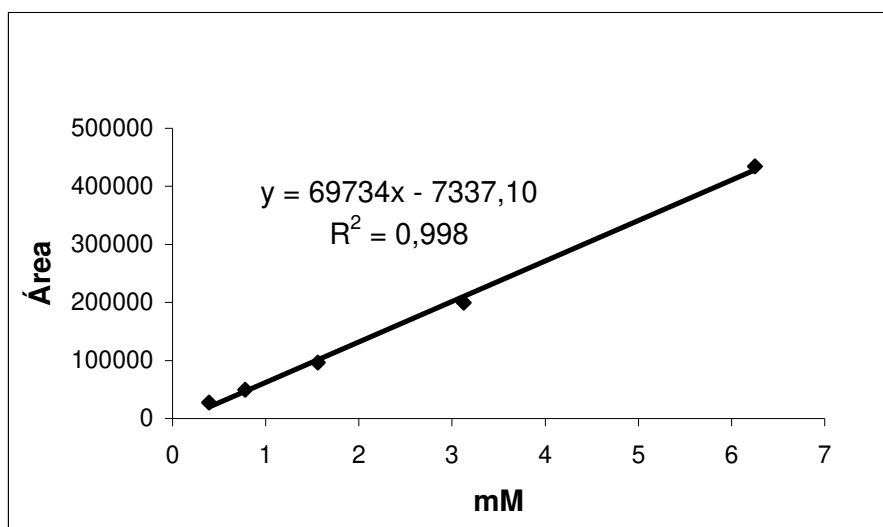


Figura 9. Curva de calibração de heptanol.

## Anexo 10. Curva de calibração de etanol.

Tabela 10. Valores das áreas para curva de calibração de etanol.

mM Etanol	*Áreas
10,00	101806
5,00	46585
2,50	27113
1,25	13847
0,63	7212
0,31	4102

\*Média dos valores em Duplicata.

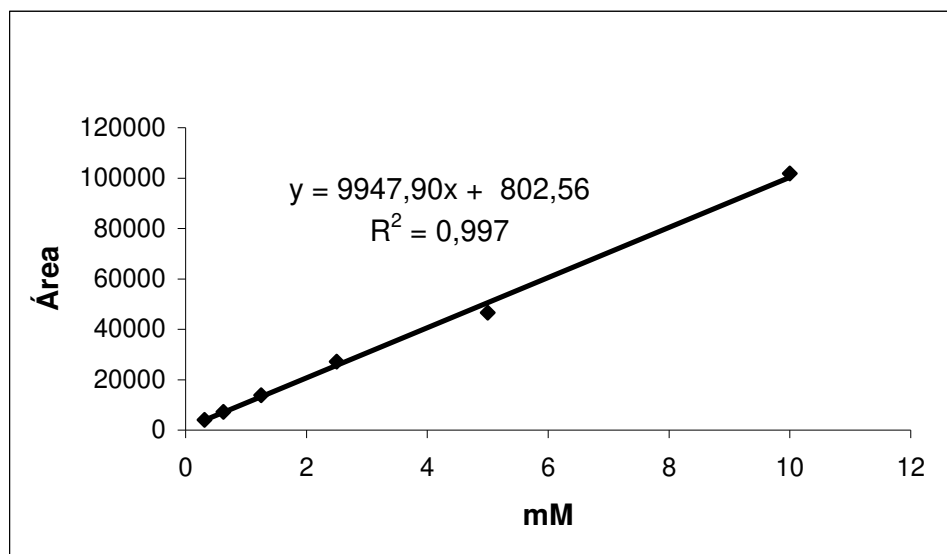


Figura 10. Curva de calibração de etanol.