

Janaina Pires Borges

Produção, imobilização e aplicação de lipase de *Fusarium verticillioides*

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins
Co-orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

B732p Borges, Janaina Pires
 Produção, imobilização e aplicação de lipase de
 Fusarium verticillioides / Janaina Pires Borges –
 Araraquara : [s.n], 2016
 160 f. : il.

 Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Química
 Orientador: Daniela Alonso Bocchini Martins
 Coorientador: Roberto da Silva

 1. Lipase. 2. Hidrólise. 3. Esterificação (Química).
 4. Transesterificação. 5. Enzimas imobilizadas. I. Título.

JANAINA PIRES BORGES

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 15 de fevereiro de 2016.

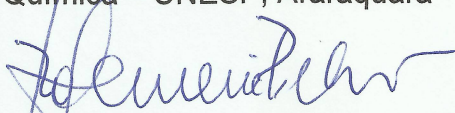
BANCA EXAMINADORA



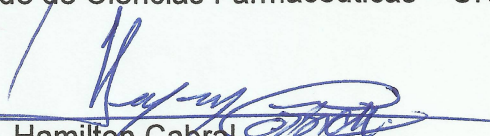
Profª Drª Daniela Alonso Bocchini Martins
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



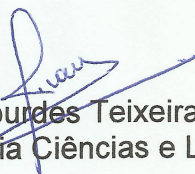
Profª Drª Cíntia Duarte de Freitas Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Hamilton Cabral
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Profª Drª Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto

Janaina Pires Borges

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Janaina Pires Borges
Filiação Waldyr Borges e Lindeneide Rita Pires Borges
Nascimento 28/10/1985 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade 404378274 SSP - SP - 17/08/2000
CPF 338.838.858-00

Endereço residencial R. Adib Chalela, 280
Bosque da Felicidade - São José do Rio Preto
15053440, SP - Brasil
Telefone: 17 30335909
Celular 17 91447225

Formação acadêmica/titulação

- 2010 - 2012** Mestrado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Produção de lipases por fungos termofílicos e mesofílicos e uso na produção de biodiesel etílico, Ano de obtenção: 2012
Orientador: Profº Drº Roberto da Silva
Co-orientador: Profº Drº Mauricio Boscolo
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2009 - 2010** Especialização em Gestão ambiental e ecogestão.
Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, Brasil
Título: Determinação de teores de nitrogênio e fósforo nas águas da nascente do rio Borá
Orientador: Valquiria Damiano
- 2005 - 2008** Graduação em Química ambiental.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Síntese e caracterização de sucrogéis a base de metacrilato de sacarose para uso agrícola
Orientador: Mauricio Boscolo
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Formação complementar

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Treinamento operação. e aplicação em DSC 8000 com Intracooler. (Carga horária: 16h).

Perkin-Elmer Corporation, P.E.C., Estados Unidos

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Titulador Karl Fischer coulométrico Titrand 852. (Carga horária: 6h).
Metrohm, METHOHM, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Titulador potenciométrico Titrand 902. (Carga horária: 6h).
Metrohm, METHOHM, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Treinamento teórico em DSC. (Carga horária: 4h).
Perkin-Elmer Corporation, P.E.C., Estados Unidos
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Operação e manutenção básica da centrífuga - CR-22. (Carga horária: 3h).
Scientific Instruments Co. SINC DO BRASIL, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Charles Darwin-200 anos: da origem das sp a bio. m. (Carga horária: 2h).
Centro Universitário Paulistano, UniPaulistana, Sao Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Hist. Ecológica da Mata Atlântica e a compart. geo. (Carga horária: 2h).
Centro Universitário Paulistano, UniPaulistana, Sao Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Políticas ambientais de São José do Rio Preto. (Carga horária: 2h).
Centro Universitário Paulistano, UniPaulistana, Sao Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Biologia: 30 anos de profissão. (Carga horária: 2h).
Centro Universitário Paulistano, UniPaulistana, Sao Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Uso de lodo de esgoto na agricultura. (Carga horária: 2h).
Embrapa escritório de negócios de Campinas, EMBRAPA SNTENCPQ, Campinas, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Legislação ambiental e meio ambiente: educação e c. (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Química forense. (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Substâncias tóxicas persistentes no Brasil. (Carga horária: 8h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Polímeros naturais. (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Biomarcadores bioquím. de contaminação em org. aq. (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Fármacos. (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Ecoturismo e sensibilização ambienta. (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. QUILLES, J.C.J., BRITO, R.R., **BORGES, J.P.**, ARAGON, C.C., FERNANDEZ-LORENTE, G., BOCCHINI-MARTINS, D.A., GOMES, E., DA SILVA, R., BOSCOLO, M., GUIBAN, J.M.

Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents. Biochemical Engineering Journal. , v.93, p.274 - 280, 2015.

2. FERRAREZI, A.L., OHE, T.H.K., **BORGES, J.P.**, BRITO, R.R., SIQUEIRA, M.R., VENDRAMINI, P.H., QUILLES, J.C.J., NUNES, C., BONILLA-RODRIGUEZ, G.O., BOSCOLO, M., DA-SILVA, R., GOMES, E.

Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic Thermomucor indicae seudaticae N31 for transesterification reaction. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic (Print). , v.107, p.106 - 113, 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **BORGES, J.P.**, BOCCHINI, D. A., SILVA, R., GUIBAN, J. M.

Stability evaluation of Fusarium verticillioides lipase immobilized on inert supports. In: 38° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia.

38° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2015.

2. BORGES, J. P., SOUZA, G. P., BARALDI, J. V., Brito, R. R., QUILLES, J. C. J., BOSCOLO, M., GOMES, E., SILVA, R., BOCCHINI, D. A.

Evaluation of the hydrolysis, esterification and transesterification of lipases produced on different carbon sources by *Fusarium lactis* In: BioMicroWorld 2013, 2013, Madri.

Book of Abstract - V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. , 2013. p.670 - 670

3. SIQUEIRA M. R., BORGES, J. P., OHE, T. H. K., FERRAREZI A. L., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEO, J. C., SILVA, R.

Avaliação da atividade transesterificante de enzimas imobilizadas de *fusarium sp* e *mucor hiemalis* para produção de biodiesel etílico. In: 35ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia.

Responsabilidade, Ética e Progresso social. , 2012.

4. Brito, R. R., FERRAREZI A. L., BORGES, J. P., ALVES MONTEIRO, D. , SILVA, R., GOMES, E.

Avaliação de substratos a base de resíduos agroindustriais quanto à produção de lipases com atividade de transesterificação e hidrólise pelo fungo *Acremonium sp*. In: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2012, Blumenau.

X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. , 2012.

5. SIQUEIRA M. R., BORGES, J. P., FERRAREZI A. L., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEO, J. C., SILVA, R.

Caracterização físico-química de lipases produzidas por *Mucor hiemalis* P23 e *Fusarium sp* F01 por FES. In: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2012, Blumenau.

X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. , 2012.

6. QUILLES, J. C. J., FERRAREZI A. L., BORGES, J. P., Brito, R. R., GOMES, E., SILVA, R., BOSCOLO, M.

Imobilização e estabilização de lipase de *Acremonium sp* por interação hidrofóbica e ligação iônica In: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2012, Blumenau.

X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. , 2012.

7. VENDRAMINI, P. H., OHE, T. H. K., BORGES, J. P., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEO, J. C., SILVA, R., FERRAREZI A. L.

Produção de biodiesel etílico catalisado por lipases presentes nas hifas imobilizadas do fungo termofílico *Rhizomucor pusillus* In: 35ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia.

Responsabilidade, Ética e Progresso social. , 2012.

8. BORGES, J. P., OHE, T. H. K., SIQUEIRA M. R., VENDRAMINI, P. H., DOS SANTOS, J. F. A., FERRAREZI A. L., BOSCOLO, M., GOMES, E., BOCCHINI, D. A., SILVA, R.

Produção de ésteres etílicos por lipases do *Fusarium sp* imobilizado em farelo de trigo In: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2012, Blumenau.

X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. , 2012.

9. BORGES, J. P., OHE, T. H. K., SIQUEIRA M. R., VENDRAMINI, P. H., FERRAREZI A. L., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEO, J. C., SILVA, R.

Síntese de biodiesel etílico utilizando-se lipases de *Acremonium sp* cultivado em bagaço de cana, farelo de soja e farelo de trigo. In: 35ª Reunião Anual Sociedade

Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia.

Responsabilidade, Ética e Progresso social. , 2012.

10. BORGES, J. P., OHE, T. H. K., FERRAREZI A. L., SIQUEIRA M. R., São José B. G., EGEA, T. C., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEIO, J. C., SILVA, R.

Atividade de transesterificação de lipases de fungos mesofílicos com potencial para produção de Biodiesel. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

Química para um mundo melhor. , 2011.

11. DOS SANTOS, J. F. A., OHE, T. H. K., BORGES, J. P., FERRAREZI A. L., SIQUEIRA M. R., São José B. G., VENDRAMINI, P. H., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEIO, J. C., SILVA, R.

Avaliação das atividades de hidrólise e transesterificação do extrato enzimático das linhagens fúngicas F 2.1.3 e TO - 05 imobilizado em quitosana In: 18º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti", 2011, São José do Rio Preto.

Ensino, Pesquisa e Qualidade de Vida no Ano Internacional da Química. , 2011. p.144 - 144

12. OHE, T. H. K., BORGES, J. P., FERRAREZI A. L., SIQUEIRA M. R., São José B. G., VENDRAMINI, P. H., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEIO, J. C., SILVA, R.

Avaliação dos fatores que afetam o rendimento na produção de biodiesel por catálise enzimática. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

Química para um mundo melhor. , 2011.

13. VENDRAMINI, P. H., São José B. G., OHE, T. H. K., BORGES, J. P., FERRAREZI A. L., BOSCOLO, M., GOMES, E., SILVA, R., THOMEIO, J. C.

Caracterização da lipase obtida por fermentação em estado sólido do fungo *Myceliophthora* F 2.1.3 In: 18º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti", 2011, São José do Rio Preto.

Ensino, Pesquisa e Qualidade de Vida no Ano Internacional da Química. , 2011. p.60 - 60

14. BORGES, J. P., OHE, T. H. K., FERRAREZI A. L., SIQUEIRA M. R., São José B. G., VENDRAMINI, P. H., DOS SANTOS, J. F. A., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEIO, J. C., SILVA, R.

Otimização de fermentação sólida do fungo *Acremonium* sp para produção de lipases com potencial na síntese de Biodiesel In: 18º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti", 2011, São José do Rio Preto.

Ensino, Pesquisa e Qualidade de Vida no Ano Internacional da Química. , 2011. p.58 - 58

15. SIQUEIRA M. R., BORGES, J. P., OHE, T. H. K., FERRAREZI A. L., São José B. G., EGEA, T. C., GOMES, E., THOMEIO, J. C., SILVA, R., BOSCOLO, M.

Potencial lipolítico, de esterificação e transesterificação de lipases de *Fusarium* sp1 para produção de biodiesel etílico. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis - SC.

Química para um mundo melhor. , 2011.

16. São José B. G., OHE, T. H. K., FERRAREZI A. L., SIQUEIRA M. R., BORGES, J. P., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEIO, J. C., SILVA, R.

Produção de lipases por linhagens fúngicas termofílicas para produção de biodiesel etílico In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis - SC.

Química para um mundo melhor. , 2011.

17. SIQUEIRA M. R., BORGES, J. P., OHE, T. H. K., FERRAREZI A. L., São José B. G., VENDRAMINI, P. H., GOMES, E., THOMEIO, J. C., SILVA, R., BOSCOLO, M.

Seleção de linhagens fúngicas de *Fusarium spe* e *Mucor Hiemalis* produtores de lipase com atividade transesterificante In: 18º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti", 2011, São José do Rio Preto.

Ensino, Pesquisa e Qualidade de Vida no Ano Internacional da Química. , 2011. p.34 - 34

18. OHE, T. H. K., BORGES, J. P., FERRAREZI A. L., VENDRAMINI, P. H., DOS SANTOS, J. F. A., SIQUEIRA M. R., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEIO, J. C., SILVA, R.

Aplicação de ultrassom na produção de biodiesel etílico utilizando lipase comercial obtida do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* In: IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2010, Rio de Janeiro.

IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - Versatilidade e Eficiência na Inovação Sustentável. , 2010. p.107 - 107

19. BORGES, J. P., OHE, T. H. K., FERRAREZI A. L., VENDRAMINI, P. H., DOS SANTOS, J. F. A., SIQUEIRA M. R., BOSCOLO, M., GOMES, E., THOMEIO, J. C., SILVA, R.

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE SELEÇÃO DE FUNGOS MESOFÍLICOS PRODUTORES DE LIPASES POR ZIMOGRAMA COM RODAMINA B E ATIVIDADE HIDROLÍTICA COM P-NITROFENIL PALMITATO In: IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2010, Rio de Janeiro.

IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - Versatilidade e Eficiência na Inovação Sustentável. , 2010. p.106 - 106

20. VENDRAMINI, P. H., FERRAREZI A. L., BORGES, J. P., OHE, T. H. K., MAGALHAES, T. S., GOMES, E., THOMEIO, J. C., BOSCOLO, M., SILVA, R.

Produção de biodiesel etílico utilizando sonda de ultrassom In: XVI Encontro Luso-Galego de Química, 2010, Aveiro.

XVI Encontro Luso-Galego de Química. , 2010.

21. COLOMBARI, F. M., **BORGES, J.P.**, SARAIVA, A. L. B., BOSCOLO, M.

Síntese e avaliação da capacidade hidrorretentora de hidrogéis a base de metacrilato de sacarose In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.

33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **BORGES, J.P.**, BARALDI, J. V., GOMES, E., SILVA, R., BOSCOLO, M.,

BOCCHINI, D. A.

Influencia de nutrientes utilizados na fermentação em estado sólido sobre a atividade hidrolítica da lipase produzida pelo fungo *Fusarium verticillioides* e a produção de ômega 3 In: XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 2015, Fortaleza.

XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. , 2015.

2. Brito, R. R., **BORGES, J.P.**, SILVA, R., GOMES, E.

Produção de biodiesel com diferentes razões molares óleo/etanol utilizando lipase associada ao micélio do fungo ROG 2.1.9 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar In: XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS e XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2015, Fortaleza.

XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS e XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS. , 2015.

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Jéssica Vergani Baraldi. **PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E 6 POR MEIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA UTILIZANDO A LIPASE DE FUSARIUM VERTICILLIOIDES.** 2015. Curso (Química Ambiental) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

2. Marcos Rechi Siqueira. **PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS MESOFÍLICOS E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES DE BIODIESEL ETÍLICO.** 2012. Curso (Química Ambiental) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Iniciação científica

1. Jéssica Vergani Baraldi. **Otimização da fermentação em estado sólido do fungo *Acremonium* sp para produção de lipase.** 2013. Iniciação científica (Química Ambiental) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Orientação de outra natureza

1. Jéssika de Souza Rossi. **Produção de lipases pelo fungo *Fusarium* sp.** 2012. Orientação de outra natureza (Química Ambiental) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. FERRAREZI A. L., TIERA, V. A. O., **BORGES, J. P.**

Participação em banca de Pedro Henrique Vendramini. **Imobilização da enzima comercial thermomyces lanuginosus em suporte hidrofóbico com diferentes métodos de ativação**, 2012

(Química Ambiental) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Dedico esta conquista aos meus pais e a minha irmã, que acreditaram em mim, me deram apoio nas horas que mais precisei e souberam me entender nos dias em que tudo parecia dar errado.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me iluminar, me inspirar e me ajudar em todos os momentos.

Aos meus pais, Lindineide e Waldyr, por tudo que fizeram por mim a vida inteira, por confiarem em mim, por me apoiarem e por me ajudarem a tornar meus sonhos realidade.

A minha irmã, Andreia, pela amizade, companheirismo, descontração e principalmente por me ajudar a encarar com mais fibra os problemas.

Aos meus orientadores, Profa. Dr. Daniela Alonso Bocchini Martins e Prof. Dr. Roberto da Silva, pelas oportunidades concedidas durante o doutorado, pela atenção, ensinamentos e principalmente pela valiosa amizade.

À Profa. Dra. Eleni Gomes, Prof. Dr. Mauricio Boscolo e Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, pela ajuda, colaboração e valiosas sugestões.

Aos Professores José Manuel Guisan, Gloria Lourente-Fernandez e Benevides e seus alunos Caio e Sônia, que me receberam em seus laboratórios na Universidade Autônoma de Madrid, durante meu doutorado sanduiche e me ensinaram muitas das metodologias que utilizei neste Trabalho.

Aos meus grandes amigos Ana Lúcia Ferrarezi, Thiago Ohe e José Carlos Quíles Junior, por tudo que passamos juntos, desde as dificuldades encontradas durante o desenvolvimento deste projeto, as risadas e momentos tão especiais que tive com eles.

Aos meus alunos de IC, Marcos Rechi Siqueira, Jéssica Fernanda Alves do Santos, Jéssica Rossi e Jéssica Beraldi, por toda a ajuda e apoio no desenvolvimento desse projeto e pela amizade que tantas vezes foi o que me manteve firme para realizar esta pesquisa.

As minhas amigas Josiane Pereira e Natalia Paganini, por sempre me receberem muito bem e me darem asilo nos dias que precisei ficar em Araraquara.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia aplicada e do Laboratório de Sucroquímica e química analítica pelas risadas, choros e desabafos, valeu mesmo.

A técnica Daniela Oliveira do Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Campus da UNESP de São José do Rio Preto pelo auxílio, dedicação e atenção.

A CAPES, pelo imprescindível apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis." (José de Alencar)

RESUMO

Este trabalho visou produzir e estudar a lipase do fungo *Fusarium verticillioides*. A enzima obtida foi avaliada quanto à capacidade de hidrólise, esterificação e transesterificação para a produção de ácidos graxos e ésteres. A cepa fúngica foi cultivada em diferentes meios de cultura, variando as fontes de nitrogênio e de carbono, avaliando-se as atividades. Verificou-se que o tipo de atividade e especificidade da lipase dependem dos nutrientes utilizados nos meios de cultivo do fungo por fermentação em estado sólido. A lipase foi caracterizada físico-quimicamente e apresentou temperatura ótima em 35°C e melhor estabilidade durante 5 horas em 30°C, entretanto a 35°C também foi observada uma boa estabilidade. O pH ótimo foi em 8, e melhor estabilidade em pH ácido (5 e 6). Esta última característica foi muito importante, já que a reação de transesterificação geralmente ocorre em pH 5. A enzima também se mostrou estável na presença de *n*-hexano e etanol e apresentou uma ativação durante 24 horas diante destes solventes orgânicos. Também foi observada a presença de mais de uma lipase na membrana celular da cepa, o que levou a avaliar sua ação na forma de células imobilizadas diretamente em farelo de trigo e na forma livre. A lipase imobilizada na biomassa fúngica também foi caracterizada, apresentando melhor atuação em pH 8, como ocorreu com a lipase extracelular, porém em 30°C. Por meio de planejamentos fatoriais foi possível observar que a lipase apresenta melhor atividade quando se utiliza ácidos graxos e álcoois de cadeias carbônicas maiores, além de atuar melhor em reações de transesterificação, utilizando-se óleo pré-usado. A célula imobilizada em farelo de trigo foi empregada em hidrólises, sendo obtido 34,9 % de ômega 3 a partir do óleo de canola e 70,9 % de ômega 6 a partir do óleo de linhaça em 12 horas de reação. O extrato bruto de enzimas extracelulares foi submetido à imobilização em suportes inertes. Em octil e fenil-sepharose foi possível imobilizar preferencialmente lipase, sendo verificado por meio da reação de hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila e da quantificação de proteínas totais, com posterior dessorção com triton x 100. O suporte Lewatit 105 mostrou-se ideal para ser utilizado nas reações de esterificação e transesterificação, apresentando boa estabilidade na temperatura ótima da enzima (35°C) e em solução com até 50 % de etanol, também sendo ativado neste meio. Este suporte foi escolhido para aplicação na produção de ésteres etílicos. A enzima extracelular imobilizada e a célula inteira foram aplicadas em reações de esterificação e transesterificação resultando em rendimentos entre 5 e 12 % de ésteres etílicos.

Palavras-chave: Lipase. Hidrólise. Esterificação. Transesterificação.

ABSTRACT

This work aimed to produce and study the lipase from the *Fusarium verticillioides* fungus. The enzyme obtained was evaluated according to its capacity of hydrolysis, esterification and transesterification to the production of fatty acids and esters. The fungal strain was cultivated in different culture media, varying sources of nitrogen and carbon, evaluating the activities. It was found that the type of activity and the specificity of the lipase depend on the nutrients used in the fungus culture media by fermentation in solid state. The lipase was physically and chemically characterized and presented optimum temperature at 35°C and better stability during 5 hours at 30°C; however, at 35°C it was also observed good stability. The optimum pH was 8 and the stability was better at acid pHs (5 and 6). This last feature was very important, since the transesterification reaction usually happens at pH 5. The enzyme was also stable in the presence of *n*-hexane and ethanol and presented hyper-activation during 24 hours before these organic solvents. It was also observed the presence of more than one lipase on the cell membrane of the strain, which led to the evaluation of its action in the form of immobilized cells directly in wheat bran and in free form. The lipase immobilized in the fungal biomass was also described presenting better performance at pH 8, as it happened with the extracellular lipase, but at 30°C. Through factorial design, it was possible to observe that the lipase has better activity when fatty acids and alcohols from higher carbon chains are used, besides performing better in transesterification reactions using oils pre-used. The immobilized cell in wheat bran was used in hydrolysis, being 34.9 % of omega 3 obtained from canola oil and 70.9 % of omega 6 from linseed oil in 12 hours of reaction. The extracellular enzyme crude extract was submitted to immobilization in inert carriers. In octyl and phenyl-sepharose, it was possible to immobilize preferably lipase, being it verified through the *p*-nitrophenyl butyrate hydrolysis reaction and the quantification of total proteins, with subsequent desorption with triton x 100. The Lewatit 105 carrier proved ideal to be used in the esterification and transesterification reactions, presenting good stability at the enzyme optimum temperature (35°C) and in solution with up to 50 % of ethanol, also, being hyper-activated in this medium. This carrier was chosen to be used in the production of ethyl esters. The extracellular immobilized enzyme and the whole cell were used in esterification and transesterification reactions, resulting in returns between 5 and 12 % of ethyl esters.

Key words: Lipase. Hydrolysis. Esterification. Transesterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Estrutura 3D da lipase de <i>Y. lipolytica</i> 2 (YLip2), apresentando a típica estrutura α/β -hidrolase e a tríade catalítica composta dos S162, D230 e H289.	33
Figura 1.2 -	Esquema de reação de hidrólise proposto para a lipase A de <i>Candida antarctica</i> com indicação das etapas envolvidas.	34
Figura 1.3 -	Diagrama esquemático da localização das isoformas de lipase em <i>R. oryzae</i> células	39
Figura 1.4 -	Métodos de imobilização de enzimas	42
Figura 1.5 -	Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas	43
Figura 2.1 -	Diâmetro de crescimento do fungo <i>F. verticillioides</i> P24 em placa de Petri em relação à temperatura utilizando-se azeite de oliva como fonte de carbono e o meio descrito no item 3.2.1.	58
Figura 2.2 -	Relação entre a temperatura de fermentação e a atividade hidrolítica. O fungo <i>F. verticillioides</i> P24 foi cultivado em farelo de trigo utilizando-se azeite de oliva como fonte de carbono.	59
Figura 2.3 -	Atividade hidrolítica de lipases produzidas em fontes de nutrientes distintas frente ao substrato <i>p</i> -NPP	60
Figura 2.4 -	Atividade hidrolítica relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de carbono utilizando-se palmitato de <i>p</i> -nitrofenila como substrato	62
Figura 2.5 -	Atividade hidrolítica relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de nitrogênio utilizando-se palmitato de <i>p</i> -nitrofenila como substrato	63
Figura 2.6 -	Efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da lipase frente ao substrato palmitato de <i>p</i> -nitrofenila, realizada em pH 7	64
Figura 2.7 -	Efeito do pH sobre a atividade hidrolítica da lipase frente ao palmitato de <i>p</i> -nitrofenila, realizada a 35°C	64
Figura 2.8 -	Efeito da temperatura sobre estabilidade da lipase em pH 8	66
Figura 2.9 -	Efeito do pH sobre estabilidade da lipase a temperatura ambiente	66
Figura 2.10 -	Efeito de solventes sobre a estabilidade da lipase a temperatura ambiente	68
Figura 2.11 -	Efeito de detergentes sobre a estabilidade da lipase a temperatura ambiente	69
Figura 2.12 -	Seletividade da lipase frente a substratos de cadeias	70

	carbônicas de tamanhos diferentes	
Figura 2.13 -	SDS-PAGE eletroforese dos extratos enzimáticos.	72
Figura 3.1 -	Esquema de reator para síntese de biodiesel etílico com irradiação de ultrassom utilizando sonda ultrassônica	89
Figura 3.2 -	Atividade hidrolítica de lipases produzidas em fontes de nutrientes distintas frente ao óleo de oliva	91
Figura 3.3 -	Atividade de esterificação de lipases produzidas em fontes de nutrientes distintas frente ao ácido oleico e etanol	92
Figura 3.4 -	Atividade de transesterificação de lipases produzidas em fontes de nutrientes distintas frente ao óleo de soja e etanol	93
Figura 3.5 -	Atividade hidrolítica relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de carbono utilizando-se óleo de soja como substrato	94
Figura 3.6 -	Atividade esterificante relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de carbono utilizando-se ácido oleico como substrato	96
Figura 3.7 -	Rendimento de transesterificação relativo da síntese de ésteres etílicos a partir de óleo de soja, produzidos com enzimas fermentadas em diferentes fontes de carbono	97
Figura 3.8 -	Atividade hidrolítica relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de nitrogênio utilizando-se óleo de soja como substrato	98
Figura 3.9 -	Atividade esterificante relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de nitrogênio utilizando-se ácido oleico como substrato	99
Figura 3.10 -	Rendimento de transesterificação relativo das lipases produzidas em diferentes fontes de nitrogênio utilizando-se óleo de soja e etanol como substrato	100
Figura 3.11 -	Atividade hidrolítica da célula ligada membrana frente a diferentes óleos naturais	101
Figura 3.12 -	Diagrama de Pareto das variáveis manipuladas no planejamento 1 sobre a atividade de esterificação do fungo <i>F. verticillioides</i>	105
Figura 3.13 -	Diagrama de Pareto das variáveis manipuladas no planejamento 2 sobre a atividade de esterificação do fungo <i>F. verticillioides</i>	107
Figura 3.14 -	Efeito da temperatura sobre o rendimento de ésteres etílicos, em pH 5,8	109
Figura 3.15 -	Efeito do pH sobre o rendimento de produção de ésteres etílicos a 30°C	110
Figura 3.16 -	Diagrama de Pareto do planejamento 3 sobre a atividade de transesterificação do fungo <i>F. verticillioides</i>	112

Figura 3.17 -	Diagrama de Pareto das variáveis manipuladas no planejamento 4 sobre a atividade de transesterificação do fungo <i>F. verticillioides</i>	114
Figura 3.18 -	Rendimento das reações de transesterificação utilizando-se vários óleos naturais e a célula do fungo <i>F. verticillioides</i> imobilizada em farelo de trigo	115
Figura 4.1 -	Sobrenadante e suspensão enzimática após o processo de imobilização	138
Figura 4.2 -	SDS-PAGE eletroforese dos sobrenadantes após imobilização	139
Figura 4.3 -	SDS-PAGE eletroforese dos sobrenadantes após a dessorção da lipase dos suportes	140
Figura 4.4 -	Efeito da temperatura aparente (35°C) sobre a estabilidade dos derivados de lipase	141
Figura 4.5 -	Efeito de etanol 50 % sobre a estabilidade dos derivados de lipase a temperatura ambiente	142
Figura 4.6 -	Espectros de infravermelho do suporte Lew. 105 (preto) e seu derivado (vermelho)	143
Figura 4.7 -	Curvas da perda de massa em função da temperatura (TGA) e derivada da perda de massa (DTG) do suporte Lew. 105 (a) e de seu derivado (b) realizado em atmosfera de N ₂	144
Figura 4.8 -	Variação de energia em relação à temperatura (DSC) do suporte Lew. 105 (a) e do seu derivado (b) realizado em atmosfera de N ₂	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 -	Soluções nutrientes que foram testados na FES	51
Tabela 2.2 -	Quantificação da atividade específica das lipases produzidas pelo <i>F. verticillioides</i>	71
Tabela 3.1 -	Soluções nutrientes que foram testados na fermentação	81
Tabela 3.2 -	Valores utilizados nos planejamentos 1 e 2	85
Tabela 3.3 -	Valores utilizados nos planejamentos 2 ³	87
Tabela 3.4 -	Valores utilizados nos planejamentos 2 ²	87
Tabela 3.5 -	Concentração (mmol.L ⁻¹) e porcentagem de conversão de ácidos graxos produzidos	102
Tabela 3.6-	Matriz do planejamento fatorial 1 (valores reais e codificados) com as respostas da atividade esterificação para as células imobilizadas em trigo	104
Tabela 3.7 -	Matriz do planejamento fatorial 2 (valores reais e codificados) com as respostas da atividade esterificação para as células imobilizadas em trigo	106
Tabela 3.8 -	Produção de ésteres etílicos através da reação de esterificação	108
Tabela 3.9 -	Produção de ésteres etílicos utilizando-se água no meio reacional	110
Tabela 3.10 -	Matriz do planejamento fatorial 3 (valores reais e codificados) com as respostas da atividade transesterificação para as células imobilizadas em trigo	111
Tabela 3.11 -	Matriz do planejamento fatorial 4 (valores reais e codificados) com as respostas da atividade transesterificação para as células imobilizadas em trigo	113
Tabela 3.12 -	Produção de ésteres etílicos através da reação de Transesterificação	116
Tabela 4.1 -	Dados de imobilização e dessorção da lipase em suportes inertes	137
Tabela 4.2 -	Valores de área superficial total e da quantidade de gás adsorvida a partir da técnica BET do suporte Lew. 105 e de seu derivado	146
Tabela 4.3 -	Produção de ésteres etílicos utilizando-se o derivado Lew. 105 como catalisador	147
Tabela A.1 -	Principais ácidos graxos presentes nos óleos utilizados	160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG - ácido graxo

AGPIs - ácidos graxos poliinsaturados

BET - área superficial total

C - carbono

C18 - octadecil-sepharose

CM - CM-sepharose

CNBr - agarose-brometo de cianogênio

CTAB - brometo hexadeciltrimetilamônio

DEAE - DEAE-sepharose

DSC - calorimetria diferencial exploratória

DTG - derivada termogravimétrica

Fenil - fenil sepharose

FES - fermentação em estado sólido

FID - flame ionization detector (detector de ionização de chama)

FSm - fermentação submersa

FTIR-ATR - espectroscopia na região de infravermelho com refletância atenuada total

GC - gas chromatography (cromatografia gasosa)

HPLC - high-performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta performance)

Lew. 1006 - lewatit VP OC 1006

Lew. 105 - lewatit CNP-105

N - nitrogênio

Octil - octil-sepharose

PEI - PEI-agarose

p-NP - *p*-nitrofenol

p-NPB - butirato de *p*-nitrofenila

p-NPD - decanoato de *p*-nitrofenila

p-NPDD - dodecanoato de *p*-nitrofenila

p-NPP - palmitato de *p*-nitrofenila

SDS - dodecil sulfato de sódio

TGA - análise termogravimétrica

U - atividade enzimática

UV - ultravioleta

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA TESE	26
CAPÍTULO I - Revisão Bibliográfica: Lipases: características, ação, produção, imobilização e aplicações	27
Resumo	28
Abstract	29
1 LIPASE	30
2 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS INTEIRAS	36
3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR	40
CAPÍTULO II - Produção e Caracterização de Enzima Extracelular	44
Resumo	45
Abstract	46
1 INTRODUÇÃO	47
2 OBJETIVOS	49
2.1 Objetivos Específicos	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 Microrganismo	50
3.2 Meios de cultura	50
3.2.1 Pré-inóculo	50
3.2.2 Solução nutriente	51
3.3 Fermentação em estado sólido (FES)	51
3.4 Efeito da temperatura sobre o crescimento da cepa e sobre a atividade enzimática	52
3.5 Concentração do extrato enzimático bruto	52
3.6 Determinação da atividade hidrolítica em substrato cromogênico	53
3.7 Caracterização bioquímica da lipase extracelular do fungo <i>Fusarium verticillioides</i>	54
3.7.1 Efeito da temperatura e pH ótimos	54
3.7.2 Efeito da estabilidade em pH e temperatura	54
3.7.3 Estabilidade em solventes orgânicos e detergentes	55
3.8 Proteína total	55
3.9 Quantificação das lipases extracelular, ligada à membrana e do citoplasma	55
3.10 Eletroforese	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Estudo de parâmetros para produção enzimática	57
4.1.1 Efeito da temperatura sobre o crescimento da cepa e sobre a produção enzimática	57
4.1.2 Influência de soluções nutrientes utilizadas na FES sobre a produção enzimática	59
4.1.3 Influência de fontes de carbono sobre a produção enzimática	60

4.1.4	<i>Influência das fontes de nitrogênio sobre a produção enzimática</i>	62
4.2	Caracterização enzimática	63
4.2.1	<i>Efeito da temperatura e do pH na atividade hidrolítica</i>	63
4.2.2	<i>Efeito da temperatura e do pH na estabilidade enzimática</i>	65
4.2.3	<i>Efeito de solventes sobre a estabilidade enzimática</i>	67
4.2.4	<i>Efeito de detergentes sobre a estabilidade enzimática</i>	68
4.2.5	<i>Seletividade da enzima pelo substrato cromogênico</i>	69
4.3	Quantificação da atividade hidrolítica das enzimas extracelular e intracelular	71
5	CONCLUSÃO	73
CAPÍTULO III - Imobilização da célula contendo lipase em farelo de trigo, caracterização e aplicação da enzima		74
Resumo		75
Abstract		76
1	INTRODUÇÃO	77
2	OBJETIVOS	79
2.1	Objetivos Específicos	79
3	MATERIAIS E MÉTODOS	80
3.1	Meios de cultura	80
3.1.1	<i>Pré-inóculo</i>	80
3.1.2	<i>Solução nutriente</i>	80
3.2	Fermentação em estado sólido (FES)	81
3.2.1	<i>Imobilização de hifas utilizando substrato de crescimento como suporte</i>	82
3.3	Determinação da atividade enzimática	82
3.3.1	<i>Atividade Hidrolítica utilizando óleo de oliva</i>	82
3.3.2	<i>Atividade de esterificação</i>	83
3.3.2.1	<u><i>Planejamento fatorial completo</i></u>	84
3.3.3	<i>Atividade de transesterificação</i>	85
3.3.3.1	<u><i>Planejamento fatorial completo</i></u>	87
3.4	Produção de ácidos graxos poliinsaturados (ômega 3 e 6)	87
3.5	Produção de ésteres etílicos	88
3.6	Síntese de ésteres etílicos com irradiação de ultrassom	88
3.7	Determinação da acidez dos óleos	89
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.1	Estudo de parâmetros para produção de enzima ligada a membrana	90
4.1.1	<i>Influência de soluções nutrientes utilizadas na FES sobre a produção enzimática</i>	90
4.1.2	<i>Influência de fontes de carbono sobre a produção enzimática</i>	93
4.1.3	<i>Influência das fontes de nitrogênio sobre a produção enzimática</i>	97

4.2	Reações hidrolíticas	101
4.2.1	<i>Atividade enzimática em diferentes óleos naturais</i>	101
4.2.2	<i>Produção de ómega 3 e 6 a partir de óleos vegetais</i>	102
4.3	Reações de esterificação	103
4.3.1	<i>Planejamento fatorial x^y</i>	103
4.3.2	<i>Reações com ácidos graxos de cadeia carbônica media e grande</i>	107
4.4	Reações de transesterificação	108
4.4.1	<i>Efeito da temperatura e do pH ótimos</i>	108
4.4.2	<i>Planejamento fatorial x^y</i>	111
4.4.3	<i>Reações de transesterificação com óleos naturais</i>	114
4.4.4	<i>Reações de transesterificação com substrato sintético</i>	115
4.4.5	<i>Reações de transesterificação com óleo de soja pré-usado</i>	116
4.4.6	<i>Reações de transesterificação com auxilio de ultrassom</i>	117
5	CONCLUSÃO	118
CAPÍTULO IV - Imobilização da Enzima Extracelular em Suportes Inertes		119
Resumo		120
Abstract		121
1	INTRODUÇÃO	122
2	OBJETIVOS	124
2.1	Objetivos Específicos	124
3	MATERIAIS E MÉTODOS	125
3.1	Microrganismo	125
3.2	Meios de cultura	125
3.2.1	<i>Pré-inóculo</i>	125
3.3.2	<i>Solução nutriente</i>	125
3.3	Fermentação em estado sólido (FES)	126
3.4	Concentração do extrato enzimático bruto	126
3.5	Imobilização por adsorção física	126
3.6	Imobilização covalente em Agarose-brometo de cianogênio (CNBr)	127
3.7	Determinação da atividade enzimática	127
3.7.1	<i>Determinação da atividade hidrolítica dos derivados</i>	127
3.7.2	<i>Atividade Hidrolítica utilizando óleo de oliva</i>	128
3.7.3	<i>Atividade de esterificação</i>	129
3.7.4	<i>Atividade de transesterificação</i>	130
3.8	Proteína total	131
3.9	Estudos da força de ligação por adsorção física	131
3.10	Eletroforese	132
3.11	Estabilidade dos derivados em temperatura ótima e em solvente	132
3.12	Caracterização do suporte inerte Lew. 105	132
3.12.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR)</i>	132
3.12.2	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	133

3.12.3	<i>Termogravimetria Derivada (DTG)</i>	133
3.12.4	<i>Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)</i>	133
3.12.5	<i>Área superficial total (BET)</i>	134
3.13	Produção de ésteres etílicos	134
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	135
4.1	Adsorção física e estudo da força de adsorção dos derivados	135
4.2	Estabilidade dos derivados em temperatura ótima e em solvente	140
4.3	Caracterização do suporte Lew. 105	142
4.4	Reações empregando a enzima imobilizada no suporte Lew. 105	146
5	CONCLUSÃO	148
	REFERÊNCIAS	149
	PERSPECTIVAS FUTURAS	158
	APÊNDICE A	159

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está organizada de forma a apresentar um resumo geral com a descrição das principais atividades e resultados desenvolvidos. Segue-se em quatro capítulos, os quais estão divididos de acordo como o tipo de lipase e a imobilização da enzima.

No primeiro capítulo intitulado “Lipases: características, ação, produção imobilização e aplicação” apresenta-se uma revisão bibliográfica geral envolvendo a importância da lipase e seu uso na indústria, assim como meios de imobilização para viabilizar amplamente a sua aplicação.

No segundo capítulo intitulado “Produção e caracterização da lipase extracelular” estão relatados os estudos referentes a lipase extracelular, como a influência de nutrientes utilizados na fermentação em estado sólido sobre a produção de lipase e também a caracterização físico-química desta enzima para a sua utilização nas melhores condições de atuação.

O terceiro capítulo intitulado “Imobilização da célula contendo lipase em farelo de trigo, caracterização e aplicação da enzima” compreende os estudos referentes à enzima ligada a membrana celular imobilizada em farelo de trigo, onde também foi verificado a influência de nutrientes sobre a produção dessa lipase e a caracterização das células imobilizadas através de planejamentos fatoriais. A biomassa imobilizada foi empregada em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação para comprovar a eficiência da enzima utilizada dessa forma.

No quarto e último capítulo intitulado “Imobilização da enzima extracelular em suportes inertes” estão apresentados os estudos da lipase extracelular imobilizada em suportes inertes, compreendendo o uso desses suportes para pre-purificar enzimas e também possibilitar o uso da lipase extracelular em reações com meio orgânico, tornando a lipase mais estável em relação a sua forma livre.

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

Lipases: características, ação, produção, imobilização e aplicações

Resumo

A importância de lipases pode ser observada pelo grande número de artigos publicados recentemente. De fato, ao longo dos últimos anos, tem havido um aumento progressivo no número de publicações relacionadas com aplicações industriais de reações catalisadas por lipase, realizadas em solventes orgânicos comuns, líquidos iônicos, ou mesmo em solventes não-convencionais, tanto nas formas livre quanto imobilizada. Esta revisão bibliográfica fornece uma visão geral sobre os principais aspectos da produção de lipases microbianas, características de estrutura e ação, imobilizações e aplicações. A fermentação submersa e a em estado sólido são revisados, assim como os principais substratos, incluindo o uso de resíduos agroindustriais. O conhecimento atual da estrutura e ação da lipase é discutido. Além disso, é apresentada uma discussão sobre os dois métodos de imobilização, lipase ligada à célula inteira e lipase livre imobilizada em suportes inertes. Nesta revisão é apresentada uma visão geral sobre as perspectivas de usos de lipases.

Abstract

The importance of lipases can be observed by the great number of published articles recently. Actually, over the last few years, there has been a progressive increase in the number of publications related to industrial applications of lipase-catalyzed reactions, performed in common organic solvents, ionic liquids, or even in non-conventional solvents, both in free form as immobilized. This review paper provides an overview regarding the main aspects of microbial lipases production, characteristics of structure and action, immobilization and applications. The submerged and solid-state fermentations are reviewed as well as the main substrates, including the use of agroindustrial residues. Current knowing of lipase structure and action is discussed. Also, is presented a discussion about the two methods of immobilizations, lipase bounded in the whole cell and free lipase immobilized on inert supports. Furthermore, in this review a general overview about perspectives on lipase applications is discussed.

1 LIPASE

As lipases (glicerol éster hidrolase EC 3.1.1.3) pertencem à classe das hidrolases do éster carboxílico. Elas catalisam a hidrólise e/ou síntese da ligação éster (s) de glicerol (fosfo- ou glico) lipídios. Elas se diferenciam das demais esterases por serem ativadas e reagir mais rapidamente quando posicionadas na interface entre a fase não aquosa ou insolúvel (lipídio) e meios aquosos (nos quais a própria lipase é dissolvida). As esterases, por sua vez preferem atuar em substratos dissolvidos na fase aquosa. Por ex. o palmitato de *p*-nitrofenila (ácido graxo (AG) de cadeia longa, insolúvel) é clivado preferencialmente pelas lipases, enquanto o butirato de *p*-nitrofenila (AG de cadeia curta, solúvel em meio aquoso) é preferencialmente clivado pelas esterases. Uma consequência importante desta característica das lipases é que a sua atividade melhora com o aumento da concentração micelar crítica e, assim, na maioria dos casos, não se segue a cinética de Michaelis-Menten. Outra diferença é que as lipases são principalmente caracterizadas pela presença de uma "tampa", formada por oligopeptídeos hidrofóbicos na forma de um laço que cobrem o sítio ativo da enzima (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001, FORESTI; FERREIRA, 2007, KUMAR et al., 2009, TREICHEL et al., 2010, DOBREV et al., 2015).

As lipases são capazes de catalisar a hidrólise e a transferência dos ésteres para outros ésteres (transesterificação), bem como a síntese de outros ésteres a partir de ácidos graxos livres e álcoois (FERNANDES et al. 2007; FERRAREZI et al. 2014).

Estas enzimas são as mais utilizadas na biocatálise, devido à sua ampla especificidade e elevada seletividade, juntamente com uma regioselectividade ou enantiosseletividade em condição aquosa e microaquosas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001, MATEOS et al., 2007, KUMAR et al., 2009, TREICHEL et al., 2010, RUEDA et al., 2015, AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015). Além disso, as lipases são estáveis em vários meios reacionais e tem a capacidade de catalisar muitas reações diferentes, sendo também relatadas com atividades promíscuas (RUEDA et al., 2015).

Devido às características estruturais únicas, esta enzima pode catalisar reações envolvendo substratos orgânicos insolúveis utilizando a interface água/solvente, mantendo sua atividade catalítica em solvente orgânico, sistemas bifásicos e soluções miceliares (HUNG et al., 2003). Como as lipases catalisam uma ampla gama de reações, elas são utilizadas em várias aplicações industriais, como na

indústria de alimentos, farmacêutica, sínteses de carboidratos, biodetergentes, cosméticos e perfumaria (HUNG et al., 2003, PÉREZ et al., 2011, GODOY et al., 2013), gerando produtos de alto valor agregado (TAN; WANG; ZHANG, 2002, CHEIRSILP; KAEWTHONG; H-KITTIKUN, 2007), como os ácidos graxos poliinsaturados (FUFAs) que têm várias funções fisiológicas de grande importância (PÉREZ et al., 2011).

Outros produtos de alto valor agregado são as formas de enantiômeros puros (BREIVIK; HARALDSSON; KRISTINSSON, 1997, SHIMADA et al., 2002, NAGY et al., 2006), onde as enzimas são utilizadas para preparar produtos opticamente puros, uma vez que algumas lipases podem modificar apenas um deles, através de sua alta enantiosseletividade e facilitar a separação dos produtos (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002, LI et al., 2014). Como as lipases utilizam outros nucleófilos além de água, como álcoois e aminas, se o nucleófilo for uma mistura racêmica, a reação pode ser estereosseletiva, de modo que uma resolução cinética ocorre. Na verdade, a resolução cinética catalisada por lipases, tem sido descrita como um método útil para a produção de compostos com elevada pureza óptica, incluindo álcoois, aminas, aminoácidos, ácidos carboxílicos e seus ésteres (MIRANDA; MIRANDA; SOUZA, 2015).

A lipase também tem sido utilizada para acelerar a degradação de resíduos de gordura e derivados (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), sendo aplicadas principalmente em biorreatores, constituindo importante ferramenta em tratamento de resíduos domésticos e industriais (NYBROE; JØRGENSEN; HENZE, 1992, BALCÃO; PAIVA; XAVIER, 1996, SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Nos últimos anos houve um rápido desenvolvimento das aplicações das lipases, sendo impulsionado pelas legislações da União Europeia e dos Estados Unidos que afirmam que produtos naturais como aromatizantes e fragrâncias podem ser preparados a partir de fontes naturais por processos físicos (extração de fontes naturais) ou por processos biotecnológicos que envolvem precursores isolados da natureza. Alguns processos de biotransformação que utilizam enzimas ou células inteiras já foram implementados para produzir o 1-feniletanol, composto utilizado em vários produtos farmacêuticos e produtos de higiene pessoal. Biocatalisadores também tem sido utilizados para a preparação de acetato de laurato, o aroma de coco (SOLARTE et al., 2014).

Estas enzimas são produzidas por plantas, animais e microrganismos, porém as lipases microbianas apresentam maior versatilidade, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, ao alto rendimento de obtenção das enzimas, à facilidade de manipulação genética, a não dependência da sazonalidade e ao rápido crescimento microbiano (NWUCHE; OGBONNA, 2011). As lipases microbianas são principalmente extracelulares e sua produção é muito influenciada pela composição do meio. A síntese dessas enzimas pode ser aumentada por um componente lipídico como óleo, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis e glicerol, sendo a fonte de carbono o principal fator para a expressão da atividade enzimática. O tipo e a concentração de nitrogênio também podem influenciar a produção de lipase por fungos e a relação C/N tem grande efeito sobre a biossíntese da enzima (DOBREV et al., 2015).

Os microrganismos produtores de lipases tem sido encontrados em diversos habitats, como resíduos de indústrias de óleos vegetais e laticínios, em solos contaminados com óleo, em sementes oleaginosas e alimentos em decomposição (TREVISAN, 2004). As lipases obtidas de microrganismos mesofílicos atuam geralmente entre 25 e 45°C, permitindo que as reações sejam realizadas a temperatura ambiente e as fermentações para produções das enzimas podem ocorrer sem a necessidade de aquecimento. Alguns microrganismos mesofílicos também podem produzir lipases termoestáveis (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As enzimas podem ser produzidas por dois tipos de processos, a fermentação submersa (FSm) e a fermentação em estado sólido (FES). A FSm é amplamente utilizada na indústria de enzimas e tem vantagens no controle do processo e bons rendimentos de enzimas extracelulares, entretanto os produtos são relativamente diluídos resultando em altos volumes de efluentes (esgoto). Como uma alternativa, a FES foi desenvolvida e provou ser uma maneira econômica para a produção de várias enzimas, incluindo lipases e esterases (NAGY et al., 2006, SUN; XU, 2008).

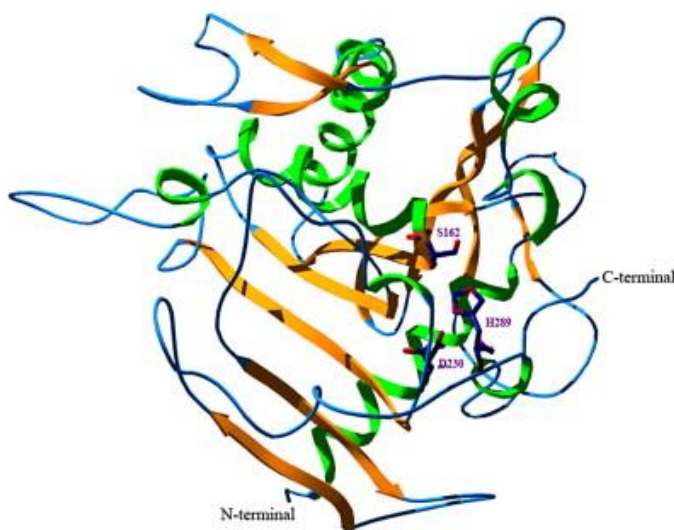
A FES é uma ferramenta promissora no campo da biotecnologia para a produção de metabólitos microbianos através de meios pouco dispendiosos, além de ser um processo mais adequado para países em desenvolvimento. A FES tem inúmeras vantagens sobre FSm convencional, uma vez que é parecida com o habitat natural de vários microrganismos e há melhor circulação de oxigênio (SUN; XU, 2008).

Há relatos de produção de lipases de diferentes espécies por FES, incluindo *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium candidum*, *Penicillium camembertii*, *Rhizopus sp.*, *Rhizopus oligosporous*, *Rhizopus rhizopodiformis* e

Rhizomucor pusillus, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Mucor racemosus*, *Aspergillus niger*, *Yarrowia lipolytica* e *Cândida rugosa*. Uma análise econômica de produção de lipases por *P. restrictum* por FES e FSm revelou que, para uma escala de produção de 100 m³/ano, FES é mais econômica do que FSm (NAGY et al., 2006).

As lipases pertencem a família de superestrutura da α/β -hidrolases (Figura 1.1) cuja atividade depende principalmente da tríade catalítica formada por serina, histidina e ácido aspártico/ácido glutâmico, o qual opera pelo mecanismo característico das serinas hidrolases, que é semelhante tanto para as reações de hidrólise quanto para as reações de síntese (ERICSSON et al., 2008, LI et al., 2014, DOBREV et al., 2015).

Figura 1.1 – Estrutura 3D da lipase de *Y. lipolytica* 2 (YLip2), apresentando a típica estrutura α/β -hidrolase e a tríade catalítica composta dos S162, D230 e H289.

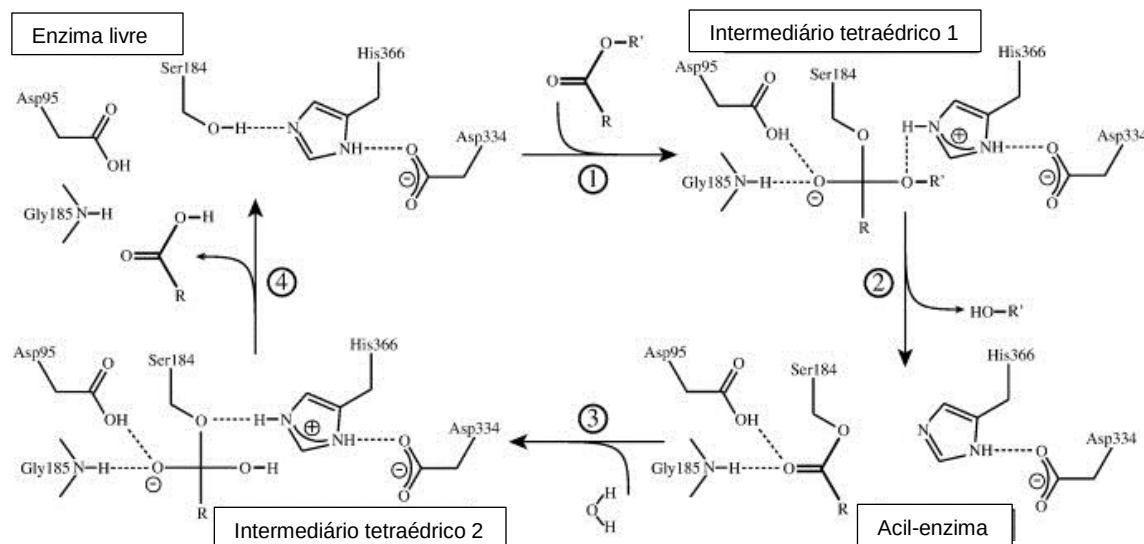


Fonte: Liu et al. (2014)

Na primeira etapa da hidrólise, o éster se liga ao sítio ativo da enzima através de um ataque nucleofílico pela Serina à carbonila da ligação éster do substrato. A Serina é ativada pela retirada de um próton pelo par Histidina/Aspartato. Nesta etapa é formado um intermediário tetraédrico que é estabilizado por ligações de hidrogênio com uma Glicina (Gly185) e pela cadeia protonada de outro resíduo de Aspartato (Asp95). Na segunda etapa a Histidina cede um próton para a liberação de um álcool, tornando o intermediário tetraédrico instável (complexo acil-enzima). Na etapa 3, o complexo acil-enzima sofre um ataque nucleofílico pela água para formar

um novo intermediário tetraédrico, o qual, em seguida colapsa para liberação dos produtos e regeneração da enzima (ERICSSON et al., 2008). Na Figura 1.2 é mostrado o esquema proposto de hidrólise realizado pela lipase.

Figura 1.2 - Esquema de reação de hidrólise proposto para a lipase A de *Candida antarctica* com indicação das etapas envolvidas.



Fonte: Ericsson et al (2008)

A maioria das lipases apresenta um mecanismo interfacial de ativação devido a uma cadeia de aminoácidos hidrofóbicos que cobrem o seu sítio ativo, chamada “lid” ou “tampa”, cujo comprimento e complexidade dependem da enzima. Essa cadeia de aminoácidos confere a forma aberta-fechada da enzima, que na presença de uma interface polar-apolar, como uma gota de óleo, uma importante mudança conformacional ocorre, onde a “tampa” é deslocada e a enzima apresenta sua forma aberta e ativa (PALOMO et al., 2004, SECUNDO et al., 2006, FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008, GUPTA et al., 2010, QUILLES et al., 2015).

Ativação interfacial da lipase é um dos fenômenos que a difere da esterase, enzima da classe das hidrolases que também possuem a tríade catalítica serina, histidina e ácido aspártico/ácido glutâmico. As esterases obedecem ao clássico modelo de cinética de Michaelis Menten, enquanto as lipases precisam de uma concentração mínima de substrato antes de apresentar atividade para ativação da “lid”. Além disso, as lipases preferem substratos insolúveis em água, normalmente composto por triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia longa, já as esterases hidrolisam preferencialmente ésteres “simples”, como acetato de etila e geralmente

triglicerídeos de ácidos graxos de cadeias mais curtas do que 6 carbonos (BORNSCHEUER, 2002).

As lipases tem sido muito utilizadas, pois são razoavelmente tolerantes a solventes orgânicos e temperaturas elevadas, não requerem o uso de coenzimas, além de serem consideradas altamente específicas. Desse modo, é importante estabelecer as condições ótimas de atuação, tendo em vista as características desejadas do produto para aplicação industrial específica (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998, SUAREZ et al., 2009).

2 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS INTEIRAS

As lipases são capazes de catalisar tanto reações de esterificação, utilizando-se ácidos graxos livres, quanto reações de hidrólise e transesterificação onde são utilizados triglicerídeos. Com isso as lipases tem vantagens sobre os catalisadores químicos convencionais que não conseguem utilizar óleos vegetais com altas concentrações de ácidos graxos livres, seguindo a rota de saponificação na presença desses ácidos, e não a de transesterificação. Além disso, o uso de biocatalisadores também evita preocupações com o meio ambiente e corrosão dos equipamentos (GULDHE et al., 2016).

A aplicação industrial de lipases comerciais imobilizadas ainda é limitada devido ao seu alto custo, que compreende mais de 90 % do custo total de produção dos ésteres, estando ligado ao tipo de suporte utilizado para imobilização das enzimas (AMORIM et al., 2003, ABD-ALLA et al., 2015, GULDHE et al., 2016). Uma maneira para reduzir o custo das lipases é empregar células imobilizadas no próprio substrato durante o processo de produção por FES, evitando as etapas de recuperação e purificação a partir do caldo de fermentação (ROBLES-MEDINA et al., 2009, FERRAREZI et al., 2014). Semelhante às enzimas imobilizadas, a estabilidade e a capacidade de reutilização das lipases de células inteiras podem ser significativamente melhoradas em comparação com enzimas livres (YAN; ZHENG; LI, 2014)

Vários estudos tem relatado a utilização de microrganismos, tais como leveduras e fungos como “whole-cell” (células inteira imobilizadas) na tentativa de melhorar a relação custo-eficácia de processos de bioconversão. As células de fungos filamentosos tem se mostrado como o biocatalisador de células inteiras mais promissor para aplicações industriais, uma vez que podem ser imobilizados de forma espontânea sobre as partículas de biomassa durante a fermentação, tornando este biocatalisador prático e com varias vantagens comerciais (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009, TALUKDER et al., 2013). As hifas fúngicas podem reter vários tipos de enzima, imobilizando-as pelo crescimento dos fungos sobre um substrato sólido, resultante em um biocatalisador natural (FERRAREZI et al., 2014)

Catalisadores de células inteiras podem ser facilmente preparados em grande escala devido ao cultivo simples e imobilização no processo, que pode ser implementado em plantas de produção em larga escala (GULDHE et al., 2016).

Esses biocatalisadores representam um processo atraente para a criação de novas aplicações, particularmente na produção de grandes quantidades de produtos de base, tais como biodiesel e poliésteres, porque não requer purificação adicional ou imobilização (HAMA et al., 2006). As células inteiras de leveduras também já foram utilizadas na indústria de combustíveis e nas indústrias de alimentos, produtos farmacêuticos e sínteses químicas (LIU et al., 2014).

Carvalho et al. (2015) estudaram a produção de biodiesel utilizando células do fungo *Mucor circinelloides* imobilizadas em poliuretano em um sistema contínuo e observaram resultados promissores para este tipo de processo, obtendo taxas entre 80 e 93 % de conversão de óleo de coco em ésteres etílicos. HE et al. (2008) também estudaram a produção de biodiesel utilizando-se células inteiras do fungo *Rhizopus chinensis* e conseguiram uma conversão de 86,7 % de ésteres metílicos após 72 horas de reação na presença de *n*-heptano, empregando óleo de soja e metanol como reagentes.

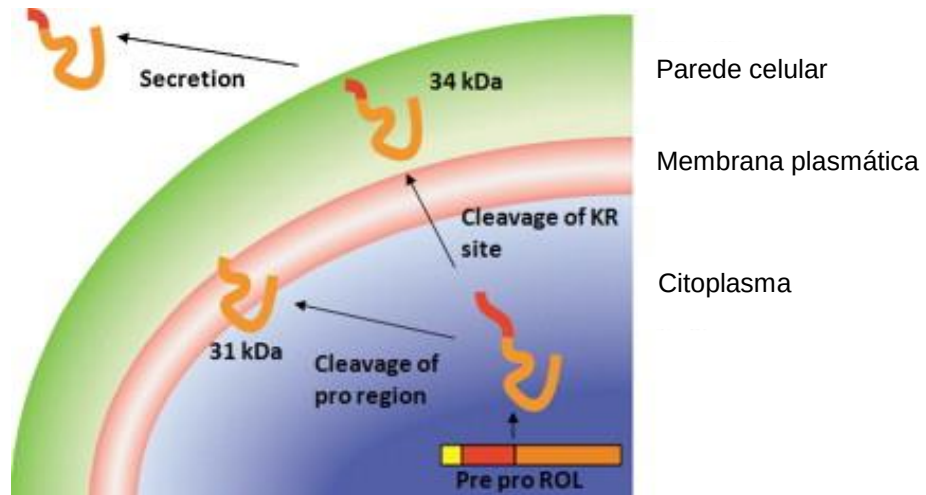
Os ésteres sintetizados a partir de ácidos graxos de cadeia curta e de álcoois são um grande grupo de compostos de aromas e fragrâncias, amplamente usados em produtos alimentares, cosméticos, bebidas e fármacos (SUN; XU, 2008, YAN; ZHANG; WANG, 2014). Estes compostos podem ser extraídos diretamente de fontes naturais, porém com um custo elevado devido ao baixo rendimento por extração e a escassez de alguns materiais naturais. Entretanto os compostos obtidos por este meio podem ser rotulados como "naturais". Esses ésteres também podem ser obtidos por síntese química, que requerem alta temperatura, além de um custo ambiental elevado, porém os produtos não podem ser rotulados como "naturais". A síntese enzimática de ésteres de cadeia curta vem ganhando uma atenção crescente devido às vantagens das condições suaves de reações e alta eficiência catalítica. Através da bioconversão, os compostos obtidos poderão ser denominados como "naturais". Ésteres de cadeia curta já foram sintetizados com sucesso por lipases, cutinases e esterases obtidas a partir de *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cândida*, *Pseudomonas*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Saccharomyces* e *Thermomyces*. Células inteiras de *Aspergillus oryzae* foram utilizadas para produzir ésteres de cadeias curtas utilizando ácidos graxos de 2 a 8 carbonos, sendo obtido cerca de 50 % de octanoato de etila após 16 horas de reação (YAN; ZHANG; WANG, 2014).

Na literatura sobre o sistema de FES, a maioria dos trabalhos estão focados em lipases extracelulares que são facilmente extraídas, entretanto há poucos relatos referindo-se a produção de lipases por “whole-cell”. Na verdade, os fungos filamentosos são capazes de penetrar em substratos sólidos, auxiliado pela presença de pressão de turgescência na ponta do micélio, crescendo em grandes aglomerados e, portanto, facilitando a utilização de células inteiras a partir do substrato sólido (SUN; XU, 2008).

Alguns estudos demonstraram que os ácidos graxos afetam as propriedades da membrana plasmática, mostrando que a permeabilidade da membrana é significativamente mudada pela composição do ácido graxo utilizado na fermentação. Células que foram cultivadas com ácido oleico ou linoleico (ácidos graxos insaturados) apresentaram atividade maior em reações de metanólise, enquanto que células cultivadas com ácido palmítico (ácido graxo saturado) apresentaram maior estabilidade enzimática (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009).

Com os esforços para desenvolver biocatalisadores de célula inteira que possuem uma elevada atividade intracelular de transesterificação, muita atenção tem sido dada à produção de dessas enzimas. A caracterização de lipases intracelulares realizada por Hama et al. (2006) sugeriu que os fungos filamentosos imobilizados dentro de partículas de biomassa produziram isoformas de lipase no interior das células, mostrando que há lipases na parede celular, na membrana plasmática e no citoplasma (Figura 1.3). Para efeito de facilidade, as enzimas ligadas à parede celular e à membrana plasmática, vão ser sempre referidas como lipases ligadas à membrana.

Figura 1.3 - Diagrama esquemático da localização das isoformas de lipase em *R. oryzae* células.



Fonte: Hama et al. (2006)

Outra tecnologia que pode auxiliar a utilização de lipases é o emprego de ultrassom, que tem se mostrado muito eficaz na catálise enzimática. A irradiação contínua ou intermitente de ondas sonoras de alta frequência favorece a ação de diferentes enzimas em sistemas monofásicos e bifásicos (SHAH; GUPTA, 2008, ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009, BABICZ et al., 2010). Essa tecnologia é reconhecida como um método eficaz para aumentar a taxa de transferência de massa entre líquidos imiscíveis, sendo amplamente utilizada em várias reações químicas e biológicas para melhorar o rendimento da reação em um tempo mais curto (LAM; LEE; MOHAMED, 2010).

3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR

A tecnologia enzimática apresenta relevância significativa na indústria, representando ferramentas promissoras para a síntese de compostos de alto valor agregado, além de apresentar muitas vantagens em comparação com catalisadores inorgânicos. Com a utilização de enzimas como catalisador é possível obter uma maior regiosseletividade, além de um menor consumo de energia e maior atividade catalítica. Mesmo com essas vantagens a substituição de catalisadores químicos por enzimas não é amplamente utilizada em processos industriais, uma vez que esses biocatalisadores são instáveis e difíceis de separar do produto final, impossibilitando a sua recuperação e a reutilização (NYARI et al., 2016).

Muitos estudos têm sido realizados no desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades superiores e também na elucidação de técnicas que permitam usos repetidos ou em processos contínuos.

As lipases livres tem limites para utilização industrial, uma vez que são instáveis e não é possível a recuperação após a sua utilização, encarecendo o processo. As enzimas das células imobilizadas podem apresentar maior estabilidade em relação às lipases livres e também podem ser reutilizadas, tornando processos, como produção de biodiesel, obtenção de ésteres e modificações de gorduras mais baratos.

As enzimas imobilizadas são definidas como enzimas ou células fisicamente confinadas ou localizadas em uma região determinada do espaço com retenção de suas atividades catalíticas (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006). A técnica de imobilização tem grande importância porque, além de permitir a reutilização de biocatalisadores, também permite uma fácil e eficiente separação destas moléculas do meio reacional, e oferece uma melhor estabilidade à enzima em presença de determinados solventes, inibidores e outros agentes desnaturantes, e estabilidade em faixas mais amplas de pH e temperatura (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006, CORCORAN, 1985, PEREIRA et al. 2015, NYARI et al., 2016). Além disso, foi relatado que alguns métodos de imobilização como o de ligações covalentes (MATEO et al., 2000), encapsulação em microcápsulas inorgânicas (MATSUMOTO; KONDO, 2001) e aprisionamento em géis de alginato (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001) podem aumentar a termoestabilidade da enzima. Esta técnica também pode ajudar a proteger a enzima da interação com alguns solventes que

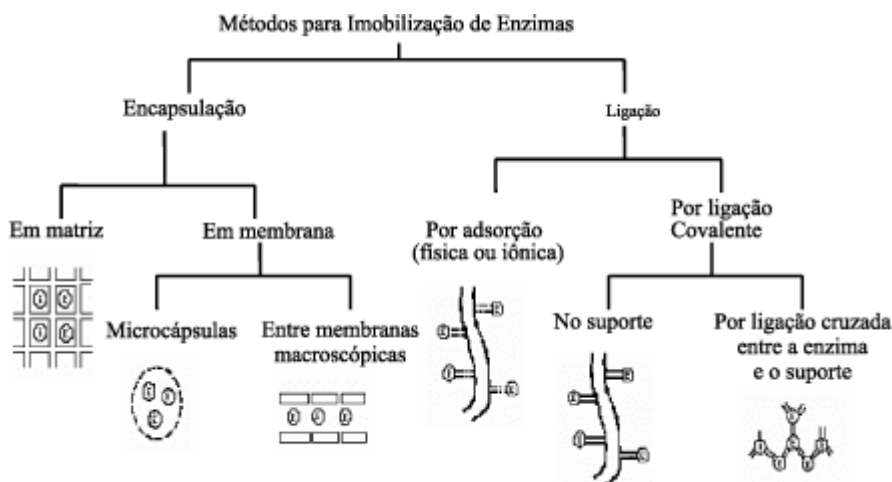
podem provocar a sua inativação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Portanto, a imobilização pode ser a chave para melhorar o desenvolvimento operacional de uma enzima (PEREIRA et al., 2015).

Geralmente as enzimas são imobilizadas para que sua atividade e estabilidade não sejam afetadas durante o processo de síntese, e se possível aumentar a atividade destes biocatalisadores, sem que ocorram alterações estruturais, assim como modificações no sítio ativo. Porém a imobilização pode inibir a atividade enzimática, não sendo possível predizer se este fenômeno irá acontecer antes de se realizar o processo de imobilização (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel utilizando um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, ou através do confinamento em matrizes formada por polímeros de gel ou por meio de uma encapsulação em membrana polimérica (PEREIRA et al., 2015).

A técnica de adsorção é a mais utilizada para imobilização de enzimas, o processo se dá por meio de interações fracas, como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, entre a superfície do suporte e a proteína (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008; TAN et al., 2010). As enzimas também podem ser imobilizadas através de ligações covalentes irreversíveis, e por meio deste método a enzima não é liberada em condições adversas (TREVAN, 1988).

A imobilização de enzimas através da encapsulação de proteínas por uma matriz polimérica também é muito utilizada. Apesar de este método ser rápido e mais viável, só pode ser utilizado quando o substrato apresenta baixa massa molar, uma vez que substratos maiores não conseguem se difundir pelos poros do polímero (RANGANATHAN et al., 2008; TAN et al., 2010). A Figura 1.4 mostra alguns dos métodos de imobilização.

Figura 1.4 - Métodos de imobilização de enzimas.

Fonte: Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi (2004).

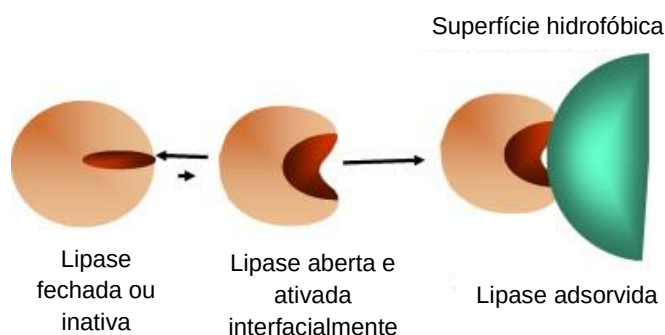
Muitas lipases imobilizadas estão comercialmente disponíveis, sendo que as mais utilizadas são a Novozym 435, enzima de *Cândida antártica* imobilizada em uma resina acrílica macroporosa, a Lipozyme IM RM, enzima de *Rhizomucor miehei*, imobilizada em uma resina de troca iônica e a Lipozyme TL IM, enzima de *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada sobre gel de sílica granulado.

A imobilização das enzimas é essencial para a aplicação industrial, uma vez que permite a sua reutilização, diminuindo os custos de produção, além de facilitar a recuperação do catalisador. O custo da lipase compreende mais de 90 % do custo total de produção de ésteres, isso se deve ao tipo de suporte utilizado para imobilização. Portanto suportes mais viáveis, como sílica gel, celite e kaolite estão sendo testados, em alternativa as resinas orgânicas. A quitosana também tem sido utilizada como matriz para imobilização de lipase devido a sua versatilidade (pó, gel, fibras, cápsula e membranas), baixo custo, alta afinidade por proteínas e ausência de toxicidade (AMORIM, et al., 2003).

Em certos casos, a imobilização pode ser usada para purificar a enzima, aumentando o interesse neste processo. Octil-agarose foi classificado como um suporte muito útil para a imobilização de lipase, utilizando o mecanismo de ação peculiar desta enzima: ativação interfacial (Figura 1.5). Como já foi exposto, a maioria das lipases tem uma conformação fechada (inativa, em muitos casos) em que o sítio ativo é isolado do meio reacional através de um polipeptídeo denominado “tampa” ou “lid”. Essa tampa possui uma face interna hidrofóbica que interage com o

ambiente hidrofóbico do sítio ativo. A conformação aberta de uma lipase é produzida quando a tampa se move, expondo um grande bolso hidrofóbico, porém esta forma aberta é instável em meio aquoso, tornando-a estabilizada por adsorção em interfaces hidrofóbicas, tais como gotas de óleos, uma proteína hidrofóbica, outra lipase na forma aberta, ou a um suporte hidrofóbico (RUEDA et al., 2015, MANOEL et al., 2015). Este tipo de imobilização ocorre por adsorção da lipase ao suporte.

Figura 1.5 - Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas.



Fonte: Mateo et al. (2007)

Contudo, no presente trabalho foi utilizada a imobilização por adsorção da lipase em suportes hidrofóbicos e hidrofílicos com baixa força iônica. Esse processo de imobilização foi escolhido devido à facilidade de manipulação e por ser possível dessorver a enzima obtendo um extrato mais “limpo”.

CAPÍTULO II
Produção e Caracterização da Lipase
Extracelular

Resumo

As lipases são produzidas por animais, plantas e microrganismos. Entretanto, para uso industrial, as lipases microbianas ganharam mais atenção. Neste trabalho foi investigada a produção de lipase pelo fungo filamentoso recém isolado, pertencente a espécie de *F. verticillioides*. A melhor produção da lipase ocorreu quando a FES do fungo *F. verticillioides* foi realizada 35°C. A enzima é produzida sob condições de indução e a melhor atividade hidrolítica foi obtida utilizando-se óleo de milho e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. O pH aparente da enzima foi em 8,0, entretanto sua maior estabilidade foi em pH 5,0. Os solventes orgânicos *n*-hexano e etanol apresentaram efeito de ativação da enzima. A lipase foi obtida tanto na forma livre extracelular, quanto na forma ligada na membrana celular, mostrando que a própria célula do fungo pode servir como um sistema de suporte de imobilização no próprio substrato de crescimento sob condições de FES. A lipase também apresentou seletividade por substratos de cadeias médias, uma característica importante a ser explorada na indústria de aromas e fragrâncias.

Abstract

Lipases are produced by animals, plants and microorganisms. However, for industrial use, microbial lipases gained more attention. In this study, we investigated the production of lipase by newly isolated filamentous fungus belonging to species of *F. verticillioides*. The lipase production was best when the FES was performed at 35 °C. The enzyme was produced under inducing conditions and better hydrolytic activity was obtained using corn oil and peptone as a source of carbon and nitrogen respectively. The optimal pH of the enzyme was 8.0, though its greater stability was best at pH 5.0. The n-hexane and ethanol presented organic solvents activation of the enzyme effect. The lipase was obtained both extracellularly in free form and in bound form on the cell membrane, showing that the cell itself fungus may server as a immobilization support system at own growth substrate under conditions FES. The lipase also shows selectivity for substrates of medium chain, an important feature to be exploited in the flavors and fragrances industry.

1 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas que catalisam as reações de hidrólise utilizando triglicerídeos como substratos naturais para a produção de ácidos graxos e glicerol (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Esta proteína é ativada por um mecanismo de interface denominado “lid”, que em superfícies hidrofóbicas interage com o meio deixando o sítio catalítico da enzima exposto (QUILLES et al., 2015).

Devido às características estruturais únicas, a lipase também consegue atuar em reações reversas, onde ocorre síntese de ésteres, como em reações de esterificação, transesterificação, aminólise e acilação regioseletiva (HUNG et al., 2003, BAYRAMOGLU et al., 2015). Entretanto esta enzima também apresenta quimiosseletividade, regiosseletividade e estereosseletividade, sendo empregada nas sínteses de produtos puros e com alto valor agregado na indústria de alimentos e fármacos (HUNG et al., 2003, PÉREZ et al., 2011, GODOY et al., 2013).

Estas enzimas são proteínas constitutivas e indutivas, ou seja, sua produção é induzida pelos componentes presentes no meio de fermentação, já sendo relatado que compostos lipídicos, como triglicerídeos e ácidos graxos podem aumentar a produção enzimática, sendo utilizados na fermentação como fonte de carbono (DOBREV et al., 2015).

A utilização de lipases na indústria não é ampla, principalmente devido ao custo de produção enzimática, sendo necessárias novas técnicas para tornar o processo mais viável. A fermentação em estado sólido é um dos processos para a produção de metabólitos microbianos mais adequado para países em desenvolvimento, utilizando resíduos da agroindústria como fonte de nutrientes, diminuindo assim o custo sobre a produção da enzima, além de proporcionar um ambiente parecido com o habitat natural de vários microrganismos (SUN; XU, 2008).

Estas enzimas são produzidas por plantas, animais e microrganismos, porém as lipases microbianas apresentam maior versatilidade, devido a grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, ao alto rendimento de obtenção das enzimas, à facilidade de manipulação genética, a não dependência da sazonalidade e ao rápido crescimento microbiano (NWUCHE; OGBONNA, 2011). As lipases microbianas são principalmente extracelulares e sua produção é muito influenciada pela composição do meio. A síntese dessas enzimas pode ser aumentada por um componente lipídico como óleo, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis e glicerol, sendo a fonte de carbono

o principal fator para a expressão da atividade enzimática. O tipo e a concentração de nitrogênio também podem influenciar a produção de lipase por fungos e a relação C/N tem grande efeito sobre a biossíntese da enzima (DOBREV et al., 2015).

Muitos microrganismos são conhecidos como potenciais produtores de lipases extracelulares, incluindo bactérias, leveduras e fungos. Deste modo, este Trabalho visou primeiramente produzir lipases extracelulares utilizando-se o fungo *F. verticillioides*, por fermentação em estado sólido e estudar a influência de nutrientes presentes na fermentação sobre a produção enzimática, além de caracterizar esta enzima para posterior aplicação em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a produção de lipase extracelular utilizando a cepa fúngica *Fusarium verticillioides*. Foram utilizados vários óleos vegetais como fonte de carbono, suplementados com diferentes soluções nutrientes para analisar o efeito sobre a produção da enzima por fermentação em estado sólido. Também foi realizada a caracterização físico-química da enzima para controle dos processos de hidrólise.

2.1 Objetivos Específicos

- Estudar a produção enzimática de lipases extracelular da cepa fúngica *F. verticillioides* através de modificações de substratos e parâmetros na fermentação em estado sólido;
- Caracterizar físico-quimicamente a lipase produzida pela cepa fúngica *F. verticillioides*;
- Comparar a produção da enzima extracelular, a enzima ligada à membrana e enzima citoplasmática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e a metodologias analíticas utilizados para o desenvolvimento do estudo relacionado à produção e caracterização de lipase extracelular do fungo *F. verticillioides* obtida por fermentação em estado sólido (FES) em farelo de trigo.

3.1 Microrganismo

Neste projeto foi utilizada a linhagem fúngica P24, previamente isolada de áreas de plantação de cana de açúcar, pertencente à coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UNESP (Campus de São José do Rio Preto-SP). Esta linhagem foi identificada por estudos de biologia molecular e morfologia, sendo pertencente à espécie *F. verticillioides*. A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning da Universidade Federal de Lavras - UFLA, especialista no gênero *Fusarium*.

3.2 Meios de cultura

Para a fermentação em estado sólido foram utilizados dois meios de cultura. O primeiro meio foi utilizado para o pré-inóculo em ágar e o segundo para a fermentação em resíduos agrícolas.

3.2.1 Pré-inóculo (meio semi-sólido)

Para o crescimento da cepa fúngica foi utilizado o meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) (%): 0,1 peptona; 1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 KH_2PO_4 ; 0,05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 CaCl_2 ; 2,5 fonte de carbono; 0,4 de emulsificante (goma arábica, Triton X-100 ou Tween 80); 0,5 de solução de elementos traços (2,2 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,1 de H_3BO_3 ; 0,5 de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16 de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,16 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,11 de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5 de EDTA); 3 de agar e pH 6,0. As fontes de carbono utilizadas foram: óleo de soja, óleo de girassol, óleo de canola, azeite de dendê, óleo de gergelim, óleo de linhaça, óleo de coco, óleo de milho, azeite de oliva, óleo de algodão e ácido oleico.

3.2.2 Solução nutriente (meio líquido)

Para o estudo da produção enzimática, várias soluções nutrientes usadas para a fermentação de fungos produtores de lipases foram testadas (Tabela 2.1). O azeite de oliva (azeite) foi escolhido para os primeiros experimentos porque possui entre 55 e 84 % de ácido oleico (KNOTHE et al, 2006), considerado indutor para a produção de lipase (LI; WANG; TAN, 2006, WANG; XU; SHAN, 2008). Em seguida foi avaliada a influencia das fontes de nitrogênio e de carbono sobre a produção enzimática. As fontes de nitrogênio utilizadas foram as seguintes: peptona (11,5 % de nitrogênio), ureia, extrato de levedura (11,5 % nitrogênio), fertilizante agrícola NPK (20% de nitrogênio), NH_4NO_3 (nitrato de amônio), $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amônio) e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (fosfato de amônio monobásico). As fontes de carbono utilizadas foram as mesmas citadas no item 3.2.1.

Tabela 2.1 - Soluções nutrientes que foram testados na FES.

Solução 1	Solução 2	Solução 3	Solução 4	Solução 5
1% azeite de oliva 3,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,0% KH_2PO_4 0,4% CaCl_2 0,1% Elem. traço	2% azeite de oliva 2% peptona 0,05% MgSO_4 0,2% K_2HPO_4	2% azeite de oliva 2% peptona 0,05% MgSO_4 0,2% K_2HPO_4 1% lactose pH 6	2% azeite de oliva 0,5% NH_4NO_3 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5% KH_2PO_4 0,1% NaCl 0,1% Elem. Traço pH 6	4% azeite de oliva 0,4% ureia 0,1% MgSO_4 0,5% K_2HPO_4 0,5% lactose pH 6

Fonte: todas as Tabelas foram elaboradas pelo autor.

3.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada em embalagens de polipropileno (26,5 cm x 15 cm) contendo 10 g de farelo de trigo lavado. O pré-inóculo foi realizado a partir do cultivo dos

fungos em erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL do meio citado no item 3.2.1 e mantido durante 5 dias a 28°C. Para obtenção dos inóculos, 50 mL de água foram adicionados aos frascos de cultivo dos fungos suspendendo os esporos e micélios pela raspagem suave da superfície dos meios de cultivos. Os esporos suspensos foram quantificados ($4,5 \times 10^7$ esporos/g de substrato) e transferidos juntamente com 20 mL da solução nutriente (item 3.2.2) para as embalagens de polipropileno na quantidade necessária para a obtenção de uma umidade de 70 %. A umidade foi obtida a partir da análise de peso seco do substrato. A fermentação foi realizada durante 72 horas a 28°C sem agitação.

A enzima foi extraída com 60 mL água destilada e o extrato bruto foi filtrado e centrifugado a $19785 \times g$ durante 15 minutos a 5°C.

3.4 Efeito da temperatura sobre o crescimento da cepa e sobre a produção enzimática

A cepa fúngica foi repicada com auxílio de uma agulha em placas de Petri, contendo o meio descrito em 3.2.1 e azeite de oliva como fonte de carbono, fazendo-se um único ponto no centro das placas. Em seguida as placas foram mantidas a temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C durante 72 horas e o halo de crescimento da cepa foi medido a cada 24 horas para verificar o efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo *F. verticillioides* P24.

Também foi realizada a fermentação nas mesmas temperaturas nas quais a cepa foi submetida a crescimento em placa de Petri, para verificar o efeito da temperatura de fermentação sobre a produção enzimática da lipase. Para tanto o pré-inóculo foi mantido a 28°C para a indução do crescimento da cepa fúngica e a fermentação em embalagens de polipropileno foi realizada nas temperaturas desejadas.

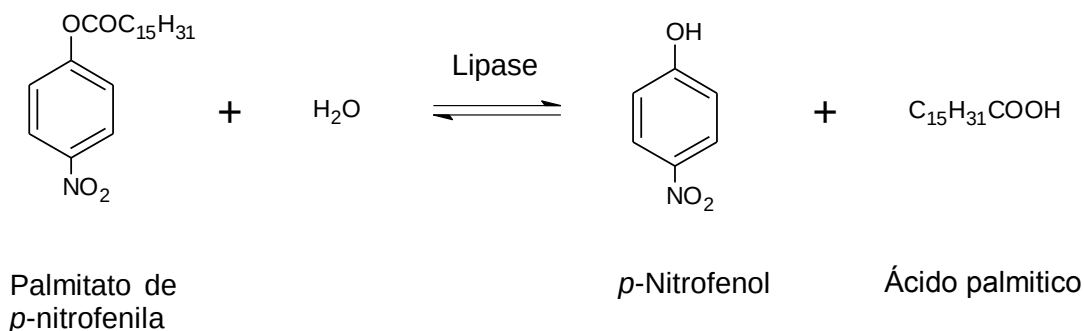
3.5 Concentração do extrato enzimático bruto

A concentração do extrato bruto foi realizada por ultrafiltração usando-se sistema QuixStand™ Benchtop da Amersham Bioscience com uma membrana de corte limite de 10 kDa em massa molar.

3.6 Determinação da atividade *hidrolítica em substrato cromogênico*

A atividade hidrolítica padrão foi determinada conforme proposto por Fernandes et al. (2007), utilizando-se o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) como substrato (Esquema 2.1). Foram utilizadas duas soluções. Solução A: *p*-NPP em isopropanol na concentração de $8 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$; solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma Arábica, em 450 mL de tampão fosfato $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com pH 7,0. Em seguida, 1 mL da solução A foi adicionada a 9 mL da solução B lentamente sob agitação contínua a 50°C . Para a reação de hidrólise 0,45 mL desta mistura foi mantida a 37°C durante 1 minuto, para equilibrar a temperatura, em seguida 0,05 mL do extrato enzimático bruto foi adicionado e iniciada a cronometragem do tempo de reação (1 minuto). Para parar a reação 0,5 mL de solução de tetraborato de sódio saturada foi adicionado ao tubo de ensaio. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro UV-VIS Lambda 25 Perkin-Elmer em comprimento de onda de 410 nm. Como referência utilizou-se o controle com 0,45 mL da água destilada, 0,05 mL de extrato bruto e 0,5 mL de solução saturada de tetraborato de sódio e o branco com 0,45 mL da mistura de *p*-NPP, 0,05 mL de água destilada e 0,5 mL de tetraborato de sódio.

Esquema 2.1: Representação da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato.



Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a produção de 1 μmol de *p*-NP (*p*-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de absorvidade molar do *p*-NP utilizado foi $7.876 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Para o cálculo da atividade de hidrólise lipolítica seguiu-se a seguinte equação:

$$\text{Atividade Hidrolítica (U/g de farelo de trigo)}: \frac{(\text{Abs}_a - \text{Abs}_e) \cdot V_a \cdot F}{7,87 \cdot 10^3 \cdot V_e \cdot t}$$

Onde:

Abs_a: absorvância da solução; Abs_e: absorvância do extrato enzimático; V_a: volume da solução (1 mL); F: fator de correção para fermentação sólida (quantidade de solução de extração em mL/quantidade de substrato em g); V_e: volume de extrato enzimático (0,05 mL); t: tempo de reação (1 min).

Esta metodologia também foi utilizada para analisar a seletividade da lipase em relação a quantidade de carbonos presente na cadeia do substrato. Foram utilizados os seguintes substratos na mesma concentração molar: butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB), decanoato de *p*-nitrofenila (*p*-NPD), dodecanoato de *p*-nitrofenila (*p*-NPDD) e palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP).

3.7 Caracterização bioquímica da lipase extracelular do fungo *Fusarium verticillioides*

Neste item será apresentada a metodologia utilizada na caracterização bioquímica da lipase extracelular produzida pelo fungo *F. verticillioides*.

3.7.1 Efeito da temperatura e pH aparente

Os ensaios enzimáticos foram realizados de acordo com o item 3.6, variando-se a temperatura em 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 60°C, em tampão com pH 7 para se verificar a temperatura aparente de atuação da enzima bruta. Também foi variado o pH em 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, incubados à temperatura aparente, para a obtenção do pH aparente da atividade da lipase bruta. Os tampões utilizados à 0,05 mol·L⁻¹ foram: acetato para os pH 3 e 4, citrato para pH 5 e 6, fosfato pH 7 e 8 e glicina-NaOH para pH 9.

3.7.2 Efeito da estabilidade em pH e temperatura

A enzima foi incubada à temperatura ambiente (25°C) por 5 h variando-se o pH em 5, 6, 7 e 8, para a estabilidade em pH. Os tampões utilizados foram: citrato para pH 5 e 6 e fosfato pH 7 e 8. A atividade enzimática foi analisada conforme item 3.6. A lipase foi incubada de 1 a 5 h variando-se a temperatura em 30, 35, 40 e 45, em

tampão com pH de melhor estabilidade, para se verificar a estabilidade térmica da enzima bruta.

3.7.3 Estabilidade em solventes orgânicos e detergentes

Os extratos enzimáticos foram diluídos em álcool (etanol 99% e isopropanol), *n*-hexano e tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7, nas proporções de 1:3, 1:4 e 1:5 extrato/solvente incubados a temperatura ambiente 25°C por até 24 horas. O extrato enzimático também foi diluído em CTAB 5 % (brometo hexadeciltrimetilamônio), Triton x 100 5 %, Tween 80 5 % e SDS 1% (Dodecil sulfato de sódio) durante 24 horas para a verificação da estabilidade da lipase em detergentes. A atividade hidrolítica foi medida conforme descrito no item 3.6.

3.8 Proteína total

A determinação dos teores de proteínas totais da solução enzimática bruta foi realizada através do método de Bradford (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

3.9 Quantificação das lipases extracelular, ligada a membrana e do citoplasma

Para quantificar as lipases produzidas pela cepa fúngica *F. verticillioides*, foi utilizada a metodologia proposta por Hama et al. (2006) com modificações. Após a FES a enzima extracelular foi extraída com 60 mL de água destilada e o extrato bruto foi centrifugado a $19785 \times g$ durante 15 minutos a 5°C. Em seguida o substrato fermentado (células fúngicas ligadas ao farelo de trigo) foi liofilizado durante 48 horas para total remoção de água remanescente e 50 mg foram congeladas a -80°C overnight. As células imobilizadas foram maceradas, suspendidas em 3 mL de tampão tris $20 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,5 e centrifugadas a $23743 \times g$ durante 5 minutos a 5°C. O sobrenadante foi coletado com a fração de lipase presente no citoplasma. O precipitado foi ressuspenso em 4 mL de solução 1 % de triton – X 100 e colocado sob agitação de 150 rpm a 30°C durante 20 horas para a liberação das proteínas ligadas a membrana. As amostras foram submetidas aos métodos descritos nos

itens 3.6 para a determinação da atividade enzimática e 3.8 para a determinação de proteínas totais.

As amostras também foram submetidas à eletroforese de acordo com o item 3.10, para verificar a presença de mais de uma lipase presente nas frações coletadas.

3.10 Eletroforese

A eletroforese foi realizada utilizando-se um gel de poliacrilamida a 13 % com 0,1 % de SDS (dodecil sulfato de sódio). A detecção de lipases foi realizada através de zimograma com uma solução corante contendo α - e β -naftil acetato na presença de fast blue (FUCIÑOS et al., 2005). Um kit (SIGMA) padrão de baixa massa molar de proteínas foi utilizado: Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Glutâmico Desidrogenase (55 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (36 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), Inibidor de Tripsina (20 kDa), α -lactoalbumina (14.2 kDa). Para detecção das proteínas presentes no kit foi utilizada solução corante de prata (MERRIL; SWITZER; Van KEUREN, 1979).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

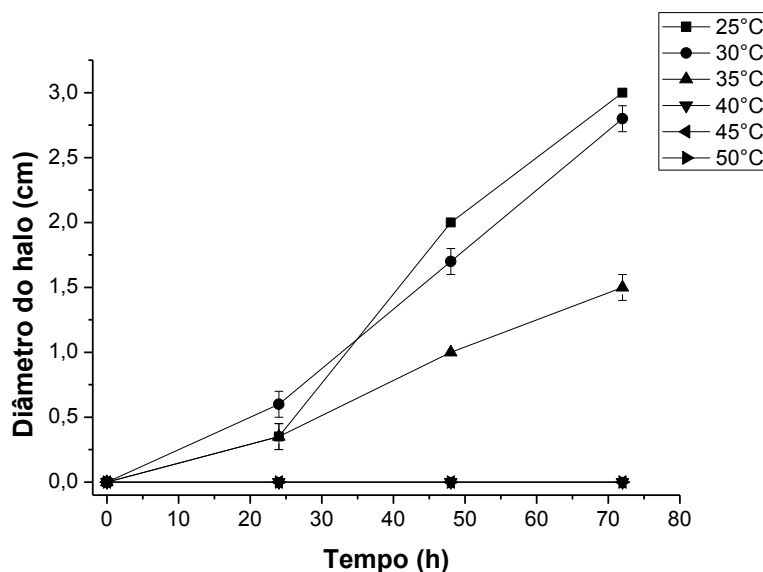
Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados da produção da lipase extracelular por meio de fermentação em estado sólido do fungo *F. verticillioides* empregando diferentes fontes de carbono, nitrogênio e outros nutrientes. Divididos em itens específicos são apresentados os dados do crescimento da cepa, da caracterização da enzima em diferentes meios, temperaturas, pH, na presença de solvente e detergentes, além da verificação da presença de lipases intracelulares.

4.1 Estudo de parâmetros para produção enzimática

4.1.1 Efeito da temperatura sobre o crescimento da cepa e sobre a produção enzimática

O fungo *F. verticillioides* P24 foi submetido a crescimento em placas de Petri utilizando o meio descrito em 3.2.1 utilizando-se azeite de oliva como fonte de carbono, nas temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C e o diâmetro do halo de crescimento foi medido a cada 24 horas durante 3 dias, o experimento foi realizado em triplicata (Figura 2.1). A cepa submetida à temperatura de 25°C apresentou maior crescimento, com diâmetro de 3,0 cm em 3 dias, porém seu crescimento foi mais rápido entre 24 e 48 horas. Já a cepa mantida em 30°C cresceu 0,75 cm durante as primeiras 24 horas de experimento (maior crescimento em comparação as outras cepas durante o mesmo período), porém apresentou um diâmetro de 2,7 cm com 72 horas, apresentando um crescimento muito próximo à cepa mantida em 25°C. A cepa mantida a 35°C obteve um halo com diâmetro de 1,5 cm ao final do experimento e as cepas mantidas acima de 35°C não cresceram.

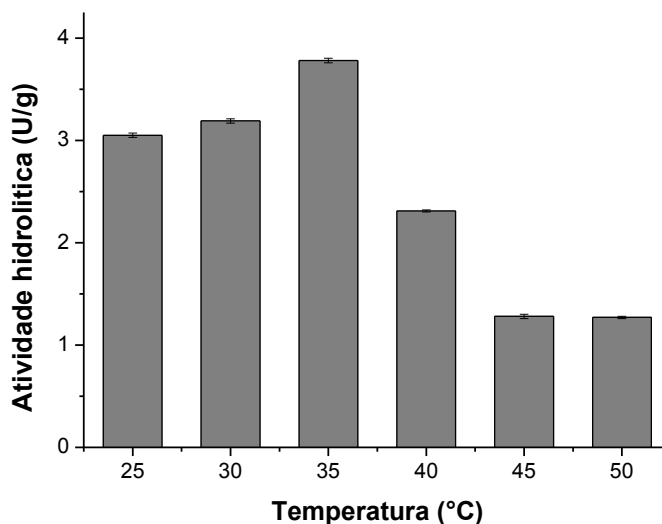
Figura 2.1 - Diâmetro de crescimento do fungo *F. verticillioides* P24 em placa de Petri em relação à temperatura utilizando-se azeite de oliva como fonte de carbono e o meio descrito no item 3.2.1.



Fonte: elaborada pelo autor

Em seguida o fungo foi cultivado nas mesmas temperaturas para extração da enzima e posterior avaliação de sua atividade hidrolítica (Figura 2.2). Como a cepa não cresceu acima de 35°C em placas, todos os pré-inóculo foram realizados a 30°C, e após a passagem de esporos para embalagens de polipropileno, as fermentações foram realizadas nas temperaturas estabelecidas. Diferente dos experimentos realizados em placas, o fungo cresceu nas temperaturas de 40, 45 e 50°C. Após a obtenção do extrato bruto foram analisadas as atividades hidrolíticas e apesar de a 35°C o halo de crescimento da cepa ser menor que a 25°C, a atividade hidrolítica foi maior ($3,8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$), sendo 26 % maior que a atividade obtida para o fungo cultivado a 25°C. Nas temperaturas de 45 e 50°C o fungo ainda apresentou uma pequena atividade hidrolítica de $1,3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$.

Figura 2.2 - Relação entre a temperatura de fermentação e a atividade hidrolítica. O fungo *F. verticillioides* P24 foi cultivado em farelo de trigo utilizando-se azeite de oliva como fonte de carbono.



Fonte: elaborada pelo autor

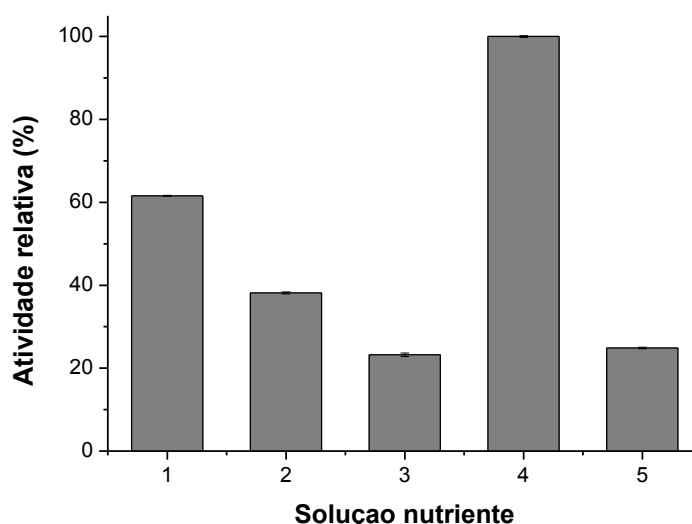
Apesar do crescimento da cepa P24 ter sido maior nas temperaturas de 25 e 30°C, a atividade enzimática foi maior quando a fermentação ocorreu a 35°C, sendo a escolhida para dar continuidade ao Trabalho, mantendo o pré-inóculo a 30°C para induzir o crescimento fúngico.

4.1.2 Influência de soluções nutrientes utilizadas na FES sobre a produção enzimática

Para verificar a influência de nutrientes utilizados na FES sobre a produção de lipases, foram avaliadas 5 soluções compostas de nutrientes que já foram utilizadas para produção de lipases (Tabela 2.1). De acordo com a Figura 2.3, a atividade hidrolítica frente ao substrato *p*-NPP, é muito influenciada pelos nutrientes utilizados na FES, apresentando uma atividade de $13 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ quando utilizado a solução 4 na fermentação (a atividade hidrolítica da enzima produzida com a solução 4 foi considerada 100 % para calcular as atividades relativas). As enzimas produzidas com as soluções 3 e 5 apresentaram somente 20 % de atividade hidrolítica em relação a solução 4, sendo que essas soluções possuíam lactose em suas formulações, mostrando que a utilização desse açúcar pode ter influenciado negativamente a produção de lipase. Este fato pode ter ocorrido porque o fungo

utiliza açúcares como fonte primária de carbono, não sendo induzida a produção de lipases pelas fontes lipídicas. Já em relação à enzima produzida com a solução 2, a falta de elementos traços pode ter feito com que a atividade da lipase fosse menor, uma vez que cátions podem influenciar a atividade dessas enzimas. A atividade hidrolítica da enzima obtida da fermentação com a solução 1 ($7,9 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi próxima a atividade da enzima produzida com a solução 4 ($12,8 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$), porém esta solução tem uma quantidade menor de fonte de carbono, e isso pode ter diminuído a produção de lipase com atividade hidrolítica, outro fator que também pode ter influenciado é o excesso de sais presente nessa solução 1.

Figura 2.3 - Atividade hidrolítica de lipases produzidas em fontes de nutrientes distintas frente ao substrato *p*-NPP.



Fonte: elaborada pelo autor

A solução 4, composta de 2 % de azeite de oliva, 0,5 % de NH_4NO_3 , 0,1 % de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 % de KH_2PO_4 , 0,1 % de NaCl e 0,1 % de solução de elementos traços a pH6, foi a solução escolhida para produzir lipases extracelulares.

4.1.3 Influência de fontes de carbono sobre a produção enzimática

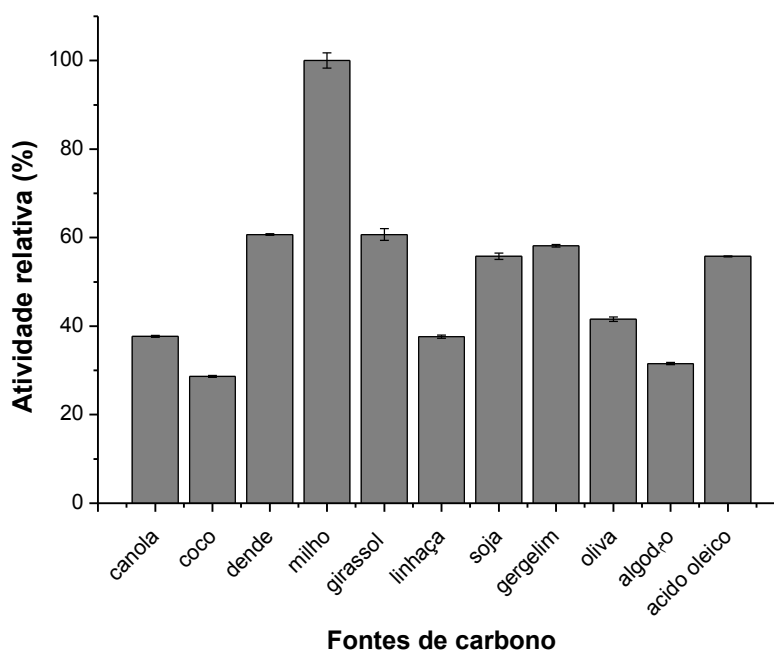
O próximo passo para estudar a produção enzimática do fungo *F. verticillioides* foi utilizar várias fontes de carbono na FES. As fontes de carbono utilizadas foram: óleo de canola, óleo de coco, azeite de dendê, óleo de milho, óleo de girassol, óleo

de linhaça, óleo de soja, óleo de gergelim, azeite de oliva, óleo de algodão e ácido oleico. Os óleos utilizados foram caracterizados quanto à porcentagem dos principais ácidos graxos presentes em suas composições (Apêndice A - Tabela A.1).

A Figura 2.4 apresenta a atividade hidrolítica das enzimas produzidas com diferentes fontes de carbono, por meio da produção de *p*-nitrofenol pela reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila. É possível observar que a maior atividade foi obtida pela lipase da cepa cultivada em óleo de milho, apresentando atividade hidrolítica de $8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato utilizado na fermentação (farelo de trigo). O ácido oleico é conhecido com indutor na produção de lipase, e está presente na composição do óleo de milho em maior quantidade em relação aos outros óleos utilizados (exceção óleo de canola), podendo ser o responsável pela maior atividade da enzimática, além de já ter sido citado na literatura como ótimo indutor de produção de lipases (LI; WANG; TAN, 2006). Apesar do óleo de canola apresentar uma grande quantidade de ácido oleico, a produção enzimática de lipase não foi alta, mostrando que em quantidades altas, as concentrações de ácido oleico também podem inibir a produção de lipase (WANG; XU; SHAN, 2008). Essa afirmação pode ser confirmada pela atividade hidrolítica da enzima produzida com ácido oleico como fonte de carbono, que apresentou somente 55 % da atividade apresentada pela enzima produzida com óleo de milho. Para o azeite também era esperado uma maior produção de lipase, devido a grande quantidade de ácido oleico em sua composição relatada pela literatura, porém como observado na Tabela A.1, o azeite utilizado neste Trabalho não possui uma quantidade elevada de ácido oleico.

As enzimas produzidas nas fermentações com azeite de dendê, girassol, soja e gergelim obtiveram atividades em torno de 60 % em relação a melhor enzima (lipase produzida com óleo de milho), e todas tem em comum uma grande quantidade de ácido linoleico na composição da fonte de carbono, este ácido possui duas insaturações em sua cadeia carbônica, que o diferencia do ácido oleico, além de já ter sido relatado como não sendo um bom indutor de produção de lipases (WANG; XU; SHAN, 2008). A lipase produzida com óleo de coco apresentou a menor atividade hidrolítica, menos de 30 % da atividade observada pela enzima produzida com óleo de milho. O óleo de coco apresenta muitos ácidos graxos de cadeias curtas saturadas, esta composição na fonte de carbono pode inibir a produção de lipases (LI; WANG; TAN, 2006).

Figura 2.4 - Atividade hidrolítica relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de carbono utilizando-se palmitato de *p*-nitrofenila como substrato.



Fonte: elaborada pelo autor

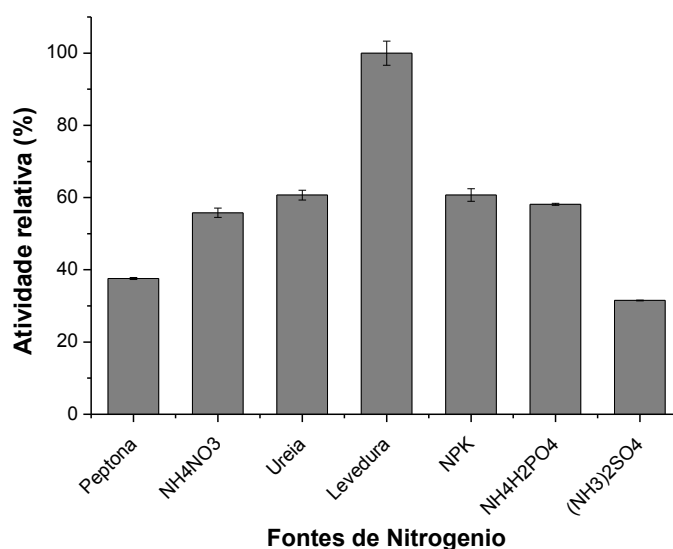
Contudo o óleo de milho foi selecionado para produzir enzimas extracelulares neste Trabalho.

4.1.4 Influência das fontes de nitrogênio sobre a produção enzimática

Após a análise do efeito que diferentes fontes de carbono podem causar à produção enzimática na FES, foram realizados experimentos para verificar o efeito da fonte de nitrogênio. As fontes de nitrogênios avaliadas foram: peptona, NH_4NO_3 , ureia, extrato de levedura, NPK, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As fontes de nitrogênio foram adicionadas ao experimento mantendo-se a proporção de nitrogênio no meio fermentativo (0,23 %). A Figura 2.5 mostra a hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila realizada com as enzimas produzidas em diferentes fontes de nitrogênio. É possível observar que a enzima da cepa cultivada com extrato de levedura apresentou maior atividade hidrolítica, obtendo $7 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato utilizado na fermentação. Sharma et al. (2014) estudaram os parâmetros de crescimento críticos para a produção de lipase extracelular da bactéria *Alkalophilic bacillus* sp e também obtiveram o extrato de levedura como melhor fonte de nitrogênio. As enzimas das cepas fermentadas

em NH_4NO_3 , ureia, NPK e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ apresentaram atividade semelhante, cerca de 60 % da atividade hidrolítica obtida pela enzima produzida a partir da fermentação em extrato de levedura (considerada atividade relativa de 100 %). As enzimas obtidas a partir das fermentações em peptona e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentam menos de 40 % de atividade hidrolítica em relação a enzima produzida em extrato de levedura.

Figura 2.5 - Atividade hidrolítica relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de nitrogênio utilizando-se palmitato de *p*-nitrofenila como substrato.



Fonte: elaborada pelo autor

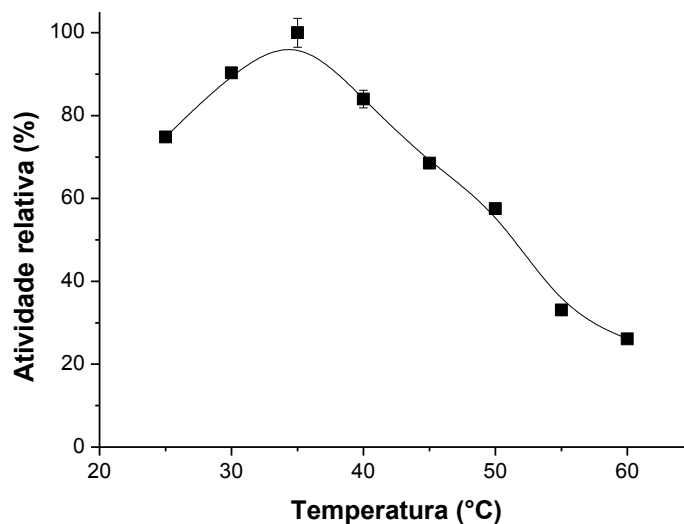
Para a produção de enzima extracelular foi selecionado extrato de levedura como fonte de nitrogênio para a continuidade do Trabalho.

4.2 Caracterização enzimática

4.2.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade hidrolítica

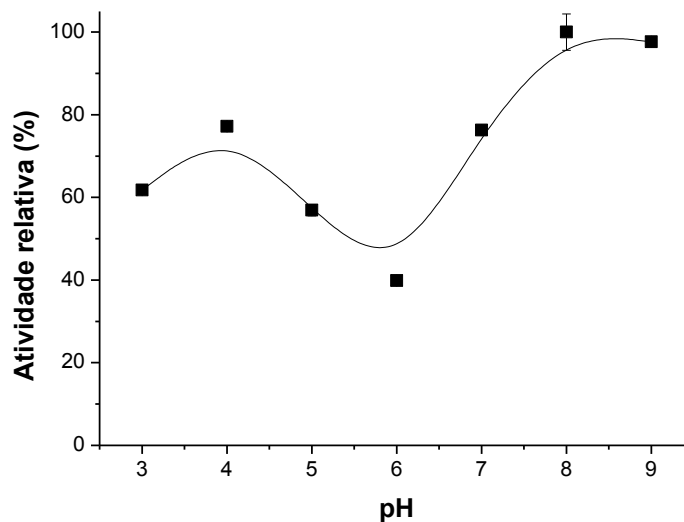
A atividade enzimática hidrolítica da lipase foi avaliada na faixa de 20 a 60°C e faixa de pH de 3 a 9 (Figuras 2.6 e 2.7, respectivamente), por meio do método em substrato cromogênico para a verificação da temperatura e do pH aparente de atuação da enzima produzida pela cepa fúngica *F. verticillioides*. Para esse experimento a enzima foi concentrada 10 vezes.

Figura 2.6 - Efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da lipase frente ao substrato palmitato de *p*-nitrofenila, realizada em pH 7.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 2.7 - Efeito do pH sobre a atividade hidrolítica da lipase frente ao palmitato de *p*-nitrofenila, realizada a 35°C.



Fonte: elaborada pelo autor

Os ensaios de atividade aparente da lipase em relação à temperatura foram realizados em pH 7, sendo a maior atividade observada em 35°C (51,5 U•g⁻¹). Porém a enzima manteve cerca de 50 % de sua atividade em 50°C, caracterizando

ação em ampla faixa de temperatura, tornado possível seu uso em temperaturas moderadas. Após 50°C a atividade hidrolítica apresentou valores menores que 30 %, ou seja, a enzima perdeu aproximadamente 70 % de sua atividade hidrolítica, mostrando que estas enzimas são sensíveis a temperaturas mais altas. Nguyen et al. (2010) estudaram as propriedades enzimáticas de cinco lipases extracelulares produzidas pelo fungo *Fusarium graminearum*, e mostraram que todas as enzimas apresentaram atividade ótima em 35°C, porém esta atividade não foi mantida, caindo cerca de 90 % à 40°C. A lipase produzida por *Fusarium solani* FS1 apresentou dois picos de temperatura ótima, em 25 e 45°C, o que pode ter ocorrido devido à presença de isoenzimas (MAIA et al., 1999). Já a lipase produzida pelo fungo *Fusarium oxysporum* AM3, também apresentou atividade ótima em 35°C, mantendo sua atividade alta até 40°C (MORAIS et al., 2003). Estes dados mostraram uma maior faixa de atividade pela lipase produzida pelo *F. verticillioides* P24 estudado nesse trabalho.

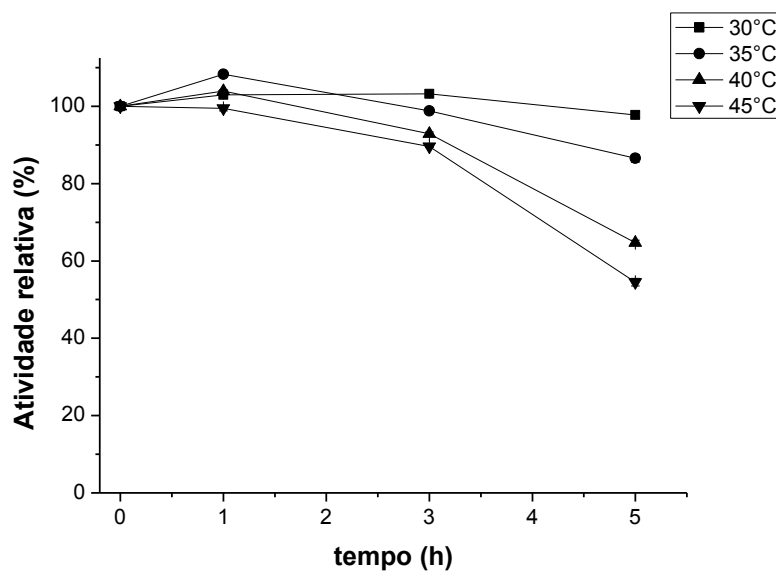
Já a avaliação do efeito do pH na atividade de hidrólise da lipase mostrou que esta enzima tem melhor atuação em pH alcalino, apresentando a melhor atividade em pH 8, entretanto há uma pequena queda, de somente 3 % da atividade em pH 9. Não foi possível verificar a atividade enzimática em pH 10 devido a hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila antes de se adicionar a enzima. A lipase também manteve cerca de 80 % da atividade em pH 4, apresentando uma alta atividade em pH ácido também. A lipase produzida pelo fungo *F. oxysporum* AM3 apresentou melhor atividade em pH 9, tendo um melhor desempenho também em pHs alcalinos, característica observada em diferentes cepas do gênero *Fusarium* (MORAIS et al., 2003). Já as cinco lipases produzidas pela cepa *F. graminearum* apresentaram melhor atividade em pH 7, mantendo uma boa atividade em pHs 8 e 9 (NGUYEN et al., 2010). A lipase extracelular produzida pelo fungo *F. solani* FS1 apresentou pH ótimo em 8,6 (MAIA et al., 1999), mais uma vez mostrando que as lipases deste gênero tem melhor atuação em pH alcalino.

4.2.2 Efeito da temperatura e do pH na estabilidade enzimática

O efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade enzimática também foram avaliados (Figura 2.8 e 2.9, respectivamente) por meio do método de substrato cromogênico. A atividade relativa de 100 % foi considerada a atividade enzimática

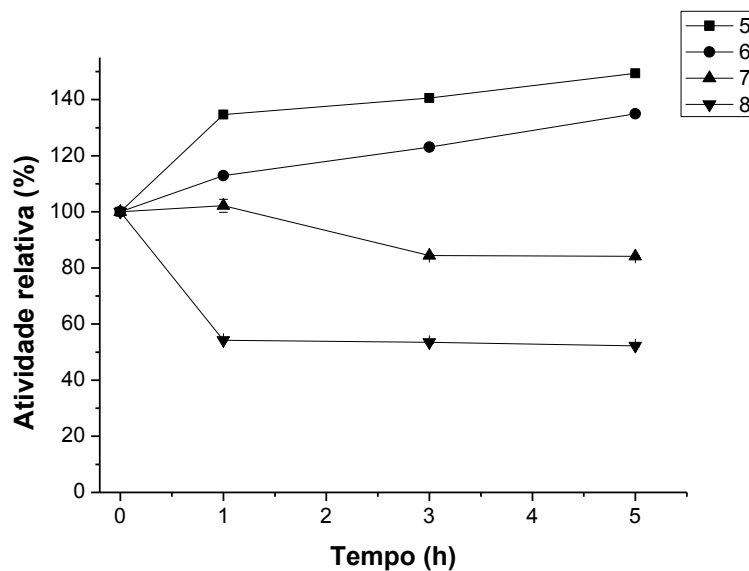
da lipase no momento em que se começou o experimento e a enzima foi incubada nas temperaturas e nos tampões adequados.

Figura 2.8 - Efeito da temperatura sobre estabilidade da lipase em pH 8.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 2.9 - Efeito do pH sobre estabilidade da lipase a temperatura ambiente.



Fonte: elaborada pelo autor

A enzima foi incubada durante 5 horas nas temperaturas de 30 a 45°C, sendo realizadas as análises após 1, 3 e 5 horas. Durante as 3 primeiras horas a atividade enzimática se mostrou estável na temperatura de 45°C, tendo uma queda menor

que 90 %, entretanto, após essas primeiras horas houve uma queda drástica da atividade chegando a cerca de 60 % após 5 horas de incubação. Já as enzimas incubadas em 30, 35 e 40°C, sofreram uma pequena ativação durante a primeira hora, porém a atividade da enzima incubada à 40°C caiu logo em seguida, também chegando perto dos 60 % após 5 horas de experimento. As enzimas incubadas a 30 e a 35°C mantiveram suas atividades mais estáveis, com cerca de 90 % da atividade hidrolítica ao final do experimento. A lipase extracelular produzida pela cepa de *F. solani* FS1 estudada por Maia et al. (1999), apresentou maior estabilidade em temperaturas de 25 e 30°C durante uma hora de incubação, perdendo menos de 90 % da atividade quando exposta a 25°C.

O efeito do pH na estabilidade enzimática foi avaliado mantendo-se a enzima incubada em tampões durante 5 horas. Os tampões utilizados foram: citrato para pH 5 e 6 e fosfato pH 7 e 8. Em pH 8 a enzima se mostrou pouco estável tendo sua atividade reduzida para cerca de 50 % logo na primeira hora de experimento. Já em pHs 5 e 6 a enzima foi ativada durante todo o experimento, tendo um aumento de quase 40 % da atividade enzimática em pH 5, após 5 horas de incubação. A lipase produzida por *F. solani* FS1 perdeu 20 % da atividade logo na primeira hora de incubação em pHs de 7,2 e 8,6, sendo mais estável em pH de 7,2, porém após duas horas de incubação a enzima perdeu mais da metade de sua atividade hidrolítica (MAIA et al, 1999).

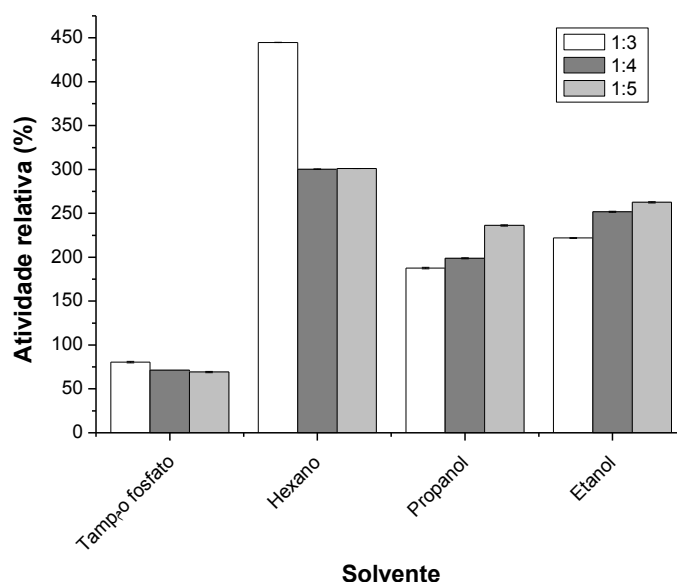
4.2.3 Efeito de solventes sobre a estabilidade enzimática

Para verificar o efeito do solvente sobre a estabilidade da enzima, primeiro mediu-se a atividade hidrolítica do extrato bruto ($4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, sendo considerado 100 % de atividade hidrolítica) e depois a enzima foi mantida durante 24 horas a temperatura ambiente em tampão fosfato pH 7, *n*-hexano, isopropanol e etanol, utilizando a proporção 1:3, 1:4 e 1:5 extrato enzimático/solvente v/v.

Observando a Figura 2.10, é possível verificar que a atividade enzimática cai cerca de 30 % após 24 horas em tampão fosfato, se mostrando razoavelmente estável. Entretanto na presença de solventes orgânicos a enzima sofreu uma ativação, que pode ter ocorrido devido a interação da lipase com meios orgânicos, expondo o centro ativo da enzima pela abertura da “tampa”, característica necessária para atividade lipolítica (PATEL; NAMBIAR; MADAMWAR, 2014). O uso

de álcoois teve efeito parecido sobre a enzima, apresentando atividades entre 10 e 12 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ de substrato, essa ativação representou entre 136 a 162 % de aumento na atividade enzimática após 24 horas. A ativação foi maior com o aumento da quantidade de álcool. Já com a adição de *n*-hexano a ativação foi ainda maior, obtendo uma atividade de 18 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ de substrato quando utilizada a proporção de 1:3 enzima/solvente (v/v), ou seja, 340 % maior que a atividade da enzima no início do experimento. Porém com quantidades maiores de *n*-hexano, a ativação foi menor. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 2.10 - Efeito de solventes sobre a estabilidade da lipase a temperatura ambiente.



Fonte: elaborada pelo autor

Após esse ensaio foi possível verificar que os solventes empregados em reações utilizando-se esta lipase podem ativar a enzima, não promovendo a desnaturação, como ocorre no caso de muitas enzimas.

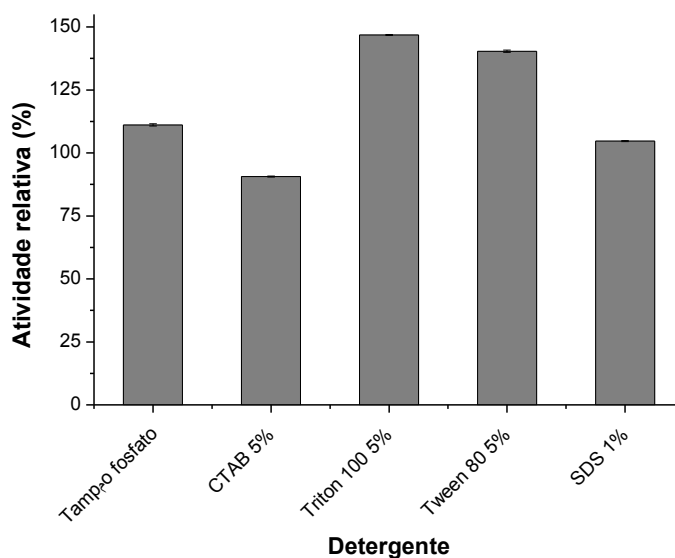
4.2.4 Efeito de detergentes sobre a estabilidade enzimática

O efeito de detergentes sobre a atividade hidrolítica da enzima foi analisado devido à propriedade que lipases possuem de se agregarem por suas cadeias hidrofóbicas formando dímeros moleculares (PALOMO et al., 2004). O detergente

impede que esse efeito ocorra, aumentando a atividade enzimática por estarem com seus sítios ativos livres.

Novamente o extrato bruto foi analisado antes do experimento (considerado 100 % de atividade hidrolítica) e após 24 horas foi medida a atividade hidrolítica dos extratos contendo tampão fosfato pH 7, CTAB 5 %, Triton x 100 5 %, Tween 80 5%, e SDS 1 %. Mas uma vez após 24 horas a enzima não sofreu muita influência do tampão fosfato, e sua atividade aumentou de 2,6 para 2,9 U·g⁻¹ de substrato. Porém os detergentes CTAB e SDS tiveram efeito negativo sobre a atividade enzimática, mostrando-se inadequados para este fim. Estes detergentes são iônicos, o que pode ter influenciado na estrutura da enzima. Já os detergentes triton x 100 e tween 80 ativaram a enzima provocando um aumento de cerca de 40 % na atividade, provavelmente porque as lipases se desagregaram, sendo possível medir a verdadeira atividade lipolítica (Figura 2.11).

Figura 2.11 - Efeito de detergentes sobre a estabilidade da lipase a temperatura ambiente.



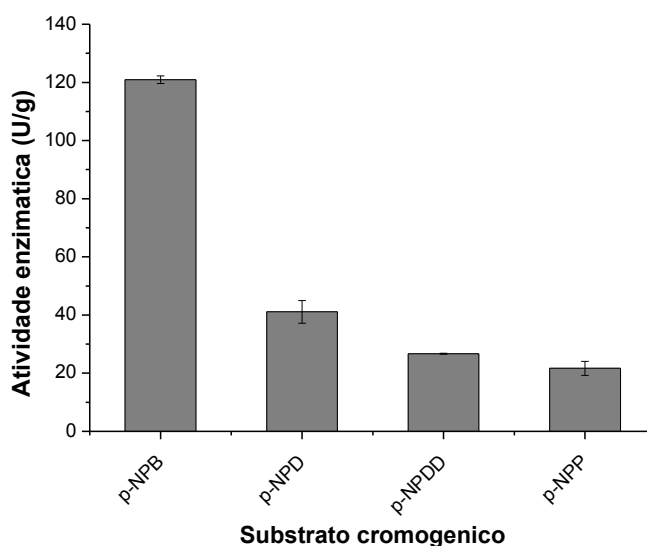
Fonte: elaborada pelo autor

4.2.5 Seletividade da enzima pelo substrato cromogênico

A enzima também foi caracterizada quanto a sua seletividade pelo substrato cromogênico, utilizando-se os substratos *p*-NPB (4 carbonos presentes na cadeia saturada), *p*-NPD (10 carbonos presentes na cadeia saturada), *p*-NPDD (12

carbonos presentes na cadeia saturada) e *p*-NPP (16 carbonos presentes na cadeia saturada). Por meio da Figura 1.12 é possível observar que a maior liberação de *p*-NP foi utilizando-se o *p*-NPB como substrato, porém este substrato também é utilizado para quantificar a atividade enzimática da esterase que possivelmente está presente no meio. Entre os substratos de cadeias carbônicas maiores o *p*-NPD sofreu maior conversão em *p*-NP, a atividade enzimática obtida foi $41 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, seguido do *p*-NPDD e do *p*-NPP com atividades de 27 e $22 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente.

Figura 2.12 – Seletividade da lipase frente a substratos de cadeias carbônicas de tamanhos diferentes.



Fonte: elaborada pelo autor

O substrato *p*-NPP é o mais utilizado para quantificar a atividade enzimática da lipase porque apresenta 16 carbonos em sua cadeia saturada, sendo possível verificar somente a atividade lipolítica, uma vez que esterases não conseguem utilizar como substrato estruturas com mais de 6 carbonos. Entretanto a seletividade das lipases pode variar de acordo com sua origem, e como foi apresentado, a lipase produzida pelo fungo *F. verticillioides* apresenta maior seletividade por substratos de cadeias médias, apresentando uma maior atividade com o *p*-NPD.

4.3 Quantificação da atividade hidrolítica das enzimas extracelular e intracelular

Há relatos de dois tipos de lipases, a lipase extracelular, o qual é secretada no meio de cultura e a intracelular, que permanece no interior da célula ou na parede celular. Muitas lipases são comercialmente disponíveis, entretanto a maioria delas são enzimas extracelulares, e há poucas pesquisas dedicadas a lipases intracelulares (SOLARTE et al., 2014).

Para verificar se havia mais lipases presentes na célula do fungo P24, além da lipase extracelular, foi extraído o conteúdo da membrana celular e do citoplasma através da metodologia descrita no item 3.9. A Tabela 2.2 mostra que o extrato da enzima ligada à membrana apresenta uma atividade 14 vezes maior que o extrato da lipase extracelular, porém a enzima extracelular foi extraída com 60 mL de água destilada e a lipase presente na membrana foi extraída com 3 mL de tampão fosfato. Portanto foi calcula a atividade específica de cada extrato enzimático utilizando-se a quantidade de proteínas presentes no meio. O extrato da enzima presente na membrana apresentou atividade especifica 10 vezes maior que o extrato da enzima extracelular e 6 vezes maior que o extrato da enzima do citoplasma.

Tabela 2.2 - Quantificação da atividade especifica das lipases produzidas pelo *F. verticillioides*.

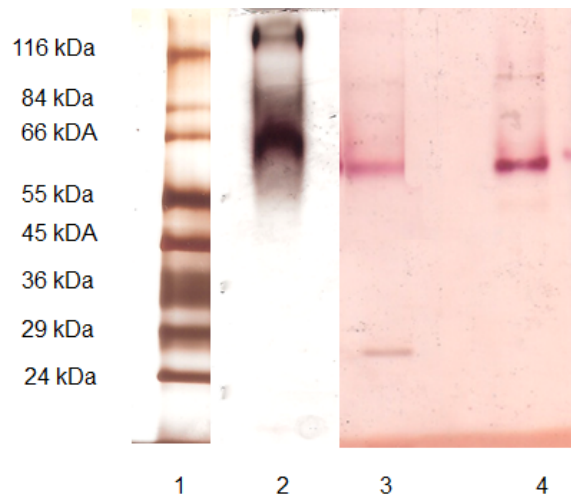
Enzima	Atividade hidrolítica (U)	Proteínas Totais (mg)	Atividade específica (U/mg)
Extracelular	63,5	7,00	9,07
Envoltório celular	46,2	0,58	79,6
Citoplasma	5,80	0,42	13,8

O fato do extrato enzimático da membrana apresentar uma atividade especifica maior, mostra que a célula da cepa fúngica P24 também tem potencial para ser utilizada nas reações lipolíticas, aproveitando as outras frações enzimáticas.

Foi realizado um zimograma de hidrólise dos extratos enzimáticos obtidos para verificar a presença de mais de uma lipase. Figura 2.13 mostra a presença de 3 enzimas diferentes, onde a enzima de aproximadamente 66 kDa esta presente em todos os extratos. Entretanto há um proteína maior de aproximadamente 116 kDa no extrato de enzima extracelular que também pode ser dímero da enzima de 66

kDa, uma vez que o massa molecular é próximo o dobro. No extrato da enzima ligada a membrana, também é possível observar outra proteína de aproximadamente 25 kDa, mostrando que é possível a presença de mais de uma lipase na célula do fungo *F. verticillioides*.

Figura 2.13: SDS-PAGE eletroforese dos extratos enzimáticos. 1: Wide – molecular mass marks submetida à coloração com prata. 2: Zimograma da enzima extracelular 3: Zimograma da enzima presente na membrana 4: Zimograma da enzima presente no citoplasma (poliacrilamida 13% corado com corante específico α - β -naphtyl na presença de fast blue).



Fonte: elaborada pelo autor

5 CONCLUSÃO

A cepa do fungo *F. verticillioides* é mesofílica e cresceu em temperaturas entre 25 e 35°C, entretanto produziu maior quantidade de lipase quando a fermentação foi realizada 35°C. A produção enzimática também sofre influência dos nutrientes utilizados na fermentação, mostrando que a lipase é realmente uma enzima indutível, obtendo melhor atividade hidrolítica utilizando-se óleo de milho e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente.

Esta lipase apresentou temperatura aparente e uma boa estabilidade em 35°C, apesar de ser mais estável a 30°C, podendo ser utilizadas em processos com menor gasto de energia. O pH aparente de atuação desta enzima foi em pH 8, entretanto sua maior estabilidade foi em pH 5, apresentando baixa estabilidade em pH alcalino. Com isso, esta lipase pode ser utilizada em processos mais ácidos uma vez que também mantém boa atividade em pH levemente ácido com 4 e 5. Além disso, alguns solventes orgânicos (*n*-hexano e etanol) apresentaram um efeito positivo sobre esta lipase, ativando-a, certamente devido a interação entre a “lid” e o meio orgânico.

Outra característica muito importante desta lipase é sua seletividade por substratos de cadeias médias, podendo ser utilizadas na indústria de aromas e fragrâncias, geralmente produzidos por ácidos graxos de cadeias médias.

Também foi observado a presença de lipases na membrana celular, mostrando que a célula inteira do fungo *F. verticillioides* P24, pode ser utilizadas em reações onde seja necessário o uso de um biocatalisador mais estável que enzimas livres, com um custo menor em relação a enzimas imobilizadas em suportes inertes.

CAPÍTULO III
Imobilização da célula contendo lipase em
farelo de trigo, caracterização e aplicação da
enzima

Resumo

As lipases catalisam uma ampla gama de reações de hidrólise, além disso, elas também são capazes de catalisar reações de transesterificação e esterificação, o que lhes garante uma ampla aplicação industrial. Dentre os produtos pelos quais tem crescido o interesse industrial, se destacam os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) que despertam grande interesse na indústria de alimentos e nutracêutica e os ésteres de baixo peso molecular que são interessantes para as indústrias de cosméticos e perfumaria. As enzimas imobilizadas apresentam vantagens como melhor estabilidade e possibilidades de reutilização, representando diminuição de custos. Tem sido crescente o interesse por lipases imobilizadas no próprio substrato de crescimento em FES, por apresentar vantagens como facilidade de produção e custos. Neste Trabalho as lipases do fungo *F. verticillioides* foram obtidas “imobilizadas” no próprio farelo de trigo durante a FES. Foi verificado que os sais minerais, a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio influenciaram muito na produção da lipase. Além disso, a lipase apresentou uma boa atividade de esterificação ($425 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$). As reações de esterificação e transesterificação, para a enzima ligada à membrana foram melhores na presença de substratos de cadeias carbônicas maiores. A enzima também foi muito eficiente para produção de ésteres etílicos a partir de óleos pré-usados, o que constituiu opção para dar fim a este resíduo. O uso do ultrassom também se mostrou uma ferramenta muito importante na produção de ésteres, aumentando o rendimento da reação.

Abstract

Lipases catalyze a wide range of hydrolysis reactions, moreover they are also capable of catalyzing transesterification and esterification reactions, which gives them a wide industrial application. Among the products for which there has been growing industrial interest, we highlight polyunsaturated fatty acids (PUFAs) that arouse great interest in the food and nutraceutical industries, and esters of low MW that are interesting for the cosmetics and perfume industries. The immobilization of enzymes improve stability and have advantages as possibilities of reuse, representing a cost reduction. There has been growing interest in lipase immobilized on the same growth substrate in FES, since it has advantages such as ease of production and costs. In this work the lipase of *F. verticillioides* was obtained "immobilized" in wheat bran itself obtained by FES. It has been found that the mineral salts, the carbon source and nitrogen source greatly influenced the lipase production. In addition, the lipase showed good esterification activity ($425 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$). The transesterification and esterification reactions, for the enzyme bounded to the membrane were better in the presence of high carbon chain substrates. The enzyme was also very efficient for the production of ethyl esters from waste cooking oil, which constituted option to end this residue. The use of ultrasound was also a very important tool in production of esters by increasing the yield of the reaction.

1 INTRODUÇÃO

As lipases catalisam uma ampla gama de reações de hidrólise, por isto elas são utilizadas em várias aplicações industriais, como na indústria de alimentos, farmacêuticas e detergentes (HUNG et al., 2003, PÉREZ et al., 2011, GODOY et al., 2013). Além disso, as lipases também são capazes de catalisar a hidrólise e a transferência dos ésteres para outros ésteres (transesterificação), bem como a síntese de outros ésteres (esterificação) a partir de AGL e álcoois (FERNANDES et al. 2007; FERRAREZI et al. 2014) gerando produtos de alto valor agregado como os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) com funcionalidades de grande importância na indústria de alimentos e nutracêutica (PÉREZ et al., 2011), e ésteres de grande importância para as indústrias de cosméticos e perfumaria (HUNG et al., 2003, PÉREZ et al., 2011, GODOY et al., 2013).

As lipases livres tem limites para utilização industrial, uma vez que são instáveis e não é possível a recuperação após a sua utilização, encarecendo o processo. As enzimas das células imobilizadas podem apresentar maior estabilidade em relação às lipases livres e também podem ser reutilizadas, tornando processos, como produção de biodiesel, viáveis. Por outro lado, a aplicação industrial de lipases comerciais imobilizadas ainda é limitada devido ao seu alto custo, que compreende mais de 90 % do custo total de produção dos ésteres, estando ligado ao tipo de suporte utilizado para imobilização das enzimas (AMORIM et al., 2003, ABD-ALLA et al., 2015, GULDHE et al., 2016). Uma maneira para reduzir o custo das lipases é empregar células imobilizadas no próprio substrato durante o processo de produção, evitando as etapas de recuperação e purificação a partir do caldo de fermentação (ROBLES-MEDINA et al., 2009, FERRAREZI et al., 2014). Semelhante às enzimas imobilizadas, a estabilidade e a capacidade de reutilização das lipases de células inteiras podem ser significativamente melhoradas em comparação com enzimas livres (YAN; ZHENG; LI, 2014)

Entre as células de microrganismos utilizadas em processos biotecnológicos, as células de fungos filamentosos tem se mostrado promissoras para aplicações industriais, uma vez que as hifas fúngicas podem reter as enzimas, imobilizando-as pelo crescimento dos fungos sobre um substrato sólido, resultante em um biocatalisador natural.

Este trabalho estudou a produção de lipases em células inteiras do fungo *F. verticillioides* “imobilizadas” no próprio farelo de trigo durante a FES. Este material contendo atividade lipídica foi empregado para reação de hidrólise de óleos convencionais visando a produção de ácidos graxos ômega 3 e 6, além disso também foram investigados quanto a reações de transesterificação e esterificação visando a obtenção de ésteres, octanoato e palmitato de etila.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo é a imobilização de células do fungo *Fusarium verticillioides* em farelo de trigo e a utilização de lipases ligadas à membrana celular em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação.

2.1 Objetivos Específicos

- Imobilizar as células da cepa fúngica *F. verticillioides* no próprio substrato de fermentação;
- Estudar a produção enzimática de lipase ligada à membrana celular através de modificações de materiais e parâmetros na fermentação em estado sólido;
- Caracterizar físico-quimicamente a lipase produzida pela cepa fúngica *F. verticillioides*, através de planejamento fatorial;
- Produção de ômega 3 e 6 através da reação de hidrólise;
- Produção de ésteres por meio de reações de esterificação e transesterificação;
- Produção de ésteres etílicos a partir de óleos pré-usados;
- Avaliar o emprego do ultrassom na produção de ésteres.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e a metodologias analíticas utilizados para o desenvolvimento do estudo relacionado à produção e caracterização de lipase ligada a membrana do fungo *F. verticillioides* e a imobilização da célula inteira através da fermentação em estado sólido (FES) em farelo de trigo.

3.1 Meios de cultura

Para a fermentação em estado sólido foram utilizados dois meios de cultura. O primeiro meio foi utilizado para o pré-inóculo em ágar e o segundo para a fermentação em resíduos agrícolas.

3.1.1 Pré-inóculo

Para o crescimento da cepa fúngica foi utilizado o meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) (%): 0,1 peptona; 1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 KH_2PO_4 ; 0,05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 CaCl_2 ; 2,5 fonte de carbono; 0,4 de emulsificante (goma arábica, Triton X-100 ou Tween 80); 0,5 de solução de elementos traços (2,2 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,1 de H_3BO_3 ; 0,5 de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16 de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,16 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,11 de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5 de EDTA); 3 de agar e pH 6,0. As fontes de carbono utilizadas foram: óleo de soja, óleo de girassol, óleo de canola, azeite de dendê, óleo de gergelim, óleo de linhaça, óleo de coco, óleo de milho, azeite de oliva, óleo de algodão e ácido oléico.

3.1.2 Solução nutriente

Para o estudo da produção enzimática, várias soluções nutrientes foram usadas para a fermentação de fungos produtores de lipases foram testadas (Tabela 3.1). O azeite foi escolhido para os primeiros experimentos porque possui entre 55 e 84 % de ácido oleico (KNOTHE et al, 2006), considerado indutor para a produção de lipase (LI; WANG; TAN, 2006, WANG; XU; SHAN, 2008). Em seguida foi avaliada a influencia das fontes de nitrogênio e de carbono sobre a produção enzimática. As

fontes de nitrogênio utilizadas foram as seguintes: peptona (11,5 % de nitrogênio), ureia, extrato de levedura (11,5 % nitrogênio), fertilizante agrícola NPK (20% de nitrogênio), NH_4NO_3 (nitrato de amônio), $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amônio) e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (fosfato de amônio monobásico). As fontes de carbono utilizadas foram as mesmas citadas no item 3.1.1.

Tabela 3.1 - Soluções nutrientes que foram testados na fermentação.

Solução 1	Solução 2	Solução 3	Solução 4	Solução 5
1% azeite de oliva 3,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,0% KH_2PO_4 0,4% CaCl_2 0,1% Elem. traço	2% azeite de oliva 2% peptona 0,05% MgSO_4 0,2% K_2HPO_4	2% azeite de oliva 2% peptona 0,05% MgSO_4 0,2% K_2HPO_4 1% lactose pH 6	2% azeite de oliva 0,5% NH_4NO_3 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5% KH_2PO_4 0,1% NaCl 0,1% Elem. Traço pH 6	4% azeite de oliva 0,4% ureia 0,1% MgSO_4 0,5% K_2HPO_4 0,5% Lactose pH 6

3.2 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada em embalagens de polipropileno (26,5 cm x 15 cm) contendo 10 g de farelo de trigo lavado. O pré-inóculo foi realizado a partir do cultivo dos fungos em erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL do meio citado no item 3.1.1 e mantido durante 5 dias a 28°C. Para obtenção dos inóculos, 50 mL de água foram adicionados aos frascos de cultivo dos fungos suspendendo os esporos e micélios pela raspagem suave da superfície dos meios de cultivos. Os esporos suspensos foram quantificados ($4,5 \times 10^7$ esporos/g de substrato) e transferidos juntamente com 20 mL da solução nutriente (item 3.2.2) para as embalagens de polipropileno na quantidade necessária para a obtenção de uma umidade de 70 %. A umidade foi obtida a partir da análise de peso seco do substrato. A fermentação foi realizada durante 72 horas a 28°C sem agitação.

3.2.1 Imobilização de hifas utilizando substrato de crescimento como suporte

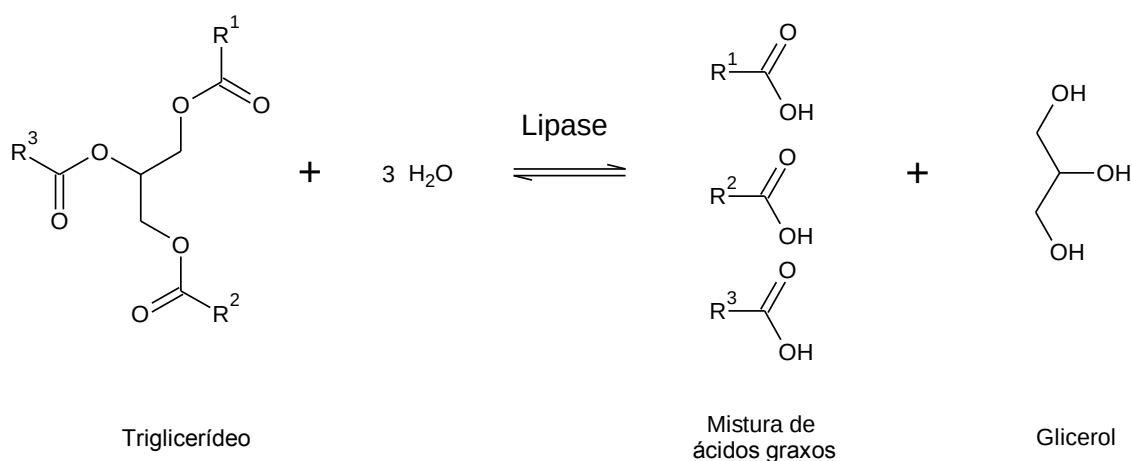
A imobilização de hifas foi realizada através da FES descrita no item 3.2, utilizando o farelo de trigo (triturados e homogeneizados em peneiras com abertura de 1 mm). Após 72 horas de fermentação a 28°C o fermentado sólido foi seco em um liofilizador Thermo Scientific RVT 4104 durante 48 horas.

3.3 Determinação da atividade enzimática

3.3.1 Atividade Hidrolítica utilizando azeite de oliva

Para quantificar a atividade hidrolítica em relação a substrato natural (triglicerídeos) foi utilizada a titulometria. Em erlenmeyers de 50 mL contendo 3 mL de água destilada e 4 mL de tampão fosfato $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7, foram adicionados 0,09 g de goma Arábica. No ensaio padrão foi adicionado ao meio reacional 1 mL de azeite de oliva e 0,25 g de células imobilizadas em farelo de trigo. A reação foi incubada à 37°C por 30 min (Esquema 3.1). Como referencia foi utilizado 3 mL de água destilada 4 mL de tampão fosfato $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7, 0,09 g de goma Arábica e 1 mL de azeite de oliva.

Esquema 3.1: Representação da reação de hidrólise de triglicerídeo.



Após a incubação, a reação foi interrompida com acetona/álcool etílico (1:1 v/v) e titulada com KOH $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ padronizado, usando fenolftaleína 0,001% como

indicador ácido-base (SOARES et al., 1999). Para cálculo da atividade foi utilizado a seguinte equação:

$$\text{Atividade Hidrolítica (U/g de extrato liofilizado)} = \frac{(V_{\text{KOH amostra}} - V_{\text{KOH controle}}) \times M \times 1000}{m_{\text{amostra}} \times \text{tempo}}$$

Onde:

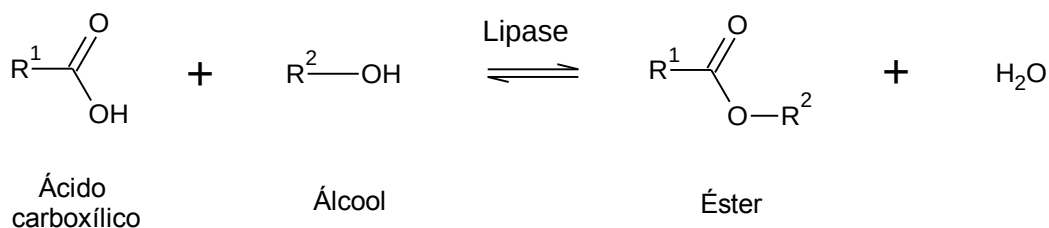
$V_{\text{KOH amostra}}$: volume de base titulada na amostra; $V_{\text{KOH controle}}$: volume de base titulada no controle; M: molaridade de KOH usada ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); m_{amostra} : massa de sólidos liofilizada (0,25 g) ; Tempo de incubação: 30 min.

A atividade é expressa em $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, que é definida como quantidade de enzima necessária para liberar $1 \mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto por grama de proteína, nas condições do ensaio.

3.3.2 Atividade de esterificação

O ensaio padrão de esterificação foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Smaniotto et al. (2014). Adicionou-se 0,25 g de substrato fermentado com o micélio imobilizado ao meio reacional contendo 4,2 g de ácido oleico e 0,7 g de etanol (Esquema 3.2). Como referencia foi utilizado somente 4,2 g de ácido oleico e 0,7 g de etanol.

Esquema 3.2: Representação da reação de esterificação de ácidos graxos.



As misturas foram incubadas durante 40 minutos a 40°C sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, foram retiradas alíquotas (triplicata) de $500 \mu\text{L}$ e as reações foram interrompidas com adição de 20 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona:etanol anidro. Os ácidos graxos não consumidos nas reações foram titulados até pH 11,0 com solução de NaOH $0,035 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. As dosagens de atividade

lipásica de esterificação foram definidas como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas, determinada por meio da seguinte equação:

$$\text{Atividade de esterificação (U/g de extrato liofilizado)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 1000 \cdot V_t}{t \cdot V_a \cdot m}$$

Onde:

Va: volume de NaOH gasto na titulação da amostra; Vb: volume de NaOH gasto na titulação do branco; M: molaridade da solução de NaOH padronizada 0,035; Vt: volume reacional total (5,6 mL); t: tempo de reação (40 min); Val: volume da alíquota (0,5 mL); m: massa de sólidos liofilizada (0,25 g).

Para a realização dos planejamentos fatoriais completos x^y foram utilizados os ácidos butílico e caprílico na mesma proporção molar do ácido oleico e os álcoois metanol e butanol na mesma proporção molar do etanol.

3.3.2.1 Planejamento fatorial completo

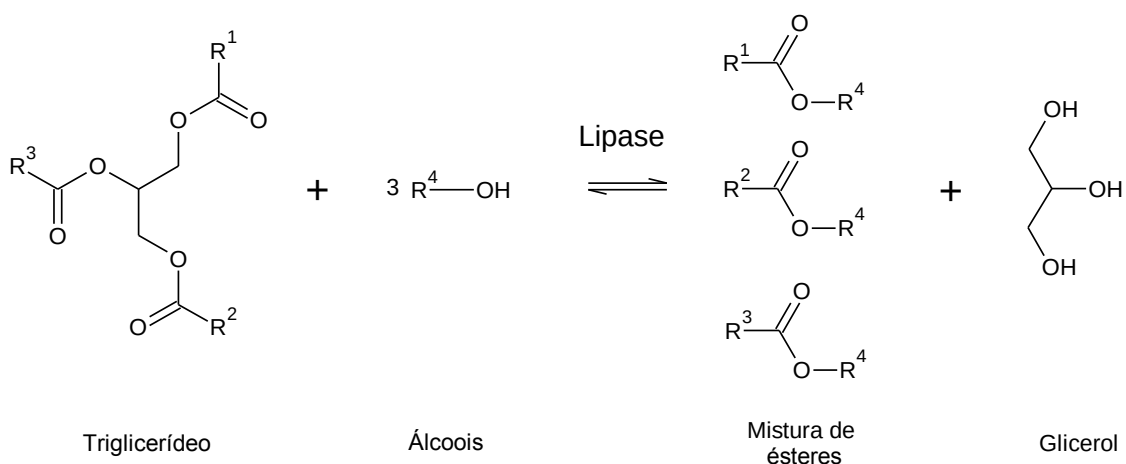
Foram realizados dois planejamentos fatoriais completos 2^2 para verificar os efeitos principais das variáveis sobre a ação enzimática na reação de esterificação. No primeiro planejamento fatorial foi estudada a influência das variáveis temperatura de reação e proporção molar dos reagentes sobre a atividade enzimática e no segundo planejamento foi estudada a influência da quantidade de carbonos presentes nas estruturas dos álcoois e dos ácidos graxos sobre a atividade enzimática. O planejamento fatorial foi criado e analisado pelo software Minitab® 16. A faixa experimental e os níveis das variáveis independentes para a avaliação dos efeitos principais sobre a atividade enzimática são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Valores utilizados nos planejamentos 1 e 2.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	35	40
Razão molar (ácido oleico:etano)	1:1	1:2	1:3
Álcool	Metanol	Etanol	Propano
Ácido graxo	Butílico	Caprílico	Oleico

3.3.3 Atividade de transesterificação

O ensaio padrão de transesterificação foi realizado através da metodologia modificada de Castro-Ochoa et al. (2005), utilizando 4,1 mL de óleo de soja e 1,5 mL álcool com o micélio imobilizado utilizado como catalisador, sob agitação de 150 rpm (Esquema 3.3). As reações ocorreram a 35°C utilizando *n*-hexano como solvente da reação na proporção v/v 1:1,5 óleo/*n*-hexano. O solvente foi evaporado a pressão reduzida. O branco utilizado foi o meio reacional sem a presença de catalisador.

Esquema 3.3: Representação da reação de transesterificação de triglicerídeos.

A quantificação dos ésteres etílicos foi realizada por cromatografia gasosa utilizando detector de ionização de chama (GC-FID). As amostras foram centrifugada e diluída em hexano e 1 µL foi injetado em um Cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 480 e coluna Agilent Select Biodiesel for FAME, usando o software Totalchrom (Perkin Elmer). A programação térmica foi de 160 a 230°C, mantendo uma taxa de

aquecimento de $4^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. As temperaturas do injetor e do detector foram 250°C e 300°C respectivamente, utilizando-se o gás nitrogênio como gás de arraste (split 1:30, pressão cabeça da coluna: 100 kPa).

A curva de calibração foi construída utilizando ésteres linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila e palmitato de etila com pureza acima de 98 % (Sigma-Aldrich). O cálculo de rendimento das reações de sínteses foi realizado segundo proposto por Urioste et al. (2008).

Para o cálculo do rendimento da síntese de biodiesel foi utilizada a Equação A:

$$R (\%) = \frac{M_t}{M_e} \times 100 \quad (\text{Equação A})$$

Onde M_e é a massa teórica esperada de ésteres produzidos e M_t é a massa obtida dos ésteres, calculada de acordo com a curva de calibração construídas com os padrões analíticos.

Para o cálculo do M_e da Equação A, foi necessário usar a Equação B e a Equação C:

$$M_e = \frac{M_o \times MMe}{MMA} \quad (\text{Equação B})$$

$$M_o = Ca \times Mi \quad (\text{Equação C})$$

Onde M_o é a massa inicial dos ácidos graxos presente no óleo, MMA é a massa molecular de cada ácido graxo, MMe é a massa molecular de cada éster correspondente, Ca é a concentração de cada ácido graxo e Mi é a massa inicial de óleo.

Através das Equações B e C, os valores de M_e e o M_o de cada ácido graxo foram calculados para a obtenção da massa teórica esperada a partir da quantidade de óleo utilizada, em seguida aplicada na Equação A para o cálculo, em porcentagem, do rendimento da síntese de ésteres. A concentração de cada ácido graxo presente no óleo foi obtida de acordo com a metodologia proposta por Porto et al. (2015).

3.3.3.1 Planejamento fatorial completo

Foram realizados dois planejamentos fatoriais completos, 2^3 e 2^2 para verificar os efeitos principais das variáveis sobre a ação enzimática na reação de transesterificação. No planejamento fatorial 2^3 foi estudada a influência das variáveis quantidade de catalisador, quantidade de etanol e quantidade de solvente sobre a atividade enzimática. No planejamento 2^2 foi estudada a influência das variáveis quantidade de catalisador novamente e quantidade de carbonos presentes nas estruturas dos álcoois sobre a atividade enzimática. O planejamento fatorial foi criado e analisado pelo software Minitab® 16. A faixa experimental e os níveis das variáveis independentes para a avaliação dos efeitos principais sobre a atividade enzimática são apresentados nas Tabelas 3.3 e 3.4.

Tabela 3.3 - Valores utilizados nos planejamentos 2^3 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Quantidade de catalisador (g)	0,25	0,50	0,75
Quantidade de etanol (g)	0,56	1,13	1,69
Quantidade de solvente (g)	5,81	11,7	17,5

Tabela 3.4 - Valores utilizados nos planejamentos 2^2 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Quantidade de catalisador (g)	0,75	1,00	1,25
Álcool	metanol	etanol	propano

3.4 Produção de ácidos graxos poliinsaturados (ômega 3 e 6)

Para a produção de ácidos graxos poli-insaturados foi utilizada a metodologia proposta por Fernández-Lorente et al. (2011) com algumas modificações. A hidrólise foi realizada em um sistema bifásico, composto de 5 mL de *n*-hexano, 4,5 mL de tampão tris $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7 e 0,5 mL de óleo. O meio reacional foi pré-incubado a 35°C durante 30 minutos em um reator, e em seguida foi adicionado 0,3

g de catalisador (substrato fermentado com cepas imobilizadas) para iniciar a reação, com agitação de 150 rpm.

Alíquotas da fase orgânica foram coletadas e diluídas em acetonitrila para analisar os ácidos graxos produzidos por HPLC-UV. Uma coluna C 8 foi utilizada com um fluxo de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ da fase móvel acetonitrila/água pH 3 na proporção 70/30 v/v. A análise foi realizada a 210 nm (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2012).

3.5 Produção de ésteres etílicos

Para a produção de ésteres etílicos foi utilizada a metodologia proposta por Moreno-Pérez; Guisan; Fernandez-Lorente (2014) com algumas modificações. As reações de esterificação foram realizadas em um sistema composto de 4,5 mL de *n*-hexano, 0,1 mL de etanol e $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido caprílico (ácido octanóico) ou ácido palmítico (ácido hexadecanóico). As reações de transesterificação foram realizadas em sistema composto de 4,5 mL de *n*-hexano, 0,3 mL de etanol e $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de Tricaprilina (trioctanoato de glicerol) ou tripalmitina (tripalmitato de glicerol). As misturas foram pré-incubadas a 35°C durante 30 minutos em reatores de 20 mL, e em seguida 0,3 g de catalisador foi adicionado em cada reator para iniciar a reação, com agitação de 150 rpm.

A quantificação dos ésteres etílicos foi realizada de acordo com a metodologia utilizada no item 3.3.3.

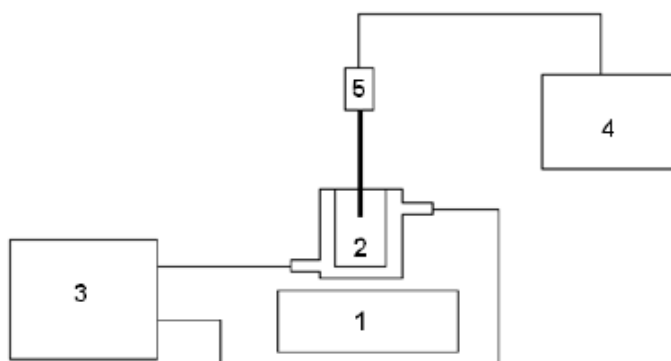
3.6 Síntese de ésteres etílicos com irradiação de ultrassom

O processo de obtenção de ésteres etílicos por catálise enzimática com irradiação de ultrassom foi conduzido em reator de vidro de aproximadamente 45 mL, provido de camisa de circulação de água termostatzada e agitação magnética. A temperatura do reator foi mantida em 35°C através de um banho térmico controlado eletronicamente.

Uma sonda ultrassônica “Sonic Dismembrator 50” (F50, Fisher Scientific com 50 watts de potência e 22 kHz de frequência) foi utilizada como fonte de irradiação de ultrassom. A potência do ultrassom foi ajustada em 10 % e irradiada durante 10 segundos em intervalos de 15 minutos. A mistura reacional foi composta de óleo de

soja, etanol anidro, *n*-hexano e biomassa fúngica (farelo de trigo). A Figura 3.1 representa o esquema utilizado para o experimento.

Figura 3.1 - Esquema de reator para síntese de biodiesel etílico com irradiação de ultrassom utilizando sonda ultrassônica. (1) Agitador magnético, (2) reator de vidro, (3) banho térmico, (4) fonte de ultrassom e (5) sonda ultrassônica.



3.7 Determinação da acidez dos óleos

Os óleos de soja e de soja pré-usado foram submetidos à determinação de acidez para verificar a quantidade de ácidos graxos livres presentes em suas composições e avaliar o efeito da acidez do óleo sobre a reação de transesterificação. A metodologia foi realizada de acordo com Zenebon et al (2008). Foi adicionado 2 g de amostra a 25 mL de solução neutra éter/álcool (2:1) v/v e titulado com solução de NaOH 0,01 mol/L até pH 8.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

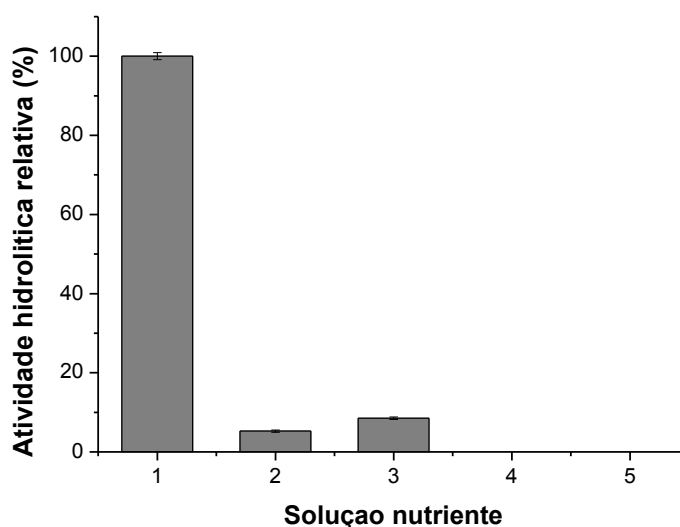
Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados da produção da lipase ligada à membrana por meio de fermentação em estado sólido do fungo *F. verticillioides* empregando diferentes fontes de carbono, nitrogênio e outros nutrientes. Os itens estão apresentando os dados do crescimento da cepa, da caracterização da enzima ligada à membrana através de planejamentos fatoriais e a utilização da célula imobilizada em farelo de trigo em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação.

4.1 Estudo de parâmetros para produção de enzima ligada a membrana

4.1.1 Influência de soluções nutrientes utilizadas na FES sobre a produção enzimática

A atividade hidrolítica do substrato fermentado (células imobilizadas) foi avaliada frente ao azeite de oliva por titulação dos ácidos graxos formados. Por meio da Figura 3.2 é possível observar que somente a lipase produzida na fermentação com a solução nutriente 1 (utilizada com referência de 100 % para calcular as atividades relativas) apresentou atividade de hidrólise relevante frente ao azeite de oliva. Essa produção enzimática pode ter sido afetada principalmente pela quantidade de azeite de oliva utilizada nas fermentações.

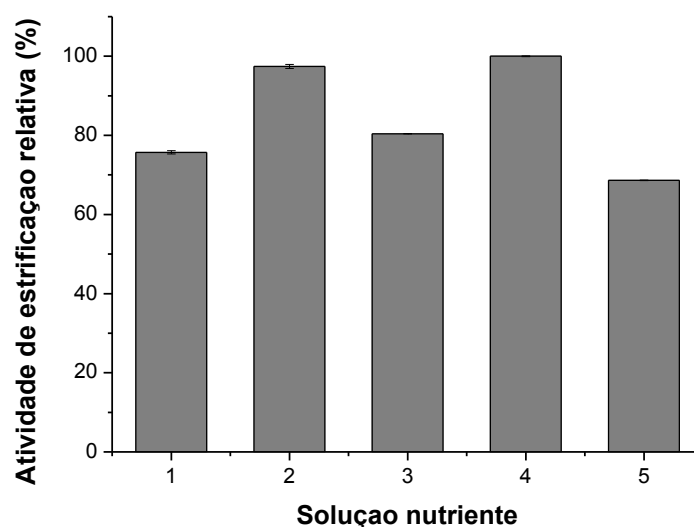
Figura 3.2 - Atividade hidrolítica de lipases produzidas em fontes de nutrientes distintas frente ao azeite de oliva.



Fonte: elaborada pelo autor

Em seguida foi realizada a esterificação do ácido oleico com etanol e medida a atividade esterificante das diferentes lipases. Como pode ser observado na Figura 3.3, a atividade da lipase se mostrou diferente frente ao substrato, porém como ocorreu na hidrólise do *p*-NPP (capítulo 1) a enzima produzida com a solução 4 apresentou melhor atividade (utilizada como 100 % para calcular as atividades relativas). Porém nesse experimento todas as lipases apresentaram atividades de esterificação altas, com a maior atividade de $425 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato fermentado e a menor com atividade de $290 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, representando 70 % da maior atividade. As enzimas produzidas com as soluções 2 e 4 apresentaram resultados muito próximos, mostrando que a presença da solução de elementos traços e de NaCl não influenciou diretamente na produção de enzimas esterificantes. Esse experimento também mostrou que a lipase produzida pelo fungo estudado tem uma alta atividade de esterificação, podendo ser utilizadas para processos que busquem essa propriedade, ou mesmo para produção de biodiesel em duas etapas, realizando primeiro a hidrólise do triglicerídeo e em seguida a esterificação dos ácidos graxos formados.

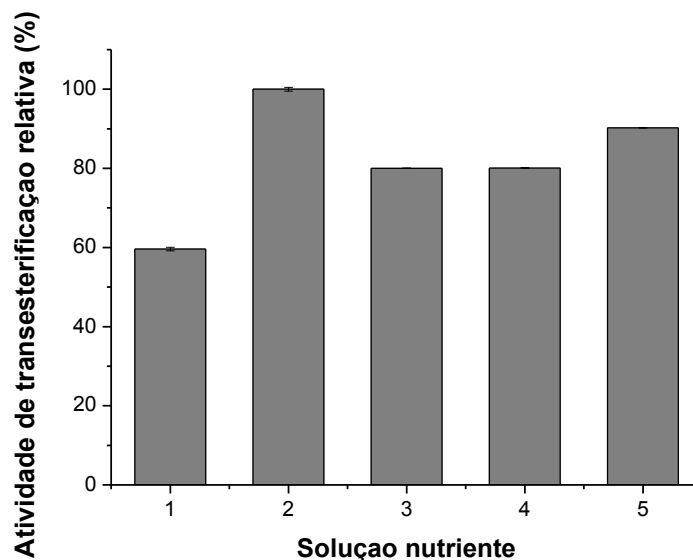
Figura 3.3 - Atividade de esterificação de lipases produzidas em fontes de nutrientes distintas frente ao ácido oleico e etanol.



Fonte: elaborada pelo autor

Posteriormente foi realizada a transesterificação do óleo de soja com o etanol (Figura 3.4). A maior produção de ésteres etílicos foi obtida utilizando a biomassa fúngica fermentada com a solução 2, porém o rendimento não foi alto, produzindo somente 5 % de ésteres etílicos. Apesar de a lipase produzida pelo fungo P24, não apresentar uma alta taxa de conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos, o fato de ela apresentar atividade transesterificante a torna uma enzima potencial para produção de ésteres, uma vez que lipases com esta atividade dificilmente são encontradas na natureza. Mudanças na fermentação, bem como no processo de transesterificação podem aumentar o rendimento desta reação. Há vários relatos na literatura, que mudanças como a imobilização da enzima e o solvente e a quantidade do mesmo utilizado na reação podem influenciar muito na seletividade e nas atividades enzimáticas.

Figura 3.4 - Atividade de transesterificação de lipases produzidas em fontes de nutrientes distintas frente ao óleo de soja e etanol.



Fonte: elaborada pelo autor

Diante dos resultados obtidos para os próximos experimentos foi escolhida a solução 1 para produzir enzimas ligadas a membrana e aplicar em reações de hidrólise e a solução 2 para produzir enzimas para as reações de esterificação e transesterificação.

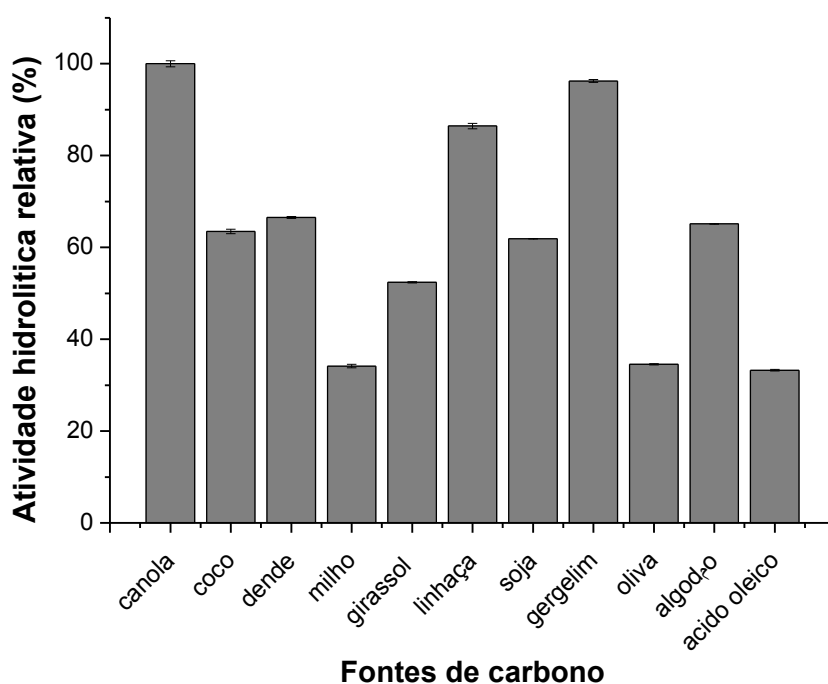
4.1.2 Influência de fontes de carbono sobre a produção enzimática

As fontes de carbono utilizadas foram: óleo de canola, óleo de coco, azeite de dendê, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de linhaça, óleo de soja, óleo de gergelim, azeite de oliva, óleo de algodão e ácido oleico. Os óleos utilizados foram caracterizados quanto à porcentagem dos principais ácidos graxos presentes em suas composições (Apêndice A - Tabela A.1).

A Figura 3.5 mostra a atividade hidrolítica relativa das enzimas utilizando o azeite de oliva como substrato da reação de hidrólise, tendo como produtos ácidos graxos. A lipase produzida pelo fungo cultivado em óleo de canola apresentou maior atividade hidrolítica, em torno de $15,6 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato fermentado (farelo de trigo com cepa de *F. verticillioides* imobilizada). A atividade da enzima produzida com óleo de canola foi utilizada como referencia para calcular as atividades relativas. A enzima obtida a partir da fermentação com óleo de milho apresentou uma das menores produções de ácido graxo, apresentando uma atividade 70 % menor que a

atividade da enzima produzida em óleo de canola. As enzimas dos fungos cultivados em óleo de linhaça e óleo de gergelim também apresentaram boa atividade hidrolítica frente ao azeite de oliva, com uma atividade cerca de 10 % menor que a atividade da enzima produzida em óleo de canola. As atividades hidrolíticas frente ao azeite de oliva parecem se relacionar negativamente com a quantidade de ácido palmítico e linoleico presentes nas fontes de carbono, sendo as atividades maiores quando esses ácidos estão presentes em menor quantidade, com exceção ao óleo de coco que apresenta composição química distinta. O óleo de gergelim parece ter um efeito positivo também devido a quantidade de ácido esteárico, a maior observada entre as fontes de carbono utilizadas. A alta quantidade de ácido oleico presente no óleo de canola não inibiu a atividade da lipase ligada à membrana como ocorreu com a lipase extracelular, porém quando foi utilizado apenas o ácido oleico como fonte de carbono a enzima apresentou apenas $2 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de atividade hidrolítica.

Figura 3.5 - Atividade hidrolítica relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de carbono utilizando-se óleo de soja como substrato.



Fonte: elaborada pelo autor

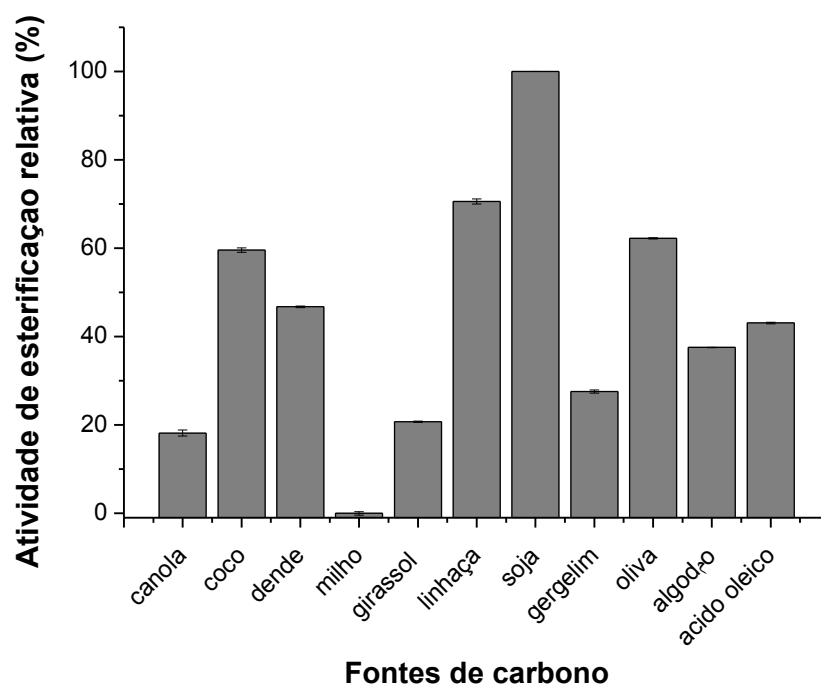
Observando a hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (Figura 2.3) e o a hidrólise do azeite de oliva é possível verificar que a seletividade da enzima pelo substrato pode depender da fonte de carbono utilizada na fermentação, uma vez que a enzima

extracelular produzida com óleo de milho apresentou melhor atividade hidrolítica utilizando palmitato de *p*-nitrofenila como substrato e a enzima ligada à membrana teve a menor atividade quando o substrato utilizado foi o azeite de oliva.

Para avaliar a atividade esterificante (Figura 3.6) foi realizada a esterificação de ácido oleico com etanol, obtendo como produto oleato de etila. A enzima da cepa cultivada em óleo de soja apresentou maior produção de oleato de etila, com uma atividade de $216,5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato fermentado utilizado na reação. A enzima do fungo cultivado em óleo de milho não apresentou atividade enzimática em relação ao ácido oleico. A enzima produzida em óleo de linhaça apresentou 70 % de atividade em relação à produzida em óleo de soja (melhor atividade observada, sendo considerada 100 % para calcular as atividades relativas) e as enzimas produzidas em óleo de coco e azeite de oliva apresentaram cerca de 60 % da atividade. As demais enzimas apresentaram atividade abaixo de 50 % em relação à produzida em óleo de soja. Observando a composição química das fontes de carbono utilizadas a baixa proporção de ácido linolênico encontrada nos óleos de milho, girassol e gergelim afetaram negativamente a atividade enzimática de esterificação da lipase.

O óleo de canola contém cerca de 60 % de ácido oleico (Tabela A.1) e a enzima produzida com este óleo apresentou uma das menores atividades observada. Os óleos de gergelim (42,5 %) e o óleo de milho (35 %) também apresentam uma alta quantidade de ácido oleico em relação aos outros óleos utilizados e as atividades das enzimas produzidas com estes óleos também foram baixas. Quando utilizado o ácido oleico como fonte de carbono na fermentação, a atividade da enzima foi apenas 43 % da atividade observada para a enzima produzida com óleo de soja, mostrando que o ácido oleico não foi um bom indutor para a produção da enzima com atividade esterificante.

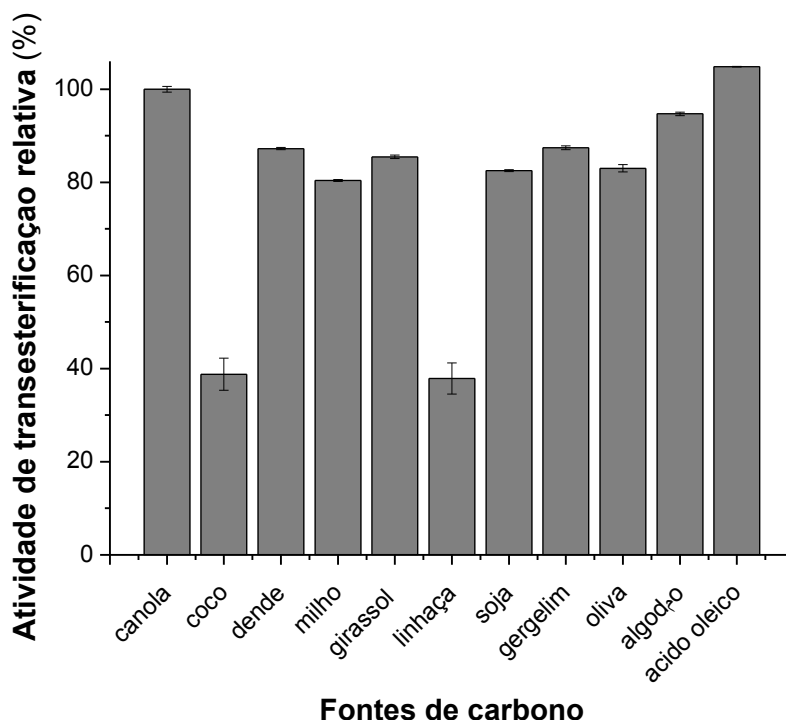
Figura 3.6 - Atividade esterificante relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de carbono utilizando-se ácido oleico como substrato.



Fonte: elaborada pelo autor

Também foi avaliada a capacidade de formação de ésteres etílicos a partir do óleo de soja (Figura 3.7) por meio da reação de transesterificação. Os rendimentos relativos de produção de ésteres etílicos não foram muito diferentes com exceção das reações realizadas com as enzimas produzidas com óleo de coco e óleo de linhaça, que apresentaram cerca de 30 % de rendimento em relação à reação que obteve melhor produção (reação utilizando a enzima produzida com óleo de canola, considerada como 100 % para calcular as atividades relativas). A enzima produzida através da fermentação com óleo de canola apresentou o melhor rendimento de produção de ésteres etílicos, em torno de 6 % de rendimento em relação à quantidade de óleo de soja utilizado na reação. Quando utilizado ácido oleico como fonte de carbono, a produção de ésteres etílicos foi parecida com o rendimento obtido na reação com enzima produzida com óleo de canola, indicando o ácido oleico como indutor da enzima com atividade de transesterificação. A enzima produzida em óleo de algodão também apresentou um ótimo rendimento em relação à produzida com óleo de canola, cerca de 95 %. As demais enzimas apresentaram rendimento entre 80 e 85 % em relação à enzima que obteve melhor rendimento.

Figura 3.7 - Rendimento de transesterificação relativo da síntese de ésteres etílicos a partir de óleo de soja, produzidos com enzimas fermentadas em diferentes fontes de carbono.



Fonte: elaborada pelo autor

Observando a composição química das fontes de carbono, os óleos de coco e de linhaça apresentam a composição mais distinta em relação ao óleo de soja, podendo ter influenciado na produção de enzimas com atividade transesterificante.

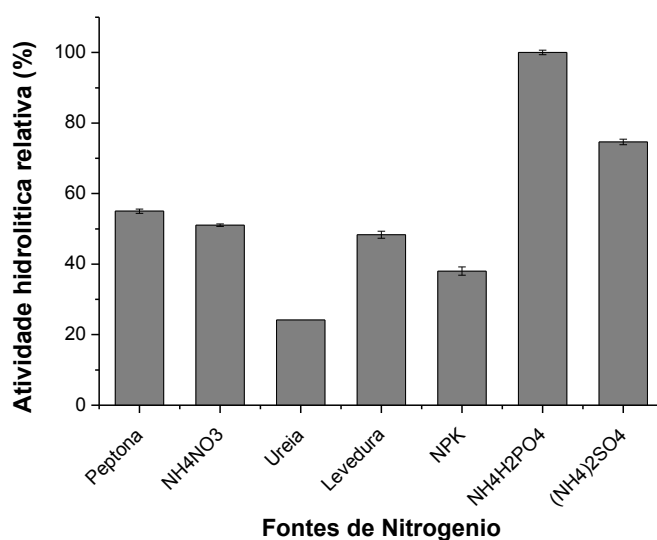
Comparando as reações com triglicerídeos, hidrólise e transesterificação, é possível observar que a enzima produzida com óleo de canola apresenta uma preferência por esses substratos em relação às outras enzimas, mostrando que a fonte de carbono utilizada na fermentação pode influenciar na seletividade da enzima em relação ao substrato.

4.1.3 Influência das fontes de nitrogênio sobre a produção enzimática

Em seguida o efeito que diferentes fontes de nitrogênio podem causar a produção enzimática durante a FES foi analisado. As fontes de nitrogênios avaliadas foram: peptona, NH_4NO_3 , ureia, extrato de levedura, NPK, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As fontes de nitrogênio foram adicionadas ao experimento mantendo-se a proporção de nitrogênio no meio fermentativo (0,23 %).

A hidrólise do azeite de oliva foi realizada, e como foi mostrado nos experimentos anteriores com fermentações com diferentes fontes de carbono, as enzimas produzidas com diversas fontes de nitrogênio também apresentam seletividade distinta para os diferentes substratos (Figura 3.8), isto significa que o tipo de enzima produzida depende dos nutrientes utilizados na FES. A enzima da cepa cultivada em $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ apresentou melhor atividade hidrolítica em relação ao azeite de oliva, obtendo uma atividade de $54 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de células imobilizadas (atividade utilizada como 100 % para calcular as atividades relativas). A enzima produzida em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mostrou a segunda maior atividade, cerca de 25 % menor que a lipase que apresentou melhor atividade.

Figura 3.8 - Atividade hidrolítica relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de nitrogênio utilizando-se óleo de soja como substrato.

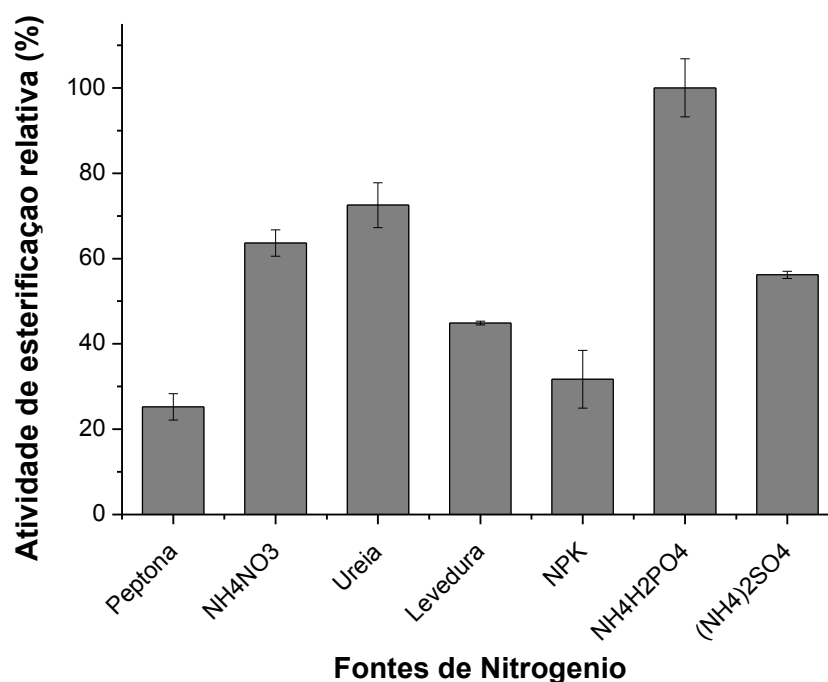


Fonte: elaborada pelo autor

Para a reação de esterificação as enzimas também apresentaram seletividade diferente das reações de hidrólise, porém a enzima do fungo cultivado em $\text{NH}_4\text{N}_2\text{PO}_4$ produziu a maior quantidade de oleato de etila, como ocorreu na reação de hidrólise do azeite de oliva. A atividade da enzima produzida com $\text{NH}_4\text{N}_2\text{PO}_4$ foi utilizada com 100 % para calcular as atividades relativas. A reação conduzida com a enzima obtida a partir da fermentação com ureia apresentou a segunda melhor produção de oleato de etila, com uma atividade menor que 25 % que a melhor. A

enzima da cepa cultivada em peptona apresentou a menor atividade esterificante, com cerca de 25 % da atividade da enzima produzida em $\text{NH}_4\text{N}_2\text{PO}_4$ (Figura 3.9).

Figura 3.9 - Atividade esterificante relativa das lipases produzidas em diferentes fontes de nitrogênio utilizando-se ácido oleico como substrato.



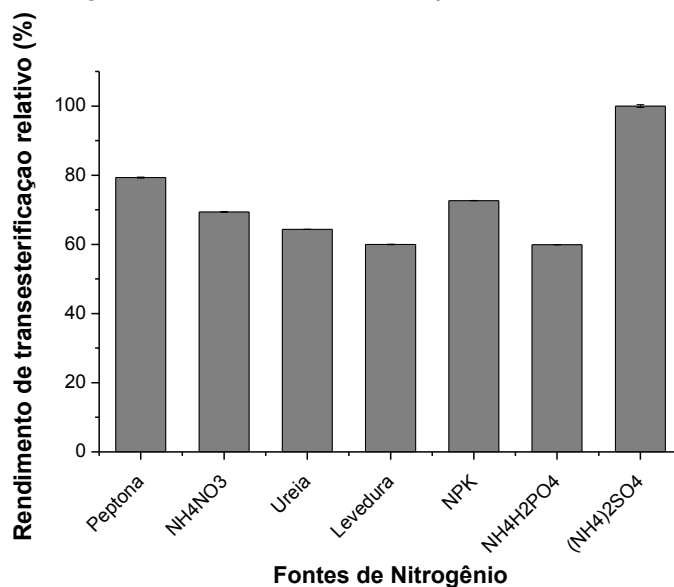
Fonte: elaborada pelo autor

O último experimento realizado foi a transesterificação do óleo de soja com o etanol utilizando-se as células imobilizadas em farelo de trigo cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio. Para esse processo o catalisador foi pesado de acordo com a atividade medida na hidrólise do óleo de soja, para diminuir a influência da quantidade de enzima sobre o rendimento da reação, sendo colocado para cada reação a quantidade equivalente a $3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$.

A Figura 3.10 mostra que a enzima produzida pelo fungo fermentado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentou maior capacidade de converter triglicerídeos em ésteres etílicos, sendo o rendimento considerado como 100 % para calcular os rendimentos relativos. A enzima produzida a partir da peptona, que era originalmente utilizada como fonte de nitrogênio, produziu 20 % a menos de ésteres etílicos, seguida pelo fertilizante NPK. Já as enzimas produzidas utilizando-se NH_4NO_3 , ureia, extrato de

levedura e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ apresentaram entre 60 e 70 % de rendimento, não apresentando correlação alguma com as atividades hidrolíticas e de esterificação.

Figura 3.10 - Rendimento de transesterificação relativo das lipases produzidas em diferentes fontes de nitrogênio utilizando-se óleo de soja e etanol como substrato.



Fonte: elaborada pelo autor

Com exceção da atividade hidrolítica frente ao *p*-NPP, onde são usadas lipases extracelulares, as fontes de nitrogênio inorgânicas parece produzir lipases ligadas a membrana com melhores atividade.

Estes experimentos mostraram que a seletividade da lipase produzida pelo fungo *F. verticillioides* pode variar dependendo dos nutrientes, das fontes de carbono e fontes de nitrogênio utilizadas nas fermentações. Todas as atividades das enzimas foram avaliadas, para que esta lipase possa ser utilizada em diferentes processos.

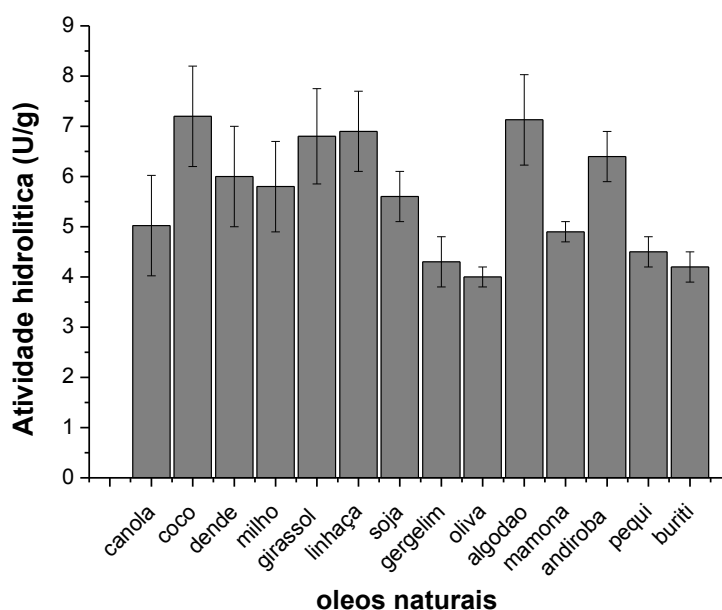
Observando todos os resultados, para a continuidade deste Trabalho as fermentações com fungo *F. verticillioides* P24 foram realizadas utilizando-se a solução 1, óleo de canola e fosfato de amônio monobásico para produzir as enzimas que serão utilizadas nas reações de hidrólises; a solução 2, óleo de soja e fosfato de sódio monobásico para produzir as enzimas a ser usadas nas reações de esterificação; a solução 2, óleo de canola como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio para produzir as enzimas que serão utilizadas nas reações de transesterificação.

4.2 Reações hidrolíticas

4.2.1 Atividade enzimática em diferentes óleos naturais

Após selecionar os nutrientes utilizados na FES a cepa imobilizada em farelo de trigo foi empregada em reações de hidrólise para verificar a seletividade da enzima por óleos vegetais. Através da Figura 3.11 é possível observar que a enzima ligada à membrana não apresentou seletividade específica por nenhuma característica presente na composição dos triglicerídeos utilizados, uma vez que as maiores atividades hidrolíticas foram observadas nas reações em que foram usados os óleos de coco e de algodão, que possuem composições bem distintas (Tabela A.1).

Figura 3.11 - Atividade hidrolítica da célula ligada membrana frente a diferentes óleos naturais.



Fonte: elaborada pelo autor

Durante o experimento, alguns óleos apresentaram maior acidez em seus brancos, apresentando pH abaixo de 8 no começo da titulação. Esses óleos foram gergelim, mamona, pequi e buriti e azeite de oliva, sendo os mesmos óleos utilizados nas reações que apresentaram as menores atividades. Com isso, é possível observar que nesses 30 minutos de reação o que mais influenciou a atividade enzimática foi a acidez dos óleos utilizados.

4.2.2 Produção de ômega 3 e 6 a partir de óleos vegetais

O micélio imobilizado em farelo de trigo foi empregado na reação de hidrólise para a produção ácidos graxos poliinsaturados como ômega 3 (ácido linolênico) e 6 (ácido linoleico) a partir dos óleos de canola, linhaça e soja. Os óleos utilizados foram caracterizados quanto à composição de ácidos graxos (Tabela A.1). Esses óleos foram selecionados porque apresentam ômega 3 e 6, sendo o óleo de linhaça o substrato com maior quantidade de ômega 3 (55,5 %) e o óleo de soja com maior quantidade de ômega 6 (53,4 %).

As reações de hidrólises foram realizadas em meio bifásico, usando-se como solvente o *n*-hexano e o ciclo-hexano. A Tabela 3.5 mostra que em *n*-hexano a lipase apresentou maior taxa de conversão de triglicerídeo em ácido linolênico (ômega 3) utilizando-se óleo de canola e óleo de linhaça como substrato da reação (34,9 e 15,9 %, respectivamente), entretanto utilizando-se o óleo de soja, a lipase teve melhor atuação em ciclo-hexano, com um rendimento de 29,4 %. O mesmo ocorreu com a produção de ácido linoleico (ômega 6), onde a taxa de conversão de triglicerídeos é maior em *n*-hexano quando utilizado o óleo de canola e o óleo de linhaça. Utilizando-se o óleo de linhaça como substrato da reação de hidrólise foi possível obter 70,9 % de ômega 6 em 12 horas de reação. Como já observado na produção de ômega 3, o uso do óleo de soja como substrato da reação faz com que a enzima tenha melhor atuação na presença de ciclo-hexano. Esses resultados mostram que a atuação da enzima depende do substrato e do solvente utilizado na reação.

Tabela 3.5 - Concentração (mmol.L⁻¹) e porcentagem de conversão de ácidos graxos produzidos.

Óleos vegetais	Ômega 3				Ômega 6			
	<i>n</i> -hexano		Ciclo-hexano		<i>n</i> -hexano		Ciclo-hexano	
	mmol.L ⁻¹	%	mmol.L ⁻¹	%	mmol.L ⁻¹	%	mmol.L ⁻¹	%
Canola	3,10	45,6	1,20	17,6	6,40	20,6	5,90	28,2
Linhaça	9,60	17,3	7,60	13,7	11,9	78,8	7,50	49,2
Soja	1,10	16,2	2,10	30,9	6,60	12,4	9,40	17,6

A hidrólise realizada com óleo de linhaça apresentou maior produção de ômega 6 em *n*-hexano (11.9 mmol.L⁻¹), mostrando que esta lipase possui maior seletividade

por este ácido nestas condições, uma vez que o óleo de linhaça apresenta apenas 15 % de ácido linoleico. Também é possível observar que esta lipase não consegue utilizar o ômega 6 presente no óleo de soja, porque apresenta uma baixa produção deste ácido que esta presente em maior quantidade na composição do óleo de soja.

A produção do ômega 3 parece acompanhar a quantidade de ácido graxo presente na composição do óleo vegetal, mostrando que a seletividade da lipase praticamente não foi alterada pela escolha de solvente.

De acordo com Holcapek et al. (2003) que caracterizaram diversos óleos de plantas quanto à posição do ácido graxo ligado a cadeia de glicerol, mostraram que o ácido linoleico é principalmente encontrado na posição Sn1 (Sn3) no óleo de linhaça. O fato de este ácido ser encontrado na posição Sn1 pode ter facilitado a ação da lipase produzindo maior quantidade de ômega 6 (11.9 mmolL^{-1}). Holcapek et al (2003) também mostraram que o óleo de soja possui o ácido linolênico principalmente ligado a posição Sn1 do glicerol, também tornando possível um alto rendimento de ômega 3 (29.4 %). O mesmo ocorre com o óleo de canola (NEFF; MOUNTS; RINSCH, 1997) que também apresentou um alto rendimento de ômega 3 (34.9 %). Estes resultados sugerem que a lipase produzida pelo fungo *F. verticillioides* apresenta uma seletividade pela posição Sn1,3.

4.3 Reações de esterificação

4.3.1 Planejamento fatorial 2^2

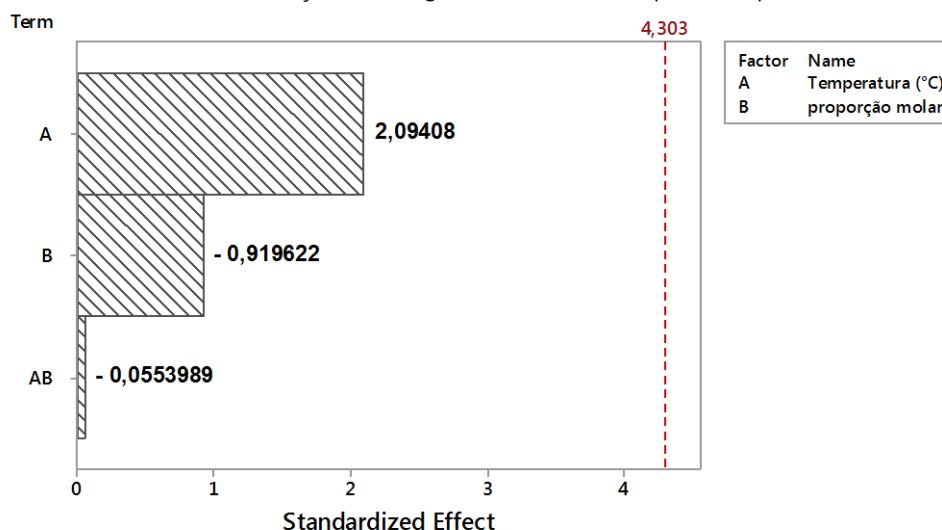
Para avaliar os parâmetros que influenciam a atividade de esterificação da lipase ligada a membrana foram realizados dois planejamentos fatoriais. No primeiro planejamento foram analisadas as variáveis temperatura e proporção molar entre o ácido graxo e o álcool (2^2). A Tabela 3.6 apresenta as variáveis e os níveis utilizados no planejamento 1 e as atividades de esterificação obtidas no experimento. As atividades observadas nos pontos centrais foram as melhores, sendo as reações realizadas a 35°C e com a proporção molar de 1:2 de ácido oleico/etanol.

Tabela 3.6 - Matriz do planejamento fatorial 1 (valores reais e codificados) com as respostas da atividade esterificação para as células imobilizadas em trigo.

Ensaio	Variáveis		Atividade de esterificação ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Proporção molar (ácido oleico/etanol)	
1	30 (-1)	1:1 (-1)	46,55
2	40 (1)	1:1 (-1)	80,50
3	30 (-1)	1:3 (1)	32,90
4	40 (1)	1:3 (1)	65,10
5	35 (0)	1:2 (0)	160,00
6	35 (0)	1:2 (0)	180,95
7	35 (0)	1:2 (0)	150,00

Apesar do ponto central apresentar as melhores atividades de esterificação, o Diagrama de Pareto (Figura 3.12) mostra que nenhuma das variáveis utilizadas foi significativa, apresentando valores de efeito principal abaixo de 4,30. A variável temperatura é sempre citada como tendo influência sobre a atividade enzimática, porém este planejamento usou uma faixa pequena de temperatura, onde a enzima não foi afetada com sua variação. Em relação à proporção molar ácido oleico/etanol o efeito principal foi menor que o efeito da temperatura, mostrando que a proporção molar realmente não teve influência sobre a atividade de esterificação, sendo escolhida a proporção molar 1:1 ácido/álcool para continuidade.

Figura 3.12 – Diagrama de Pareto das variáveis manipuladas no planejamento 1 sobre a atividade de esterificação do fungo *F. verticillioides* ($\alpha = 0,05$).



Fonte: elaborada pelo autor

Apesar da variável temperatura não ser significativa, ela apresentou um efeito positivo de 2,09, mostrando que em temperaturas maiores a atividade de esterificação foi melhor, portanto foi selecionada a temperatura de 35°C para dar continuidade ao Projeto, uma vez que a temperatura aparente da enzima extracelular também foi 35°C.

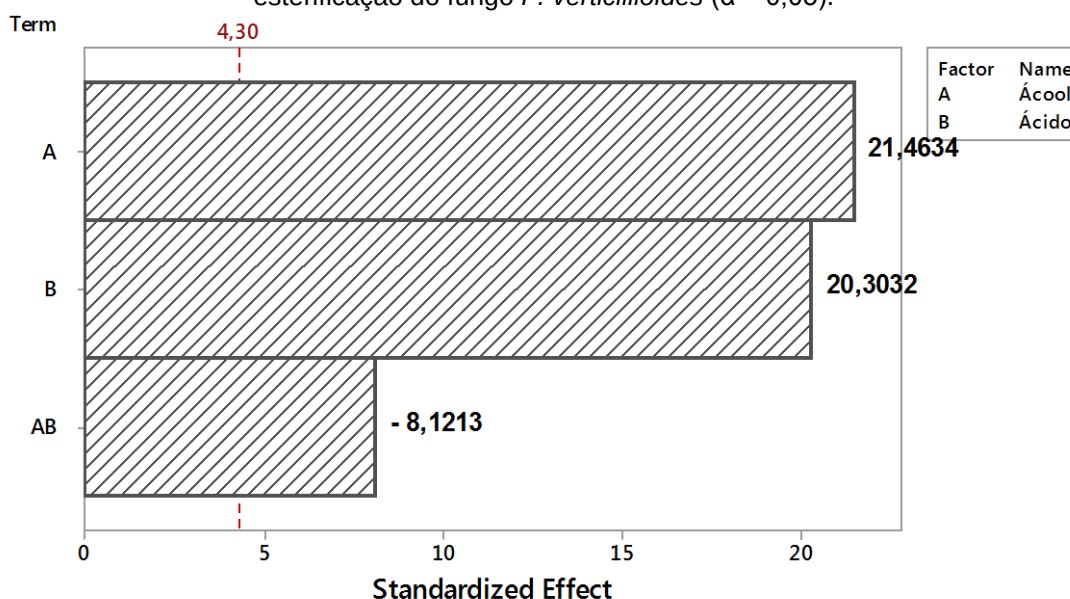
No segundo planejamento fatorial foram analisadas as variáveis ácido graxo e álcool, onde se utilizou ácidos graxos e álcoois de cadeias carbônicas de vários tamanhos. A Tabela 3.7 mostra as variáveis e os níveis utilizados juntamente com as atividades de esterificação obtidas. A enzima apresentou maior atividade na reação em que foi utilizado ácido oleico e propanol ($126 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$), sendo o ácido e o álcool com as maiores cadeias carbônicas, 18 e 3 carbonos, respectivamente. As reações em que foi utilizado o propanol foram as que a enzima apresentou as maiores atividade, mostrando que o tamanho da cadeia carbônica do álcool influencia a ação enzimática. A enzima não apresentou atividade de esterificação na reação utilizando-se metanol e ácido butílico como substrato, ou seja, esta lipase não atua na presença de substrato com cadeias menores como ocorre com a esterase.

Tabela 3.7 - Matriz do planejamento fatorial 2 (valores reais e codificados) com as respostas da atividade esterificação para as células imobilizadas em trigo.

Ensaio	Variáveis		Atividade de esterificação (U•g ⁻¹)
	Álcool	Ácido graxo	
1	Metanol (-1)	Butílico (-1)	0,000
2	Propanol (1)	Butílico (-1)	89,25
3	Metanol (-1)	Oleico (1)	85,75
4	Propanol (1)	Oleico (1)	126,0
5	Etanol (0)	Caprílico (0)	67,55
6	Etanol (0)	Caprílico (0)	70,35
7	Etanol (0)	Caprílico (0)	65,25

O Diagrama de Pareto (Figura 3.13) confirma que o tamanho da cadeia carbônica do álcool teve um efeito principal positivo sobre a atividade enzimática, com um valor de 21,46. Este valor de efeito principal mostra que a enzima tem melhor atuação em álcoois de cadeias maiores. Os ácidos graxos também apresentaram um valor alto de efeito principal sobre a atividade enzimática (20,30), mostrando que o tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo também tem uma grande influência sobre a atuação da enzima, apresentando melhor atividade com ácidos graxos de cadeias carbônicas maiores.

Figura 3.13 – Diagrama de Pareto das variáveis manipuladas no planejamento 2 sobre a atividade de esterificação do fungo *F. verticillioides* ($\alpha = 0,05$).



Fonte: elaborada pelo autor

O efeito secundário, que analisa as variáveis ácido graxo e álcool juntas, apresentou o valor de $-8,12$, mostrando que o efeito das variáveis juntas sobre a atividade enzimática é maior quando se utiliza compostos de cadeias carbônicas menores.

4.3.2 Reações com ácidos graxos de cadeias carbônicas média e grande

Após verificar quais são as variáveis que mais influenciam a atividade enzimática de esterificação, foram realizadas as reações de esterificação com a célula imobilizada no farelo de trigo para aplicar a enzima na produção de palmitato de etila e octanoato de etila. O etanol foi utilizado como substrato devido sua produção consolidada no Brasil. O octanoato de etila, também conhecido como caprilato de etila (8 carbonos na cadeia principal) é um éster de cadeia média que tem a fragrância “frutada-florida”, sendo muito utilizado como componente de vários aromas frutados, como pêssego, maçã, banana e abacaxi (PATEL et al., 2015). Este éster é encontrado em bebidas alcoólicas (MORENO-GARCÍA et al., 2015, VARARU et al., 2016) e também tem sido usado na síntese de biodiesel (CONIGLIO et al., 2013, DAYMA et al., 2011). O palmitato de etila é um éster que possui 16 carbonos na sua cadeia principal e também é utilizado para produção de biodiesel (KANDA;

VOLL; CORAZZA, 2013), entretanto esse éster também tem ação anti-inflamatória (SAEED et al., 2012) e tem sido usado para enriquecer alimentos infantis, por ajudar na digestão de bebês (TURAN; YEŞİLÇUBUK; AKOH, 2013).

A Tabela 3.8 mostra que a enzima não apresentou seletividade por um substrato específico, produzindo cerca de 12 % de ésteres etílicos em 72 horas de reação. Sendo assim esta lipase tem potencial para ser utilizada em reações utilizando ácidos graxos de cadeia média e grande em reações de esterificação.

Tabela 3.8 - Produção de ésteres etílicos através da reação de esterificação.

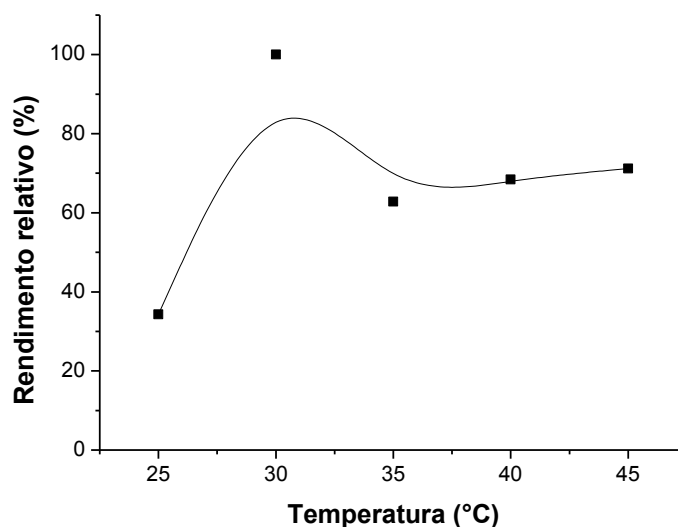
Éster etílico	Rendimento (%)
Octanoato	11,6
Palmitato	12,2

4.4 Reações de transesterificação

4.4.1 Efeito da temperatura e do pH aparente

Para a utilização da enzima ligada à membrana foi realizada a caracterização físico-química da lipase. A temperatura aparente de atuação da lipase na reação de transesterificação foi a 30°C, um pouco menor em relação à temperatura aparente de atividade de hidrólise da enzima livre. No entanto, a lipase mantém mais de 70% da sua atividade de transesterificação numa faixa de 35 a 45°C, como ocorreu na reação de hidrólise. Esta característica indica a possibilidade de ser utilizada a temperaturas mais elevadas para reduzir o risco de contaminação por microrganismos mesófilos (Figura 3.14).

Figura 3.14 - Efeito da temperatura sobre o rendimento de ésteres etílicos, em pH 5,8.



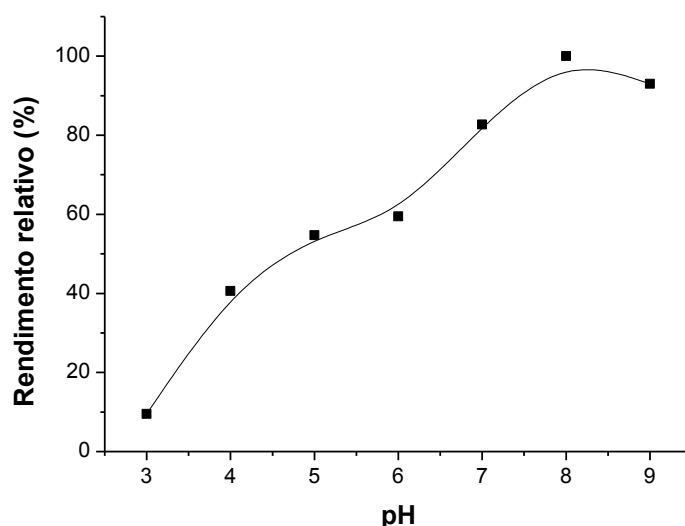
Fonte: elaborada pelo autor

Para verificar o pH aparente da enzima foi necessário adicionar tampão ao meio reacional, porém a presença de água na reação de transesterificação, pode fazer com que ocorra a reação de saponificação diminuindo a produção de ésteres (JAN et al., 2016). Portanto foi analisada a influência da quantidade de água na reação de transesterificação (Tabela 3.9). Utilizou-se como referência uma reação de transesterificação sem a adição de água e cuja umidade do meio reacional foi devido ao óleo (0,07 %) e ao etanol (0,01 %). A reação de referência foi considerada como rendimento de 100 % de produção de ésteres. A síntese praticamente não foi afetada com a adição de 1 % de água (queda de 0,1% do rendimento na produção de ésteres). Entretanto, com 5 % de água na mistura reacional, o rendimento caiu praticamente interrompendo a produção de ésteres. Estes resultados diferem dos estudos realizados por Foresti et al. (2007), onde a adição de até 20 % de água ao meio, aumentou a produção de ésteres etílicos nas primeiras horas de esterificação do ácido oleico utilizando-se as enzimas comerciais *Cândida rugosa* (AY lipase), *Pseudomonas fluorescens* (AK lipase) e *Cândida antarctica* (Novozyme 435). Os resultados obtidos por Oliveira et al. (2004) mostraram que a adição de até 10 % de água ao meio reacional contendo óleo de mamona também manteve um rendimento de 100 % na reação de síntese utilizando-se as enzimas comerciais Lipozyme IM (*Mucor miehei*).

Tabela 3.9 – Produção de ésteres etílicos utilizando-se água no meio reacional.

Quantidade de água (%)	Rendimento de esterificação (%)
0,0	6,65
1,0	5,70
5,0	0,54
10	0,53

Sabendo-se que 1 % de água quase não afetou a reação de transesterificação, foi adicionando 1 % de tampão $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ao meio reacional para controlar o pH. Os tampões utilizados foram: acetato para os pH 3 e 4, citrato para pH 5 e 6, fosfato pH 7 e 8 e glicina-NaOH para pH 9. O rendimento de produção de ésteres etílicos foram avaliados em pH de 3 a 9 (Figura 3.15) através da reação de transesterificação do óleo de soja com o etanol. O pH aparente de atuação da lipase produzida por *F. verticillioides* na reação de transesterificação também foi 8 como ocorreu com a lipase extracelular utilizada na reação de hidrólise, mostrando que esta lipase apresenta melhor atuação em pHs alcalinos, mantendo 80 % de sua atividade em pH 7. O pH aparente da enzima extracelular também foi 8, mostrando características semelhantes para as reações de hidrólise e transesterificação.

Figura 3.15 - Efeito do pH sobre o rendimento de produção de ésteres etílicos a 30°C.

Fonte: elaborada pelo autor

4.4.2 Planejamento fatorial x^y

Também foram realizados dois planejamentos fatoriais para verificar a influência de algumas variáveis sobre a atividade de transesterificação da enzima ligada à membrana. O planejamento 3 analisou as variáveis volume de solvente (óleo/*n*-hexano v:v), proporção molar óleo/álcool e quantidade de célula imobilizada no farelo de trigo, sendo um planejamento 2^3 . A Tabela 3.10 apresenta as variáveis, os níveis e as respostas dos rendimentos de éteres etílicos. É possível observar no ensaio 2 que a enzima apresentou maior conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos, sendo utilizado a maior quantidade de célula imobilizada em trigo e as menores quantidade de solvente e álcool. Esses resultados mostram que quanto maior a quantidade de enzima utilizada nos ensaios, maior foi a atividade enzimática e com quantidades reduzidas de solvente e álcool há maior conversão de ésteres.

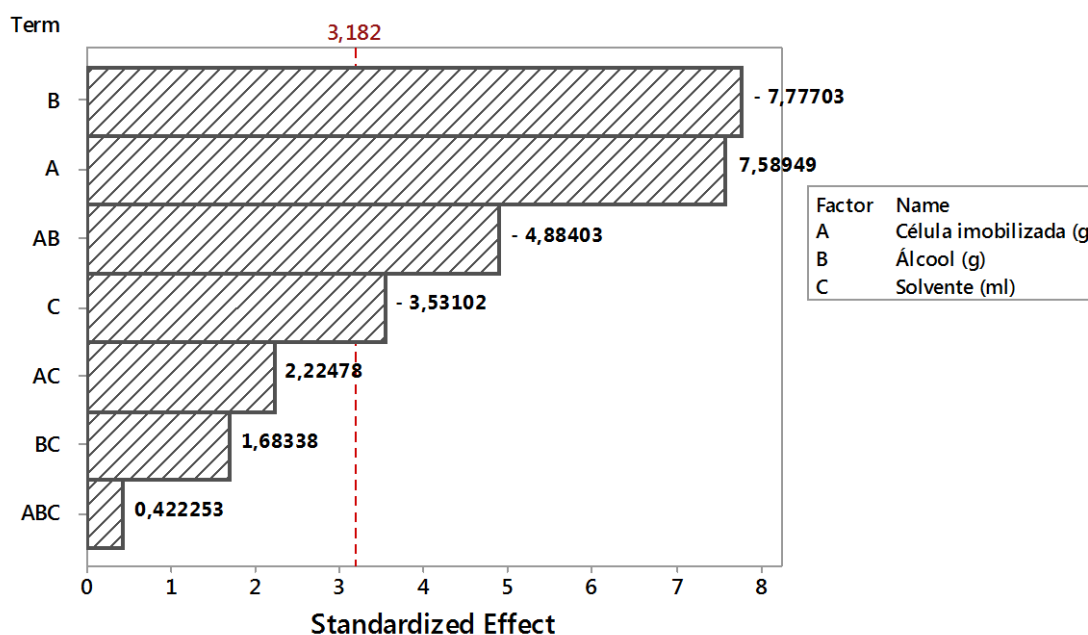
Tabela 3.10 - Matriz do planejamento fatorial 3 (valores reais e codificados) com as respostas da atividade transesterificação para as células imobilizadas em trigo.

Ensaio	Variáveis			Rendimento relativo (%)
	Imobilizado (g)	Proporção molar Óleo/etanol	Proporção v:v Óleo/Solvente	
1	0,25 (-1)	1:3 (-1)	1:1,5 (-1)	84,1
2	0,75 (1)	1:3 (-1)	1:1,5 (-1)	100
3	0,25 (-1)	1:9 (1)	1:1,5 (-1)	79,7
4	0,75 (1)	1:9 (1)	1:1,5 (-1)	84,4
5	0,25 (-1)	1:3 (-1)	1:4,5 (1)	81,3
6	0,75 (1)	1:3 (-1)	1:4,5 (1)	91,7
7	0,25 (-1)	1:9 (1)	1:4,5 (1)	79,6
8	0,75 (1)	1:9 (1)	1:4,5 (1)	80,6
9	0,50 (0)	1:6 (0)	1:3,0 (0)	84,0
10	0,50 (0)	1:6 (0)	1:3,0 (0)	81,0
11	0,50 (0)	1:6 (0)	1:3,0 (0)	84,2
12	0,50 (0)	1:6 (0)	1:3,0 (0)	82,2

O Diagrama de Pareto (Figura 3.16) confirma os resultados obtidos na tabela, mostrando que todas as variáveis analisadas foram significativas apresentando valor

de efeito principal maior que 3,18, entretanto a variável solvente apresentou o menor efeito principal e com valor negativo, mostrando que quantidades menores de solvente tem melhor efeito sobre a atividade enzimática. A variável quantidade de álcool apresentou o maior efeito principal sobre a ação enzimática, mostrando também que quantidades menores de álcool favorece a reação (valor negativo), apesar da enzima extracelular se mostrar muito estável em *n*-hexano e etanol. A quantidade de célula imobilizada também apresentou um efeito principal alto, porém positivo, mostrando que quantidades maiores de enzima aumenta a produção de ésteres etílicos.

Figura 3.16 – Diagrama de Pareto do planejamento 3 sobre a atividade de transesterificação do fungo *F. verticillioides* ($\alpha = 0,05$).



Fonte: elaborada pelo autor

Em seguida foi realizado o planejamento 4 (2^2), avaliando novamente a quantidade de célula imobilizada em farelo de trigo, para verificar se uma quantidade maior de enzima pode afetar negativamente a atividade de transesterificação e a segunda variável foi o tipo de álcool utilizado na reação. A Tabela 3.11 apresenta as variáveis e os níveis utilizados nas reações e a resposta do rendimento relativo das reações de transesterificação. A melhor resposta obtida neste planejamento foi no ensaio 4, onde foi utilizado a maior quantidade de célula imobilizada em farelo de

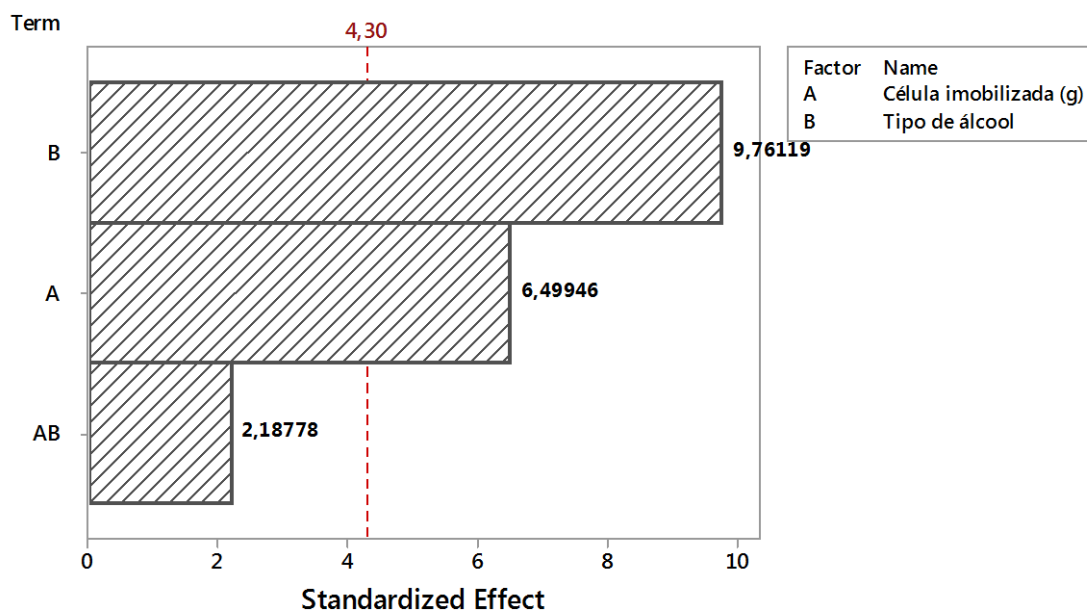
trigo e o álcool com maior quantidade de carbonos em sua cadeia (3 carbonos). Utilizando-se uma quantidade maior de células imobilizada em farelo de trigo aumentou-se a produção de ésteres etílicos produzidos, não chegando ao máximo que as enzimas presentes na membrana poderiam produzir. Em relação ao tipo de álcool utilizado na reação de transesterificação, foi obtido o mesmo resultado observado nas reações de esterificação, onde sínteses com álcoois de cadeias maiores apresentaram maior rendimento.

Tabela 3.11 - Matriz do planejamento fatorial 4 (valores reais e codificados) com as respostas da atividade transesterificação para as células imobilizadas em trigo.

Ensaio	Variáveis		Rendimento relativo (%)
	Imobilizado (g)	Álcool	
1	0,75 (-1)	Metanol (-1)	75,5
2	1,25 (1)	Metanol (-1)	81,9
3	0,75 (-1)	Propanol (1)	86,9
4	1,25 (1)	Propanol (1)	100
5	1,00 (0)	Etanol (0)	86,5
6	1,00 (0)	Etanol (0)	87,2
7	1,00 (0)	Etanol (0)	84,3

Para confirmar os resultados obtidos no planejamento 4 foi construído o Diagrama de Pareto Figura (3.17), onde é possível observar que as duas variáveis apresentaram efeitos principais significativo, porém a variável quantidade de célula imobilizada em farelo de trigo apresentou um efeito menor que o observado no planejamento anterior, mostrando que se aumentasse a quantidade de células fermentadas, o efeito sobre a atividade enzimática iria diminuir. O tipo de álcool utilizado apresentou um efeito principal de 9,76, mostrando uma grande influência sobre o rendimento de ésteres etílicos, e mostrando que a utilização de álcoois de cadeia maior na reação de transesterificação aumenta o poder de atuação da enzima.

Figura 3.17 – Diagrama de Pareto das variáveis manipuladas no planejamento 4 sobre a atividade de transesterificação do fungo *F. verticillioides* ($\alpha = 0,05$).



Fonte: elaborada pelo autor

Através dos planejamentos fatoriais foi possível ver que todas as variáveis analisadas influenciaram a atividade enzimática, porém a quantidade de células imobilizadas, a quantidade e o tipo de álcool utilizados na reação de transesterificação foram as variáveis que apresentaram maior efeito principal, afetando mais a ação da enzima.

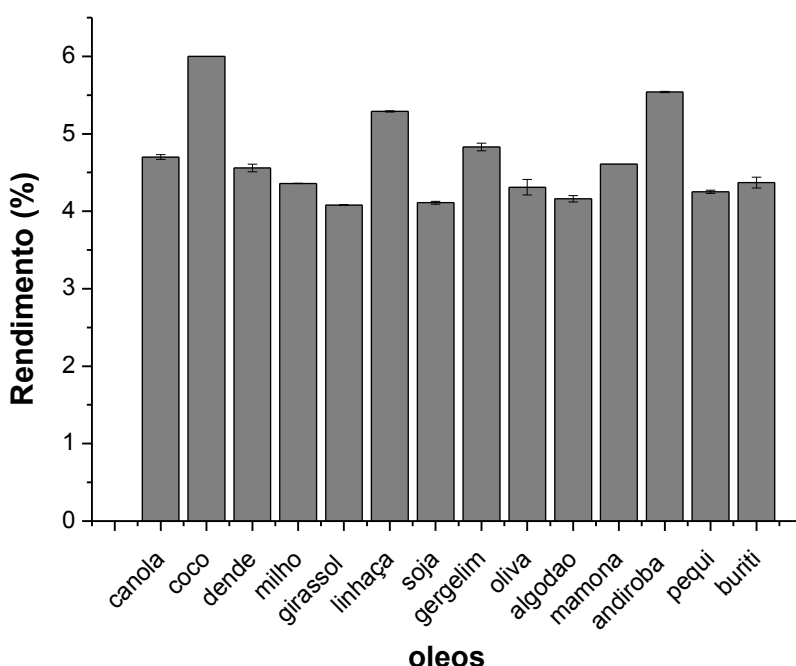
4.4.3 Reações de transesterificação com óleos naturais

Após definir as variáveis que afetam a atividade da enzima ligada a membrana, foram realizadas reações de transesterificação com óleos naturais para verificar se esta lipase apresenta seletividade por algum tipo de óleo neste processo. Foi utilizado etanol novamente devido sua grande produção no Brasil.

A Figura 3.18 apresenta os rendimentos de ésteres etílicos obtidos nas reações, sendo o maior rendimento de 6 %, utilizando-se o óleo de coco, seguido pelo rendimento da reação utilizando-se o óleo de andiroba. A princípio não foi observado nenhuma seletividade pela enzima, uma vez que o óleo de coco e o óleo de andiroba possuem composições bem distintas, porém analisando-se a Tabela A.1, esses óleos apresentam as menores quantidades de ácido linoleico em seus

triglicerídeos, seguido pelo óleo de linhaça que também apresentou um rendimento alto em relação aos óleos utilizados. As reações com os óleos de milho, girassol, soja, algodão e pequi e o azeite de oliva foram as que apresentaram os menores rendimentos e observando a Tabela A.1 esses óleos possuem as maiores quantidades de ácido linoleico.

Figura 3.18 - Rendimento das reações de transesterificação utilizando-se vários óleos naturais e a célula do fungo *F. verticillioides* imobilizada em farelo de trigo.



Fonte: elaborada pelo autor

A lipase ligada à membrana apresenta atividade de transesterificação, porém a produção de ésteres etílicos é baixa, sendo necessárias melhoras na produção desta lipase para aumentar esse rendimento.

4.4.4 Reações de transesterificação com substrato sintético

A reação de transesterificação também foi realizada utilizando-se substratos sintéticos, onde os três ácidos graxos ligados ao glicerol eram iguais. Os triglicerídeos usados foram a trioctanoato de glicerol (tricaprilina) e tripalmitato de glicerol (tripalmitina), produzindo os mesmo ésteres etílicos das reações de

esterificação realizadas no item 4.3.2 deste capítulo, octanoato de etila e palmitato de etila. A Tabela 3.12 mostra que a enzima teve melhor atuação na reação utilizando o substrato de cadeia carbônica maior (16 carbonos), produzindo 11,4 % de palmitato de etila. Na reação com o substrato de cadeia média foi produzido apenas 5 % de octanoato de etila, mostrando uma seletividade por triglicerídeos de ácidos graxos de cadeias grandes, o que não ocorreu nas reações de esterificação, onde foi produzido praticamente a mesma quantidade dos dois ésteres.

Tabela 3.12 - Produção de ésteres etílicos através da reação de Transesterificação.

Triglicerídeo	Rendimento (%)
Trioctanoato	5,00
Tripalmitato	11,4

Comparando as reações utilizando substratos naturais e as reações utilizando substrato sintético, houve uma maior produção de ésteres etílicos quando o substrato sintético foi usado, mostrando que a enzima tem melhor atuação sobre triglicerídeos com cadeias de ácidos graxos iguais.

4.4.5 Reações de transesterificação com óleo de soja pré-usado

A reação de transesterificação também foi realizada com óleo de soja pré-usado para fritar batatas, apresentando um aumento de 44 % no rendimento em relação ao óleo de soja. Este aumento pode ser devido à utilização dos ácidos graxos livres que estão presente em maior quantidade no óleo de soja pré-usado. A lipase utilizada tem uma alta atividade de esterificação podendo utilizar os ácidos graxos livres para a produção de ésteres. Esta característica é uma vantagem em relação à transesterificação alcalina utilizada para a produção de ésteres, onde não é possível o aproveitamento dos ácidos graxos livres. Os óleos de soja utilizados apresentavam acidez de $0,33 \text{ mg KOH} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra antes de ser utilizado para fritar batatas e de $0,5 \text{ mg KOH} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra após a utilização, apresentando a produção de ácidos graxos livres após esse processo.

4.4.6 Reações de transesterificação com auxílio de ultrassom (US)

Em seguida o óleo de soja e o óleo de soja pré-usado foram submetidos à reação de transesterificação empregando a sonda ultrassônica para aumentar o rendimento da reação. A reação de transesterificação com óleo de soja obteve um aumento de 64 % com a utilização da sonda ultrassônica. Já a reação com o óleo de soja pré-usado obteve um aumento de somente 10 %, uma vez que esta reação já ocorre em maiores proporções devido à composição do óleo. O emprego do US resulta na formação de uma mistura mais homogênea e uniforme em micronível, diferente do que provavelmente ocorre quando se utiliza somente a agitação mecânica ou magnética (BRADLEY; ASHOKKUMAR; GRIESER, 2003, JADHAV; GOGATE, 2014). Além disso, o aumento da movimentação das moléculas pode facilitar o acesso do substrato ao sítio ativo das enzimas (SHAH; GUPTA, 2008), o que poderia contribuir para aumentar o rendimento da reação de transesterificação. O uso do ultrassom também pode acelerar a reação de transesterificação (JADHAV; GOGATE, 2014).

5 CONCLUSÃO

Os sais minerais, a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio influenciaram muito produção da lipase, sendo necessário estabelecer protocolos diferentes para a fermentação em estado sólido de acordo com o processo em que a enzima será utilizada. Além disso, a cepa fúngica *F. verticillioides* P24 apresentou uma boa atividade de esterificação, apresentando altas atividades em todos os experimentos.

Os planejamentos fatoriais realizados para as reações de esterificação e transesterificação, mostraram que a enzima ligada à membrana teve maior atividade quando se utiliza substratos de cadeias carbônicas maiores, mostrando que realmente estamos trabalhando com lipase e que esta lipase apresenta características próximas a enzima extracelular, possuindo atuação em uma grande faixa de temperatura e melhor atividade em pH 8.

Outro fator muito importante é o aumento da produção de ésteres etílicos com a utilização de óleo pré-usado, uma vez que dá um fim a este resíduo e a reação alcalina que é a mais utilizada para a produção de biodiesel não consegue fazer uso deste tipo de óleo, produzindo sabão na presença de ácidos graxos livres. O uso do ultrassom também se mostrou uma ferramenta muito importante na produção de ésteres, aumentando o rendimento da reação.

Apesar de não ter sido obtido altos rendimentos, a lipase ligada à membrana do fungo *F. verticillioides*, apresentou rendimentos promissores em todas as reações aplicadas, sendo necessário um estudo mais aprofundado de sua atuação nessas reações para obter rendimentos maiores.

CAPÍTULO IV

Imobilização da Enzima Extracelular em Suportes Inertes

Resumo

O emprego de lipases na indústria de alimento e detergentes já é bem estabelecido, entretanto tem crescido bastante nos últimos anos o interesse por novas aplicações das lipases, impulsionado principalmente, pela procura de produtos aromatizantes e fragrâncias preparadas a partir de fontes naturais. Neste sentido as lipases imobilizadas merecem atenção. A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel utilizando um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, ou através do confinamento em matrizes formada por polímeros de gel ou por meio de uma encapsulação em membrana polimérica. Neste trabalho a lipase do fungo *Fusarium verticillioides*, foi imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos e hidrofílicos através de adsorção física. As enzimas imobilizadas foram empregadas em reações de esterificação e transesterificação. Os suportes hidrofóbicos apresentaram melhor porcentagem de imobilização, sendo o Lew. 105 o que resultou na maior atividade recuperada e o que também apresentou a melhor estabilidade em 35°C e em 50 % de etanol, comparado ao derivado CNBr. Os suportes octil e fenil-sepharose, se mostraram interessantes como formas de purificação da enzima. Portanto o derivado de Lew. 105 foi o derivado ideal para aplicação nos processos de hidrólise, esterificação e transesterificação.

Abstract

The use of lipases in food and detergent industries is well established, however has grown considerably in recent years the interest in new applications of lipases, driven mainly by demand for flavors and fragrances products prepared from natural sources. In this sense the immobilized lipases deserve attention. The immobilization can occur through adsorption or binding of the enzyme to an insoluble material using a multifunctional crosslinking reagent through, or by confinement in matrices composed of polymer gel or by encapsulation in a polymeric membrane. In this work the lipase from fungus *Fusarium vericillioides*, was immobilized in different hydrophobic and hydrophilic media through physical adsorption. The immobilized enzymes were applied in esterification and transesterification reactions. Hydrophobic supports showed better percentage of immobilization. The Lew. 105 resulted in better recovery of activity and it was also that presented the best stability at 35 ° C and 50% ethanol, compared to derivative CNBr. The octyl-sepharose and phenyl supports, proved to be as interesting forms of the enzyme purification. Therefore Lew 105 was support ideal for application in the process of hydrolysis, esterification and transesterification.

1 INTRODUÇÃO

O emprego de lipases na indústria de alimento e detergentes já é bem estabelecido, entretanto cresceu bastante nos últimos anos o interesse por novas aplicações das lipases, impulsionado principalmente, pela procura de produtos aromatizantes e fragrâncias preparadas a partir de fontes naturais. Alguns processos de biotransformação que utilizam enzimas ou células inteiras já foram implementados para produzir o 1-feniletanol, composto utilizado em vários produtos farmacêuticos e produtos de higiene pessoal. Biocatalisadores também tem sido utilizados para a preparação de acetato de laurato, o aroma de coco (SOLARTE et al., 2014).

As lipases livres têm limites para utilização industrial, uma vez que são instáveis e não é possível a recuperação após a sua utilização, encarecendo o processo. As enzimas imobilizadas podem apresentar maior estabilidade em relação às lipases livres e também podem ser reutilizadas, tornando processos, como produção de biodiesel, obtenção de ésteres e modificações de gorduras mais baratos.

As enzimas imobilizadas são definidas como enzimas ou células fisicamente confinadas ou localizadas em uma região determinada do espaço com retenção de suas atividades catalíticas (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006). A técnica de imobilização tem grande importância porque, além de permitir a reutilização de biocatalisadores, também permite uma fácil e eficiente separação destas moléculas do meio reacional, e oferece uma melhor estabilidade à enzima em presença de determinados solventes, inibidores e outros agentes desnaturantes, e estabilidade em faixas mais amplas de pH e temperatura (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006, CORCORAN, 1985, PEREIRA et al. (2015), NYARI et al., 2016).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel utilizando um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, ou através do confinamento em matrizes formada por polímeros de gel ou por meio de uma encapsulação em membrana polimérica (PEREIRA et al., 2015).

A técnica de adsorção é a mais utilizada para imobilização de enzimas, o processo se dá por meio de interações fracas, como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, entre a superfície do suporte e a proteína (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008; TAN et al., 2010). As enzimas também

podem ser imobilizadas através de ligações covalentes irreversíveis, e por meio deste método a enzima não é liberada em condições adversas (TREVAN, 1988).

A imobilização de enzimas em suportes inertes é um processo muito utilizado para facilitar a aplicação de biocatalisadores em processos industriais, tornando possível a sua reutilização e facilitando o processo de retirada do catalisador do meio reacional através de filtração.

A imobilização por meio de adsorção física também pode ser empregada para a purificação de enzimas, uma vez que a lipase pode ser desorvida do suporte com a ajuda de sais e detergentes, sendo um processo simples e menos trabalhoso que os processos convencionais.

Este trabalho visou produzir lipases extracelulares utilizando-se o fungo *F. verticillioides*, por fermentação em estado sólido e imobiliza-las em suportes hidrofóbicos e hidrofílicos através de adsorção física. As enzimas imobilizadas nos diferentes suportes foram empregadas em reações de esterificação e transesterificação.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a imobilização da lipase extracelular produzida pela cepa fúngica *Fusarium verticillioides* P24 em suportes sintéticos e a caracterização dos derivados (enzima-suportes) para aplicação em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação.

2.1 Objetivos Específicos

- Imobilizar a lipase em suportes inertes.
- Analisar a força de dessorção e a estabilidade dos derivados produzidos;
- Caracterização do suporte selecionado para aplicação nas reações;
- Produção de ésteres por meio de reações de esterificação e transesterificação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e a metodologia analítica utilizados para o desenvolvimento do estudo relacionado à imobilização da lipase extracelular do fungo *F. verticillioides* em suportes inertes.

3.1 Microrganismo

A linhagem fúngica *F. verticillioides* P24, previamente isolada de áreas de plantação de cana de açúcar, pertencente à coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UNESP (Campus de São José do Rio Preto-SP) foi utilizada para produzir a lipase extracelular por FES e imobilizar em suportes inertes.

3.2 Meios de cultura

Para a fermentação em estado sólido foram utilizados dois meios de cultura. O primeiro meio foi utilizado para o pré-inóculo em ágar e o segundo para a fermentação em resíduos agrícolas.

3.2.1 Pré-inóculo

Para o crescimento da cepa fúngica foi utilizado o meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al., (2005) (%): 0,1 peptona; 1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 KH_2PO_4 ; 0,05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 CaCl_2 ; 2,5 óleo de canola; 0,4 de emulsificante Triton X-100; 0,5 de solução de elementos traços (2,2 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,1 de H_3BO_3 ; 0,5 de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16 de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,16 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,11 de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5 de EDTA); 3 de agar e pH 6,0.

3.2.2 Solução nutriente

A solução nutriente foi composta de 2 % de óleo de canola, 2 % $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$, 0,05 % MgSO_4 e 0,2 % K_2HPO_4 .

3.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada em embalagens de polipropileno (26,5 cm x 15 cm) contendo 10 g de farelo de trigo lavado. O pré-inóculo foi realizado a partir do cultivo dos fungos em erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL do meio citado no item 3.2.1 e mantido durante 5 dias a 28°C. Para obtenção dos inóculos, 50 mL de água foram adicionados aos frascos de cultivo dos fungos suspendendo os esporos e micélios pela raspagem suave da superfície dos meios de cultivos. Os esporos suspensos foram quantificados ($4,5 \times 10^7$ esporos/g de substrato) e transferidos juntamente com 60 mL da solução nutriente (item 3.2.2) para as embalagens de polipropileno na quantidade necessária para a obtenção de uma umidade de 70 %. A umidade foi obtida a partir da análise de peso seco do substrato. A fermentação foi realizada durante 72 horas a 35°C sem agitação.

A enzima foi extraída com de água destilada e o extrato bruto foi filtrado e centrifugado a 19785 x g durante 15 minutos a 5°C.

3.4 Concentração do extrato enzimático bruto

A concentração do extrato bruto foi realizada por ultrafiltração usando-se sistema QuixStand™ Benchtop da Amersham Bioscience com uma membrana de corte limite de 10 kDa em massa molecular.

3.5 Imobilização por adsorção física

A lipase produzida pelo fungo *F. verticillioides* foi imobilizada em suportes hidrofílicos, sendo utilizados as resinas de troca iônica CM-sepharose, agarose ligada a grupos carboximetil (CM), Q-sepharose, agarose ligada a grupos amina quaternária, DEAE-sepharose, agarose ligada a grupos dietilaminoetil (DEAE), PEI-agarose, agarose ligada a grupos de polietilenoimina (PEI) e Duolite A-568, resina de troca iônica altamente porosa e granular, fracamente básica, que se baseia em um produto de policondensação de fenol-formaldeído de ligação cruzada com grupos funcionais de amina terciária (Duolite).

A enzima também foi imobilizada em suportes hidrofóbicos, utilizando-se Fenil-sepharose, agarose ligada a grupos fenil (Fenil), Octil-sepharose, agarose ligada a

grupos octil (Octil), C18-Sepabeads, matriz polimérica de metacrilato ligado a grupos de octadecil (C18), Lewatit VP OC 1600, matriz polimérica de metacrilato ligado a grupos divinilbenzeno (Lew. 1600) e Lewatit CNP-105, matriz polimérica de metacrilato fracamente ácida (Lew. 105).

A imobilização foi realizada adicionado 10 g de cada adsorvente (hidrofóbicos e de troca iônica) em 100 mL de solução enzimática contendo a enzima dissolvida em tampão fosfato $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0. Foi avaliada a diminuição da quantidade de enzima presente no sobrenadante e a incorporação dela aos suportes de acordo com o item 3.7.1.

3.6 Imobilização covalente em Agarose-brometo de cianogênio (CNBr)

O suporte CNBr foi previamente ativado em solução de HCl pH 2. Em 10 mL de solução enzimática diluída adequadamente em tampão fosfato $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0 foi adicionado 1 g de suporte ativado. A suspensão foi colocada em banho de gelo, com agitação leve durante 1 hora. Em seguida foi adicionado 10 mL de etanolamina $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8 e manteve-se a agitação durante 2 horas. Após a imobilização o derivado foi lavado 3 vezes com água destilada e 1 vez com solução de etanolamina (RODRIGUES et al., 2010).

3.7 Determinação da atividade enzimática

3.7.1 Determinação da atividade hidrolítica dos derivados

Foi estudada a liberação de *p*-nitrofenol (*p*-NP) pela hidrólise de butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) a pH 7,0 e 25°C (Esquema 4.1). A liberação de *p*-NP provoca a coloração do meio tornando possível a leitura espectrofotométrica em $\lambda = 348 \text{ nm}$ (ponto isobéptico). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com agitação e controle de temperatura.

Após a incubação, a reação foi interrompida com acetona/álcool etílico (1:1 v/v) e titulada com KOH 0,5 mol•L⁻¹ padronizado, usando fenolftaleína 0,001% como indicador ácido-base (SOARES et al., 1999). Para cálculo da atividade foi utilizado a seguinte equação:

$$\text{Atividade Hidrolítica (U/g de extrato liofilizado)} = \frac{(V_{\text{KOH amostra}} - V_{\text{KOH controle}}) \times M \times 1000}{m_{\text{amostra}} \times \text{tempo}}$$

Onde:

$V_{\text{KOH amostra}}$: volume de base titulada na amostra; $V_{\text{KOH controle}}$: volume de base titulada no controle; M: molaridade de KOH usada (0,5 mol•L⁻¹); m_{amostra} : massa de sólidos liofilizada (0,25 g) ; Tempo de incubação: 30 min.

A atividade é expressa em U•g⁻¹, que é definida como quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto por grama de proteína, nas condições do ensaio.

3.7.3 Atividade de esterificação

O ensaio padrão de esterificação foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Smaniotto et al. (2014). Adicionou-se 0,25 g de substrato fermentado com o micélio imobilizado ao meio reacional contendo 4,2 g de ácido oleico e 0,7 g de etanol.

A mistura foi incubada durante 40 minutos a 40°C sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, foram retiradas alíquotas (triplicata) de 500 μL e a reação foi interrompida com adição de 20 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona:etanol anidro. Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,035 mol•L⁻¹. As dosagens de atividade lipásica de esterificação foram definidas como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas, determinada por meio da seguinte equação:

$$\text{Atividade de esterificação (U/g de extrato liofilizado)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 1000 \cdot V_t}{t \cdot V_{a.l.m}}$$

Onde:

Va: volume de NaOH gasto na titulação da amostra; Vb: volume de NaOH gasto na titulação do branco; M: molaridade da solução de NaOH padronizada 0,035); Vt: volume reacional total (5,6 mL); t: tempo de reação (40 min); Val: volume da alíquota (0,5 mL); m: massa de sólidos liofilizada (0,25 g).

3.7.4 Atividade de transesterificação

O ensaio padrão de transesterificação foi realizado através da metodologia modificada de Castro-Ochoa et al. (2005), utilizando 4,1 mL de óleo de soja e 1,5 mL álcool com o micélio imobilizado utilizado como catalisador, sob agitação de 150 rpm. As reações foram realizadas a 35°C utilizando n-hexano como solvente da reação na proporção v/v 1:1,5 óleo/n-hexano. O solvente foi evaporado a pressão reduzida. O branco utilizado foi o meio reacional sem a presença de catalizador.

A quantificação dos ésteres etílicos foi realizada por cromatografia gasosa utilizando detector de ionização de chama (GC-FID). As amostras foram centrifugadas e diluídas em hexano e 1 µL foi injetado em um Cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 480 e coluna Agilent Select Biodiesel for FAME, usando o software Totalchrom (Perkin Elmer). A programação térmica foi de 160 a 230°C, mantendo uma taxa de aquecimento de 4°C•min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram iguais a 250°C e 300°C respectivamente, utilizando-se o gás nitrogênio como gás de arraste (split 1:30, pressão cabeça da coluna: 100 kPa).

A curva de calibração foi construída utilizando ésteres linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila e palmitato de etila com pureza acima de 98 % (Sigma-Aldrich). O cálculo de rendimento das reações de sínteses foi realizado segundo proposto por Urioste et al. (2008).

Para o cálculo do rendimento da síntese de biodiesel foi utilizada a Equação A:

$$R (\%) = \frac{M_t}{M_e} \times 100 \quad (\text{Equação A})$$

Onde Me é a massa teórica esperada de ésteres produzidos e Mt é a massa obtida dos ésteres, calculada de acordo com a curva de calibração construídas com os padrões analíticos.

Para o cálculo do Me da Equação A, foi necessário usar a Equação B e a Equação C:

$$Me = \frac{Mo \times MMe}{MMA} \quad (\text{Equação B})$$

$$Mo = Ca \times Mi \quad (\text{Equação C})$$

Onde Mo é a massa inicial dos ácidos graxos presente no óleo, MMA é a massa molecular de cada ácido graxo, MMe é a massa molecular de cada éster correspondente, Ca é a concentração de cada ácido graxo e Mi é a massa inicial de óleo.

Através das Equações B e C, os valores de Me e o Mo de cada ácido graxo foram calculados para a obtenção da massa teórica esperada a partir da quantidade de óleo utilizada, em seguida aplicada na Equação A para o cálculo, em porcentagem, do rendimento da síntese de ésteres. A concentração de cada ácido graxo presente no óleo foi obtida de acordo com a metodologia proposta por Porto et al. (2015).

3.8 Proteína total

A determinação dos teores de proteínas totais da solução enzimática bruta e do sobrenadante após a imobilização enzimática foram realizadas através do método de Bradford (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

3.9 Estudos da força de ligação por adsorção física

A enzima adsorvida aos suportes hidrofóbicos foi desorvida incubando-se 1 g do derivado em 10 mL de tampão fosfato 10 mmol•L⁻¹ pH 7,0. Foi adicionado a cada suspensão concentrações crescentes de surfactante TRITON X-100 quando utilizado os suportes hidrofóbicos e concentrações crescentes de NaCl quando utilizados os suportes hidrofílicos. Para cada concentração de surfactante ou de NaCl foi analisada a atividade do sobrenadante e da suspensão de acordo com o

item 3.4.1, até que toda a enzima fosse liberada para o sobrenadante (atividade do sobrenadante igual da suspensão).

3.10 Eletroforese

Eletroforese SDS-PAGE foi realizado de acordo com Laemmli (1970) utilizando um gel de poliacrilamida a 13 % com 0,1 % de SDS (dodecil sulfato de sódio). A detecção de lipases foi realizada de acordo com FUCIÑOS et al. (2005) com uma solução corante contendo α - e β -naftil acetato na presença de fast blue. Um kit (SIGMA) padrão de baixa massa molar de proteínas foi utilizado: Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Glutâmico Desidrogenase (55 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (36 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), Inibidor de Tripsina (20 kDa), α -lactoalbumina (14.2 kDa). Para detecção de outras proteínas foi utilizada solução corante de prata (MERRIL; SWITZER; Van KEUREN, 1979).

3.11 Estabilidade dos derivados em temperatura aparente e em solvente

Para verificar a estabilidade do derivado à 35°C (temperatura aparente), 1 g de cada derivado foi suspenso em 10 mL de tampão de fosfato 10 mmol·L⁻¹ pH 7,0 e em diferentes tempos foram extraídas alíquotas de 200 μ l das suspensões. Para verificar a estabilidade do derivado em solvente, novamente 1 g de cada derivado foi suspenso em 10 mL de tampão de fosfato 10 mmol·L⁻¹ pH 7,0, porém contendo 50 % de etanol a temperatura ambiente. As atividades das suspensões foram medidas no tempo zero e em diferentes tempos durante 6 horas utilizando-se a metodologia descrita e 3.4.1.

3.12 Caracterização do suporte inerte Lew. 105

3.12.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR)

Para verificar a imobilização da enzima ao suporte Lew. 105 utilizou-se um espectrofotômetro modelo Spectrum Two – Perkin Elmer®, que consiste em um sistema ATR (Reflectância Atenuada Total) que opera medindo as mudanças que

ocorrem em um feixe de radiação infravermelha totalmente refletida em uma amostra sobre a superfície de um cristal opticamente denso com um elevado índice de refração, geralmente um diamante. As análises foram realizadas com o suporte Lew. 105 e como o derivado Lew. 105-enzima.

3.12.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica do suporte Lew. 105 e do derivado Lew. 105-Enzima foi realizada por TGA (Análise Termogravimétrica), a fim de verificar a decomposição do suporte em relação à temperatura. Foi utilizada uma balança termogravimétrica, modelo TG 4.000 – Perkin Elmer®. Amostras de aproximadamente 10 mg foram utilizadas para análise, em panela de cerâmica, com uma taxa de aquecimento de $15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio ($20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) em uma faixa de temperatura de 30 a 750°C .

3.12.3 Termogravimetria Derivada (DTG)

Para determinação e diferenciação da perda de massa entre o Lew. 105 e o derivado Lew. 105-Enzima foi realizada a primeira derivada a partir do termograma da análise termogravimétrica. Os resultados foram comparados quanto aos eventos térmicos de decomposição de cada um dos polímeros.

3.12.4 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As variações de entalpia do suporte Lew. 105 e do derivado Lew. 105-Enzima foram realizadas por DSC (Calorimetria Diferencial Exploratória), a fim de verificar eventos térmicos de entalpia na estrutura do suporte e do derivado com o aumento da temperatura. Para a análise, foi utilizado um DSC, modelo DSC 8.000 – Perkin Elmer®. Amostras de aproximadamente 3,0 mg foram utilizadas para análise, em panela de alumínio, com uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio ($20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e uma faixa de temperatura de 30 a 200°C .

3.12.5 Área superficial total (BET)

As medidas das áreas superficiais do suporte Lew. 105 e do derivado Lew. 105-Enzima foram determinadas a partir da isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K (imerso em nitrogênio líquido) por um analisador de área superficial modelo Gemini VII 2390p – Micrometrics®, que consiste na medida da área superficial pela dosagem de diferentes pressões de gás sob a amostra, no qual o gás adsorve sobre a superfície da amostra, causando uma diminuição na pressão total. O método BET (Brunauer-Emmet-Teller) é utilizado para determinar a área superficial total. Amostras de aproximadamente 100 mg foram aquecidas a 90°C por 2 hora antes da análise para retirar qualquer vestígio de umidade que possa interferir nos resultados.

3.13 Produção de ésteres etílicos

Para a produção de ésteres etílicos foi utilizada a metodologia proposta por Fernández-Lorente et al. (2011) com algumas modificações. As reações de esterificação foram realizadas em um sistema composto de 4,5 mL de *n*-hexano, 0,1 mL de etanol e 100 mmol•L⁻¹ de ácido caprílico (ácido octanóico) ou ácido palmítico (ácido hexadecanóico). As reações de transesterificação foram realizadas em sistema composto de 4,5 mL de *n*-hexano, 0,3 mL de etanol e 100 mmol•L⁻¹ de Tricaprilina (trioctanoato de glicerol) ou tripalmitina (tripalmitato de glicerol). As misturas foram pré-incubadas a 35°C durante 30 minutos em reatores de 20 mL, e em seguida 0,3 g de catalisador foi adicionado em cada reator para iniciar a reação, com agitação de 150 rpm.

A quantificação dos ésteres etílicos foi realizada de acordo com a metodologia utilizada no item 3.7.4

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados da imobilização da lipase extracelular produzida por meio da fermentação em estado sólido do fungo *F. verticillioides* em suportes inertes. Os itens estão apresentando os dados da imobilização da lipase em suportes hidrofílicos e hidrofóbicos e a caracterização dos derivados produzidos quanto a estabilidade em 35°C e em solução de etanol 50 %. O melhor derivado produzido foi caracterizado e aplicado em reações de esterificação e transesterificação.

4.1 Adsorção física e estudo da força de adsorção dos derivados

Para a imobilização das lipases em suportes inertes, o extrato bruto foi concentrado 10 vezes em um sistema de ultrafiltração e uma alíquota do extrato concentrado foi diluída em tampão fosfato 10 mmol•L⁻¹ pH 7 e adicionados os suportes na proporção 1:10 suporte/extrato enzimático. As misturas foram mantidas em agitação e de tempos em tempos alíquotas foram retiradas para a verificação da atividade enzimática e a quantidade de proteínas presentes no sobrenadante de acordo com o item 3.7.1 e 3.8 respectivamente. Observando a Tabela 4.1, a maioria dos suportes precisou de 24 horas para imobilizar o máximo possível de lipases, com exceção dos suportes Q-sepharose e Lew. 105 que imobilizaram a lipase em 4 e 5 horas, respectivamente. Os suportes hidrofóbicos apresentaram melhor porcentagem de imobilização, com exceção do C18. Como a maioria das lipases apresenta uma “tampa” no sítio ativo com características hidrofóbicas era esperado que estes suportes apresentassem uma maior porcentagem de absorção de lipases, já que há outras proteínas no meio que poderiam influenciar de maneira negativa na adsorção de lipases por suportes hidrofílicos com características iônicas. Entretanto, a literatura sugere que a adsorção da lipase a suportes hidrofóbicos pode ser acionada por razões mais complexas que a simples hidrofobicidade do suporte. É esperado que a adsorção de lipases em suportes mais hidrofóbicos seja maior, porém em alguns casos a utilização de suportes moderadamente hidrofóbicos permite uma maior adsorção de algumas lipase (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008), como foi observado com os suportes Fenil e C18 neste trabalho.

Os suportes hidrofílicos foram utilizados para uma pré-purificação do extrato bruto enzimático e para ser utilizado em reações de hidrólise. Entre os suportes hidrofílicos o CM (resina catiônica) apresentou a maior porcentagem de rendimento de imobilização, em relação às outras resinas utilizadas (resinas aniônicas), entretanto a atividade recuperada foi baixa, e também houve uma alta imobilização das outras proteínas no meio. Isto também ocorreu com o suporte Q-sepharose, que é uma resina aniônica, mostrando que íons positivos ou negativos não tiveram muita influencia sobre a imobilização. O suporte PEI apresentou a maior atividade recuperada, 31 % da atividade inicial, porém também imobilizou outras proteínas. O baixo valor da atividade recuperada pode ser devido a posição que a enzima foi imobilizada ao suporte, deixando o sítio ativo menos exposto para a reação.

Entre os suportes hidrofóbicos, o Octil apresentou menor rendimento de imobilização que o Fenil, isto se deve a maior interação da parte apolar da enzima com o suporte, além do fato do Octil poder interagir mais com as outras proteínas presentes no meio.

Apesar da alta porcentagem de imobilização por suportes hidrofóbicos, com exceção do Lew. 105, quase não há atividade recuperada nos suportes. Porém esta falta de atividade pode estar ligada ao meio reacional da hidrólise.

Tabela 4.1 - Dados de imobilização e desorção da lipase em suportes inertes.

Suportes	Tempo de imob. (horas)	Rendimento de imob. (%)	Proteínas imob. (%)	Atividade recup. (%)	Dessorção mM de NaCl
Hidrofílicos					
Q-sepharose	4	71,9 ± 3,8	79,0	12,4 ± 1,9	200
PEI	24	78,1 ± 1,3	90,0	31,4 ± 3,5	300
DEAE	24	60,1 ± 0,5	92,6	16,8 ± 1,4	100
Duolite	24	76,4 ± 4,8	96,0	2,01 ± 0,1	ND
CM	24	81,0 ± 4,2	84,0	8,30 ± 0,4	700
Hidrofóbicos					% triton X 100
Octil	24	89,8 ± 2,6	50,0	4,70 ± 1,4	0,8
Fenil	24	98,0 ± 1,4	63,0	ND	0,8
C18	24	74,3 ± 1,5	86,0	ND	0,4
Lew. 1600	24	93,2 ± 3,3	88,0	ND	ND
Lew. 105	5	97,6 ± 4,0	100	21,3 ± 3,8	ND

ND: não determinado pelo método utilizado.

Após as imobilizações, as enzimas foram dessorvidas dos suportes para verificar a força de ligação por adsorção física, onde foi utilizado NaCl para dessorver as proteínas de suportes hidrofílicos e triton x 100 para dessorver de suportes hidrofóbicos.

Para os suportes catiônicos, o DEAE apresentou a menor força de adsorção física, sendo necessário somente 100 mmol•L⁻¹ de NaCl para dessorver as enzimas, seguido pelo Q-sepharose e PEI, sendo necessário 200 e 300 mmol•L⁻¹ de NaCl respectivamente. A enzima não se dessorveu do suporte Duolite. Já entre os suportes hidrofóbicos o suporte C18 apresentou menor força de adsorção física, sendo necessário somente 0,4 % de triton x 100 para dessorver a enzima. O Octil e o Fenil tiveram a mesma força de adsorção necessitando de 0,8 % de surfactante para dessorver a lipase. Não foi possível dessorver a enzima dos suportes Lew. 1600 e 105.

Alguns suportes além de adsorverem lipases, também adsorveram outros componentes presentes no extrato bruto, como pode ser observado na Figura 4.1. O extrato bruto apresentou uma cor marrom clara, devido ao trigo e aos componentes

utilizados na fermentação. Os únicos sobrenadantes que continuam apresentando a mesma cor após o processo de imobilização são os extratos referentes aos suportes Octil, Fenil e CM. Pela Tabela 4.1 já era possível observar que estes três suportes apresentaram uma alta porcentagem de imobilização de lipase, porém uma quantidade de proteínas imobilizadas baixa. Nas resinas aniônicas é possível observar que os suportes obtiveram a cor do extrato bruto imobilizando os componentes que davam cor ao extrato, assim como nas resinas hidrofóbicas Lew. 105 e 1600.

Figura 4.1 - Sobrenadante e suspensão enzimática após o processo de imobilização.

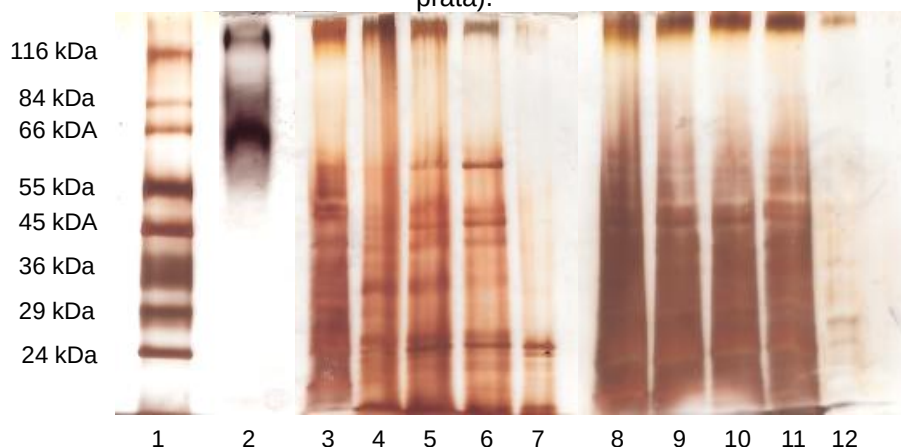


Fonte: elaborada pelo autor

Para confirmar os resultados obtidos foi realizado uma eletroforese do sobrenadante após o processo de imobilização para verificar os componentes que foram imobilizados, juntamente foi realizado um zimograma de hidrólise para verificar a massa molecular da lipase (Figura 4.2). Pelo zimograma é possível observar a presença de 2 enzimas com atividade hidrolítica sobre o substrato utilizado, sendo a massa moleculares delas de aproximadamente 116 e 66 kDa, porém não é possível afirmar que as duas enzimas são lipases porque esta metodologia também identifica esterases. Como discutido anteriormente a maioria dos suportes absorveram muitos dos componentes presentes no extrato bruto, sendo os suportes Duolite e Lew. 105 os suportes que mais absorveram estes componentes, portanto esses suportes não podem ser utilizados para pré-purificar a enzima. Entretanto o Octil e o Fenil não absorvem estes componentes, tornando possível a obtenção de um extrato mais limpo após a dessorção da lipase com triton

x 100. Todos os suportes imobilizaram as duas enzimas com atividade hidrolítica presentes no zimograma.

Figura 4.2 - SDS-PAGE eletroforese dos sobrenadantes após imobilização. 1: Wide – molecular mass marks submetida à coloração com prata. 2: Zimograma (poliacrilamida 13%) corado com corante específico α - β -naphthyl na presença de fast blue. 3: CM, 4: Q-sepharose, 5: DEAE, 6: PEI, 7: Duolite, 8: Octil, 9: Fenil, 10: C18, 11: Lew. 1600, 12: Lew. 105, (todos submetidos a coloração com prata).

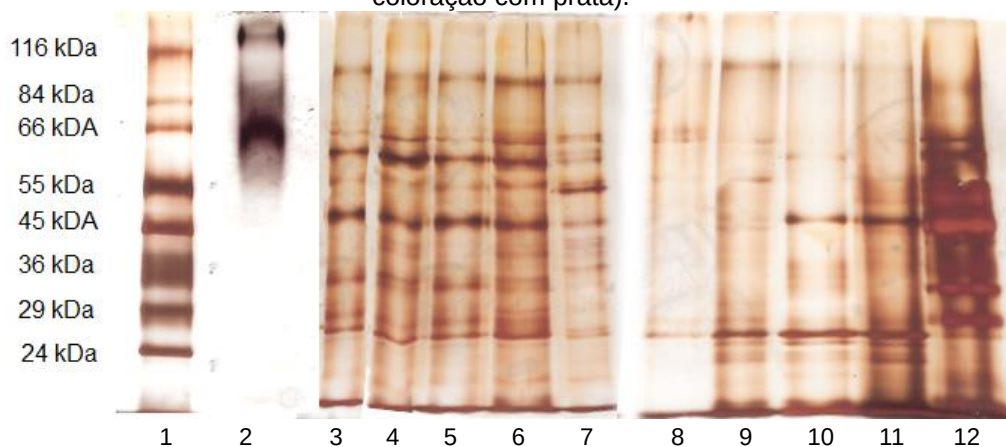


Fonte: elaborada pelo autor

Também foi realizada a eletroforese do sobrenadante após a dessorção da lipase com as soluções de NaCl e triton x 100 para verificar se a lipase foi realmente dessorvida do suporte (Figura 4.3). Todas as amostras foram dialisadas previamente em tampão fosfato $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7 para minimizar os efeitos do NaCl e do triton x 100 sobre a eletroforese. Foi possível observar que a enzima de massa molecular próximo a 116 kDa não se dessorveu de nenhum dos suportes utilizados, entretanto a enzima com massa molecular próximo a 66 kDa foi dessorvida de todos suportes hidrofílicos, inclusive o suporte Duolite que não apresentou atividade após a adição da solução de NaCl $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, e dos suportes Fenil e Octil (hidrofóbicos), como foi mostrado pela Tabela 4.1. Esta enzima também parece ser dessorvida do suporte Lew. 105, utilizando-se 1 % de triton x 100, além de ter sido dessorvido grande parte das proteínas que foram imobilizadas juntamente com a lipase.

Figura 4.3 - SDS-PAGE eletroforese dos sobrenadantes após a dessorção da lipase dos suportes.

1: Wide – molecular mass marks submetida à coloração com prata. 2: Zimograma (poliacrilamida 15%) corado com corante específico α - β -naphtyl na presença de fast blue. 3: CM, 4: Q-sepharose, 5: DEAE, 6: PEI, 7: Duolite, 8: Octil, 9: Fenil, 10: C18, 11: Lew. 1600, 12: Lew. 105 (todos submetidos a coloração com prata).

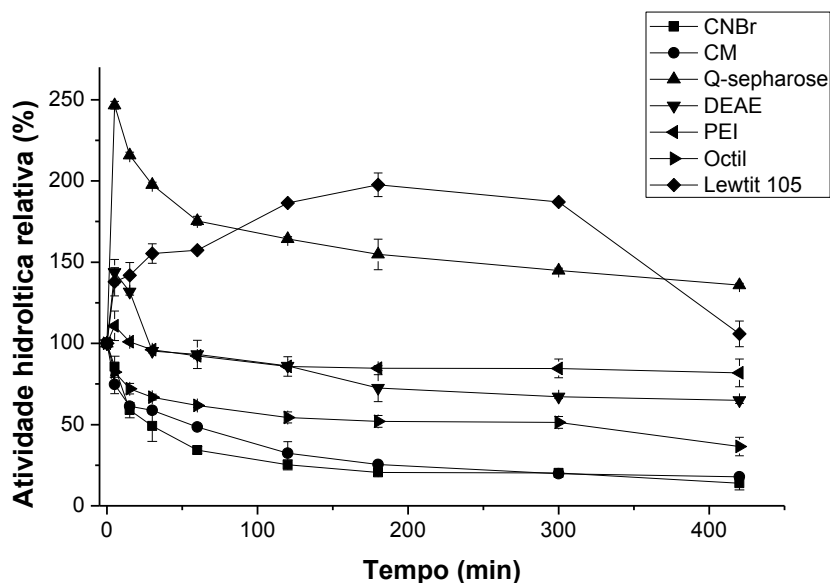


Fonte: elaborada pelo autor

4.2 Estabilidade dos derivados em temperatura aparente e em solvente

Após a imobilização, os derivados que apresentaram atividade recuperada foram submetidos à avaliação da estabilidade na temperatura aparente da lipase (35°C) durante 7 horas e comparados à enzima imobilizada em CNBr, uma vez que este suporte se liga a enzima covalentemente pelo amino terminal, representando a forma nativa da enzima na forma imobilizada (Figura 4.4). A atividade recuperada de cada derivado foi utilizada como 100 % para calcular as atividades relativas de cada alíquota retirada durante o experimento. O derivado CNBr não foi estável, apresentando metade de sua atividade após 30 minutos mantido a 35°C. O derivado de CM se apresentou um pouco instável, perdendo cerca de 50 % de sua atividade na primeira hora de experimento. O derivado de Q-sepharose apresentou uma ativação de 250 % de sua atividade nos primeiros 5 minutos de experimento, seguida do declínio de sua atividade até permanece com 50 % a mais de sua atividade inicial, mantendo esta atividade até o final das 7 horas. Já o derivado de Lew. 105 apresentou uma ativação mais atenuada na primeira hora, chegando a 100 % de ativação após 3 horas de experimento, voltando a cair após 5 horas. Apesar destas ativações, esses dois derivados se mantiveram estáveis durante o decorrer do experimento. Os demais derivados se mantiveram estáveis grande parte das 7 horas, porém suas atividades relativas foram menores que 100 %

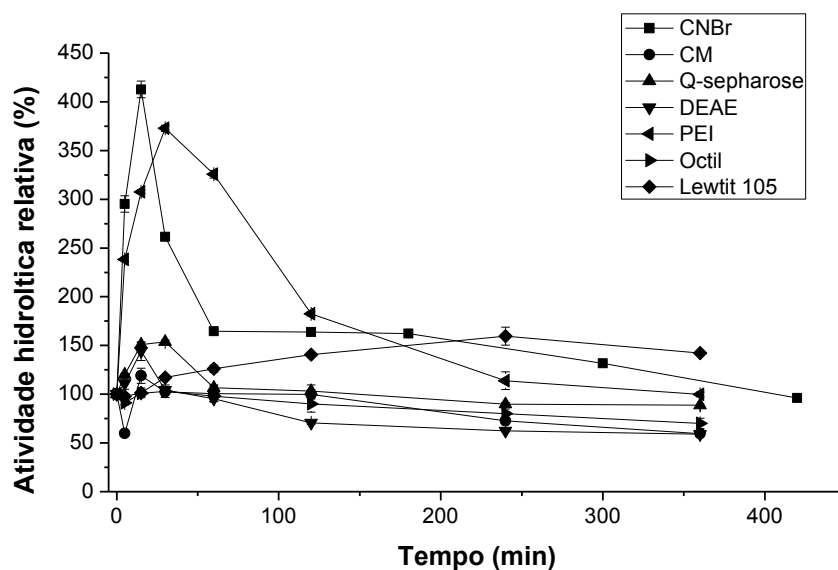
Figura 4.4 - Efeito da temperatura aparente (35°C) sobre a estabilidade dos derivados de lipase.



Fonte: elaborada pelo autor

Também foi verificado o efeito do etanol a 50 % sobre os derivados enzimáticos, durante 6 horas, comparando-se com o derivado CNBr (Figura 4.5). A atividade do derivado CNBr apresentou um aumento de 310 % após os primeiros 5 minutos de experimento, esse efeito pode ocorrer devido a mudança da conformação da “tampa” do sítio ativo em solventes orgânicos. Após 3 horas o derivado manteve 160 % de sua atividade, apresentando uma boa estabilidade até o término do período de 6 horas. A atividade do derivado PEI, teve comportamento parecido com o derivado CNBr, sofrendo uma ativação de 270 % nos primeiros minutos, porém após 6 horas suas atividades permaneceram em cerca de 100 %, se mostrando o derivado mais instável. Já o derivado Lew. 105 manteve sua atividade estável durante todo o experimento e sempre acima da atividade inicial, mostrando um efeito positivo do etanol sobre este derivado hidrófobo. Os demais derivados se mostraram estáveis durante as 6 horas, apresentando atividades em torno de 100 %.

Figura 4.5 - Efeito de etanol 50 % sobre a estabilidade dos derivados de lipase a temperatura ambiente.



Fonte: elaborada pelo autor

Catalisadores imobilizados são muito estáveis sobre condições experimentais diferentes (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008), e com exceção do derivado de CM mantido a 35°C, todos os derivados utilizados se apresentam estáveis na temperatura aparente da lipase do fungo P24 e em etanol 50%.

O derivado Lew. 105 apresentou a melhor estabilidade na temperatura aparente e em solução 50 % de etanol. Como a lipase também não se desorveu facilmente deste suporte, este foi selecionado para testar a enzima imobilizada nas reações de hidrólise, esterificação e transesterificação.

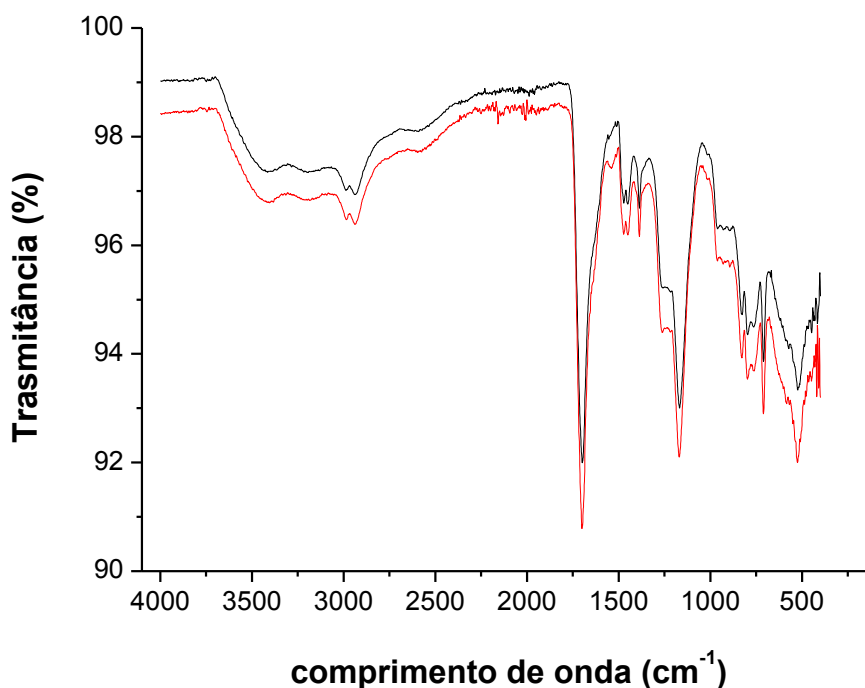
4.3 Caracterização do suporte Lew. 105

Para caracterizar o suporte Lew. 105 e comparar ao derivado foi realizado as análises de FTIR-ATR, TGA, DSC e BET. A Figura 4.6 apresenta o infravermelho do suporte Lew. 105 e seu derivado, mostrando que não houve mudanças nas transmitâncias, apresentando as mesmas bandas de absorção nas duas amostras. Os espectros apresentaram as bandas características do polimetacrilato, polímero base para produção desse suporte, sendo possível observar a banda de absorção em 1720 cm^{-1} , característica da carbonila presente em ésteres, em 1150 cm^{-1} , que

corresponde a deformação assimétrica de C-O-C, em 2930 cm^{-1} , deformação simétrica de $-\text{CH}_2$ e em 1160 cm^{-1} (deformação axial assimétrica de $-\text{C}-\text{C}=\text{O}$).



Figura 4.6 - Espectros de infravermelho do suporte Lew. 105 (preto) e seu derivado (vermelho).



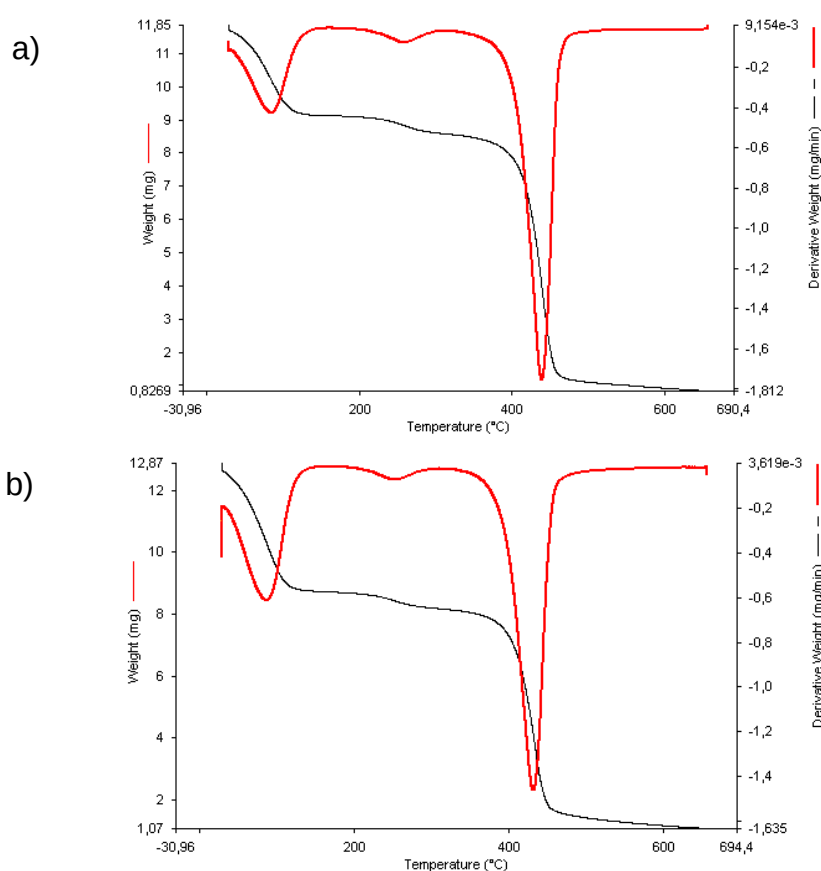
Fonte: elaborada pelo autor

A quantidade de enzima imobilizada no suporte é muito baixa e isto pode ter colaborado para que os espectros de infravermelho não apresentassem mudanças nas absorvâncias observadas para o suporte e para o derivado.

Em seguida foi realizado a análise do TGA e da sua derivada, para comparar a estabilidade do suporte e de seu derivado na faixa de temperatura de 30 a 650°C. A Figura 4.7 apresenta os termogramas do suporte (a) e do derivado (b), mostrando que não houve diferença entre as análises, ocorrendo a mesma sequência de perda de massa. Observando os termogramas ocorrem três estágios, o primeiro entre 30 e 100°C é referente à perda de água que está ligada ao polímero por ligações de hidrogênio. O suporte Lew. 105 perdeu 25 % de massa e o derivado perdeu 30 %, mostrando que o derivado é mais hidrofílico, por estar ligado a proteínas. No segundo estágio de 200 a 300°C, houve uma pequena perda de massa nas duas amostras, sendo a perda de 3,3 % do suporte Lew. 105 e 7,4 % do derivado e no

terceiro estágio, de 350 a 650°C, houve uma perda de massa de 64,8 % em relação a massa inicial do suporte e 54 % em relação a massa inicial do derivado, representando a degradação do material. A quantidade de resíduo restante na análise com o derivado foi maior que a quantidade obtida a partir do suporte, devido a maior quantidade de derivado utilizado no experimento, portanto a porcentagem de perda de massa em relação à massa inicial do derivado é menor, não tendo ligação com nenhuma processos químicos.

Figura 4.7 - Curvas da perda de massa em função da temperatura (TGA) e derivada da perda de massa (DTG) do suporte Lew. 105 (a) e de seu derivado (b) realizado em atmosfera de N₂.

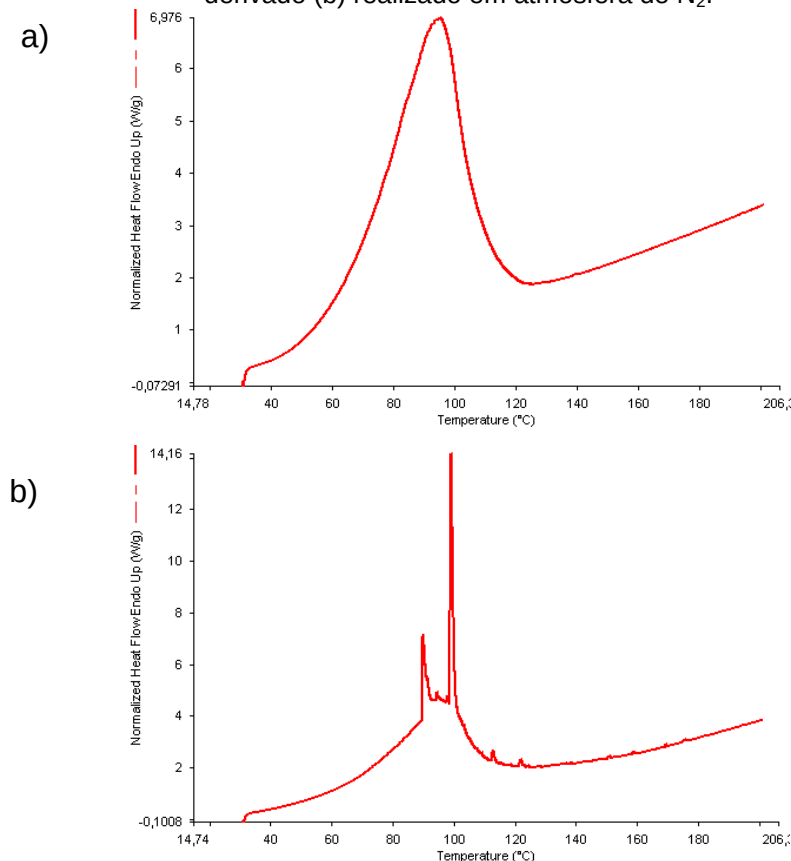


Fonte: elaborada pelo autor

Também foi realizado o DSC do suporte e do derivado para verificar fenômenos endotérmicos e exotérmicos durante o aquecimento das amostras. A Figura 4.8 mostra os termogramas do suporte (a) e do derivado (b), onde ocorreram fenômenos endotérmicos. O termograma do suporte apresenta um pico endotérmico de 30 a 120°C que corresponde a evaporação da água ligada ao polímero por ligações de hidrogênio, como ocorreu na mesma faixa de temperatura no termograma de TGA,

entretanto o termograma de DSC do derivado apresentou quatro picos endotérmicos na mesma faixa de temperatura. Estes picos mostram que além da evaporação da água, ocorrem processos endotérmicos com as proteínas ligadas ao suporte.

Figura 4.8 - Variação de energia em relação à temperatura (DSC) do suporte Lew. 105 (a) e do seu derivado (b) realizado em atmosfera de N₂.



Fonte: elaborada pelo autor

Após as análises térmicas, o suporte e o derivado foram analisados quanto às áreas superficiais a fim de avaliar a presença de proteínas na superfície do suporte. O método de BET (Brunauer-Emmet-Teller) foi empregado em atmosfera de nitrogênio a 77 K. A Tabela 4.2 apresenta os valores obtidos da área superficial total das amostras e a quantidade gás absorvida.

Tabela 4.2 - Valores de área superficial total e da quantidade de gás adsorvida a partir da técnica BET do suporte Lew. 105 e de seu derivado.

Amostra	Área superficial (m²•g⁻¹)	Quantidade de gás adsorvida (cm³•g⁻¹)
Lew. 105	51,2	11,7
Derivado de Lew. 105	55,0	12,6

A partir desses dados é possível observar que a absorção de proteínas na superfície do suporte aumentou a área superficial e também a quantidade de gás absorvida pelo suporte, mostrando que a enzima foi imobilizada no suporte, mesmo não sendo possível identificar suas ligações por infravermelho e TGA.

4.4 Reações empregando a enzima imobilizada no suporte Lew. 105

Após a imobilização da enzima e a caracterização do suporte, o derivado Lew. 105 foi empregado nas reações de hidrólise, esterificação e transesterificação.

Primeiro foi realizado a reação de hidrólise utilizando azeite de oliva para verificar se o derivado apresentava atividade hidrolítica frente ao substrato natural. O derivado Lew. 105 apresentou uma atividade hidrolítica de 1,26 U•g⁻¹ de derivado utilizado na reação, comparando à atividade da célula imobilizada em farelo de trigo, 4 U•g⁻¹, foi uma atividade baixa. Entretanto o suporte Lew. 105 apresenta características hidrofóbicas, e a reação de hidrólise ocorre em meio com água podendo afetar a atividade do derivado.

Em seguida o derivado foi empregado na reação de esterificação utilizando-se ácido oleico e etanol como substratos. O derivado Lew. 105 apresentou uma atividade de esterificação de 12 U•g⁻¹ de derivado utilizado na reação. Foi realizada uma reação com a enzima extracelular liofilizada para comparar a atividade, e foi observada uma atividade 16 U•g⁻¹ de extrato liofilizado, mostrando que foi recuperado 75 % da atividade de esterificação com a enzima extracelular imobilizada.

Após verificar que o derivado Lew. 105 apresenta atividade de hidrólise e de esterificação, ele foi aplicado nas reações de esterificação e transesterificação para verificar a capacidade de converter ácidos graxos e triglicerídeos em ésteres etílicos. Nas reações de esterificação foram utilizados os ácidos octanóico e palmítico, e nas

reações de transesterificação foram utilizados os triglicerídeos trioctanoato e tripalmitina, mesmos substratos utilizados nas reações de esterificação e transesterificação do Capítulo III (células imobilizadas em farelo de trigo).

A Tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos nas reações, onde é possível observar que o derivado Lew. 105 conseguiu converter os substratos em ésteres etílicos. Os resultados obtidos na esterificação foram um pouco menores que os resultados obtidos na esterificação utilizando-se a célula imobilizada em farelo de trigo (Tabela 3.7), entretanto, apesar do derivado ter uma baixa atividade de esterificação, apresentou resultados próximos a célula imobilizada, que possui uma alta atividade de esterificação ($97 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$). Já na reação de transesterificação, os rendimentos foram próximos aos rendimentos obtidos utilizando-se a célula imobilizada em farelo de trigo (Tabela 3.10), mostrando que o derivado Lew. 105 apresenta potencial para transesterificação.

Tabela 4.3 - Produção de ésteres etílicos utilizando-se o derivado Lew. 105 como catalisador.

Substrato da reação	Rendimento (%)
Ácido octanóico	5,97
Ácido palmítico	9,20
Trioctanoato	7,60
Tripalmitina	10,7

Esses catalizadores foram carregados com 1,5 mg de proteínas/g de suporte, mostrando que uma carga maior de lipase sobre este suporte pode levar a uma maior produção de ésteres nas reações de sínteses.

5 CONCLUSÃO

Os suportes hidrofóbicos apresentaram melhor porcentagem de imobilização, sendo o Lew. 105 o que resultou na maior atividade recuperada, além de a enzima não ter sido desorvida do suporte com detergente. Os suportes octil e fenil-sepharose, se mostraram bons para imobilizar principalmente a lipase e desorvendo a enzima com detergente, purificando parcialmente a enzima. O derivado Lew. 105 também apresentou a melhor estabilidade em 35°C e em 50 % de etanol, comparado ao derivado CNBr, não perdendo a atividade após o término dos experimentos. Portanto o derivado de Lew. 105 foi o derivado ideal para aplicação nos processos de hidrólise, esterificação e transesterificação.

O derivado Lew. 105 apresentou baixas atividades lipolíticas, não obtendo rendimentos altos nas reações onde foi aplicado, porém estes rendimentos foram próximos aos rendimentos observados nas reações utilizando-se a célula inteira imobilizada, mostrando um grande potencial para a utilização das enzimas extracelulares, carregando o suporte com uma maior quantidade de lipase.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. H. et al. Improvement of fungal lipids esterification process by bacterial lipase for biodiesel synthesis. **Fuel**, v. 160, p. 196-204, Nov. 2015.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52-67, Nov. 2015.
- AMORIM, R. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 35-39, Aug. 2003.
- BABICZ, I. et al. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 1, p. 4-6, Jan. 2010.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, May 1996.
- BAYRAMOGLU, G. et al. Immobilized lipase on micro-porous biosilica for enzymatic transesterification of algal oil. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 95, p. 12-21, Mar. 2015.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADLEY, M.; ASHOKKUMAR, M.; GRIESER, F. Sonochemical production of fluorescent and phosphorescent latex particles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 2, p. 525-529, Jan. 2003.
- BREIVIK, H.; HARALDSSON, G. G.; KRISTINSSON, B. Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 11, p. 1425-1429, Nov. 1997.
- CARVALHO, A. K. F. et al. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 287-294, May 2015.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. da. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

CASTRO-OCHOA, L. D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 6, p. 648-654, Nov. 2005.

CHEIRSILP, B.; KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 1, p. 71-80, July 2007.

CONIGLIO, L. et al. Combustion chemical kinetics of biodiesel and related compounds (methyl and ethyl esters): experiments and modeling - advances and future refinements. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 39, n. 4, p. 340-382, Aug. 2013.

CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. (Ed.). **Topics in enzyme and fermentation biotechnology**. Chichester: Ellis Horwood, 1985. v. 10, p. 12-50.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAYMA, G. et al. Experimental and kinetic modeling of methyl octanoate oxidation in an opposed-flow diffusion flame and a jet-stirred reactor. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 33, n. 1, p. 1037-1043, 2011.

DOBREV, G. et al. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 77-82, 2015.

ERICSSON, D. J. et al. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 109-119, Feb. 2008.

FERNANDES, M. L. M. et al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8-13, Jan. 2007.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061-1067, Oct. 2008.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Release of omega-3 fatty acids by the hydrolysis of fish oil catalyzed by lipases immobilized on hydrophobic supports. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 8, p. 1173-1178, Feb. 2011.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Modulation of the selectivity of immobilized lipases by chemical and physical modifications: release of omega-3 fatty acids from fish oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 1, p. 97-102, July 2012.

FERRAREZI, A. L. et al. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 106-113, Sept. 2014.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 769-777, Mar. 2007.

FORESTI, M. L. et al. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1/2, p. 62-70, July 2007.

FUCIÑOS, P. et al. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: partial purification and preliminary biochemical characterisation. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 233-241, 2005.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 2-12, Apr. 2009.

GODOY, C. A. et al. Changes on enantioselectivity of a genetically modified thermophilic lipase by site-directed oriented immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 121-127, Mar. 2013.

GULDHE, A. et al. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. **Renewable Energy**, v. 85, p. 1002-1010, Jan. 2016.

GUPTA, V. et al. Recognition of active and inactive catalytic triads: a template based approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 317-323, Apr. 2010.

HAMA, S. et al. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 328-333, Apr. 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, June 2006.

HE, Q. et al. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, p. 41-46, Jan. 2008.

HOLCAPEK, M. et al. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1010, p. 195-215, 2003.

HUNG, T.-C. et al. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, n. 1/2, p. 69-78, Nov. 2003.

JADHAV, S. H.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted enzymatic conversion of non edible oil to methyl esters. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 4, p. 1374-1381, 2014.

JAN, A.-H. et al. Elucidation of a key position for acyltransfer activity in *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase (CpLIP2) and in *Pseudozyma antarctica* lipase A (CAL-A) by rational design. **Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 2, p. 187-194, Feb. 2016.

KANDA, L. R.; VOLL, F. A. P.; CORAZZA, M. L. LLE for the systems ethyl palmitate (palmitic acid)(1)+ethanol(2)+glycerol (water)(3). **Fluid Phase Equilibria**, v. 354, p. 147-155, Sept. 2013.

KNOTHE, G. et al. **Manual de biodiesel**. São Paulo: Edgard Blucher, 2006. 340 p.

KUMAR, S. S. et al. Kinetic modulation of *Trichosporon asahii* MSR 54 lipase in presence of organic solvents: altered fatty acid specificity and reversal of enantio selectivity during hydrolytic reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1/3, p. 41-46, July 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 500-518, July 2010.

LI, D.; WANG, B.; TAN, T. Production enhancement of *Rhizopus arrhizus* lipase by feeding oleic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1/4, p. 40-43, 2006.

LI, X.-J. et al. Key residues responsible for enhancement of catalytic efficiency of *Thermomyces lanuginosus* lipase Lip revealed by complementary protein engineering strategy. **Journal of Biotechnology**, v. 188, p. 29-35, Oct. 2014.

LIU, Y. et al. Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 106, p. 17-25, Aug. 2014.

MAIA, M. de M. D. et al. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 304-309, Dec. 1999.

MANOEL, E. A. et al. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia*: application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 10, p. 1557-1564, Oct. 2015.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509-515, Apr. 2000.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, May 2007.

MATEOS, J. C. et al. Mapping substrate selectivity of lipases from thermophilic fungi. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, n. 1/4, p. 104-112, Nov. 2007.

MATSUMOTO, M.; KONDO, K. Enhanced thermostability of α -chymotrypsin enclosed in inorganic microcapsules. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 2, p. 197-199, Jan. 2001.

MERRIL, C. R.; SWITZER, R. C.; VAN KEUREN, M. L. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4335-4339, 1979.

MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Lipases: valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 372-393, 2015.

MORAIS, M. M. C. de et al. Oil/mineral-salts medium designed for easy recovery of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 17-20, 2003.

MORENO-GARCÍA, J. et al. Proteins involved in wine aroma compounds metabolism by a *Saccharomyces cerevisiae* flor-velum yeast strain grown in two conditions. **Food Microbiology**, v. 51, p. 1-9, Oct. 2015.

MORENO-PÉREZ, S.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Selective ethanolysis of fish oil catalyzed by immobilized lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 1, p. 63-69, Jan. 2014.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 2, p. 57-66, Apr. 2002.

NAGY, V. et al. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1/4, p. 141-148, May 2006.

NEFF, W. E.; MOUNTS, T. L.; RINSCH, W. M. Oxidative stability as affected by triacylglycerol composition and structure of purified canola oil triacylglycerols from genetically modified normal and high stearic and lauric acid canola varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 8, p. 793-799, Dec. 1997.

NGUYEN, L. N. et al. Enzymatic properties and expression patterns of five extracellular lipases of *Fusarium graminearum* in vitro. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 479-486, May 2010.

NWUCHE, C. O.; OGBONNA, J. C. Isolation of lipase producing fungi from palm oil Mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 113-116, Feb. 2011.

NYARI, N. L. D. et al. In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 52-61, Feb. 2016.

NYBROE, O.; JØRGENSEN, P. E.; HENZE, M. Enzyme activities in waste water and activated sludge. **Water Research**, v. 26, n. 5, p. 579-584, May 1992.

PALOMO, J. M. et al. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1/2, p. 267-273, June 2004.

PATEL, V.; NAMBIAR, S.; MADAMWAR, D. An extracellular solvent stable alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. DMVR46: partial purification, characterization and application in non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1673-1681, Oct. 2014.

PATEL, V. et al. Synthesis of ethyl caprylate in organic media using *Candida rugosa* lipase immobilized on exfoliated graphene oxide: process parameters and reusability studies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 62-70, Mar. 2015.

PEREIRA, M. G. et al. Stabilization of the lipase of *Hypocrea pseudokoningii* by multipoint covalent immobilization after chemical modification and application of the biocatalyst in oil hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 121, p. 82-89, Nov. 2015.

PÉREZ, D. et al. A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, Aug. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0023325.

PORTO, B. L. S. et al. Fast screening method for the analysis of trans fatty acids in processed food by CZE-UV with direct detection. **Food Control**, v. 55, p. 230-235, Sept. 2015.

QUILLES, J. C. J. et al. Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 274-280, Jan. 2015.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, July 2008.

ROBLES-MEDINA, A. et al. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 398-408, July 2009.

RODRIGUES, R. C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. 2009. 183 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RODRIGUES, R. C. et al. Two step ethanolysis: a simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized - stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1268-1273, 2010.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 298-306, May 2009.

RUEDA, N. et al. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. **Catalysis Today**, v. 259, p. 107-118, Jan. 2015.

SAEED, N. M. et al. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 264, n. 1, p. 84-93, Oct. 2012.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, p. 199-210, May 1998.

SECUNDO, F. et al. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1/4, p. 166-170, May 2006.

SHAH, S.; GUPTA, M. The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. **Chemistry Central Journal**, v. 2, n. 1, Jan. 2008. doi:10.1186/1752-153X-2-1.

SHARMA, D. et al. Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic *Bacillus* sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 205-211, Oct. 2014.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, Dec. 2001.

SHIMADA, Y. et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3/5, p. 133-142, June 2002.

SMANIOTTO, A. et al. Concentration, characterization and application of lipases from *Sporidiobolus pararoseus* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 294-302, 2014.

SOARES, C. M. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77/79, p. 745-757, 1999.

SOLARTE, C. et al. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 78-83, Feb. 2014.

SUAREZ, P. A. Z. et al. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for “whole-cell synthetic lipase” production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 219-224, Feb. 2008.

TALUKDER, M. M. R. et al. Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 108-113, May 2013.

TAN, T.; WANG, F.; ZHANG, H. Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, n. 4/6, p. 325-331, Oct. 2002.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628-634, Sept. 2010.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, Apr. 2010.

TREVAN, M. D. Enzyme immobilization by covalent bonding. In: WALKER, J. M. (Ed.). **New protein techniques**. Clifton: Humana Press, c1988. Chap. 37, p. 495-510. (Methods in molecular biology, v. 3).

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 7, p. 115-135.

TURAN, D.; YEŞİLÇUBUK, N. Ş.; AKOH, C. C. Enrichment of sn-2 position of hazelnut oil with palmitic acid: optimization by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 766-772, Mar. 2013.

URIOSTE, D. et al. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de métodos para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir de óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 407-412, 2008.

VARARU, F. et al. Selection of aroma compounds for the differentiation of wines obtained by fermenting musts with starter cultures of commercial yeast strains. **Food Chemistry**, v. 197, p. 373-381, Apr. 2016.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 1, p. 30-37, Aug. 2008.

YAN, H. D.; ZHANG, Q.; WANG, Z. Biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters with high substrate loading by a whole-cell lipase from *Aspergillus oryzae*. **Catalysis Communications**, v. 45, p. 59-62, Feb. 2014.

YAN, J.; ZHENG, X.; LI, S. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: preparation, characterization and application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 43-48, Jan. 2014.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord.). **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

PERSPECTIVAS FUTURAS

As lipases são enzimas versáteis, conforme descrito acima. Por esta razão vem crescendo o interesse pelo seu uso em aplicações de alto valor agregado, como na indústria oleoquímica e também na produção de produtos de química fina, neste caso principalmente devido a sua capacidade de ações regio- e estereoseletivas. Lipases com propriedades e estabilidade melhoradas estão sendo produzidas por diferentes sistemas de imobilização. Os avanços também estão sendo feitos em sistema de produção, principalmente na FES, que permite o uso de resíduos agroindustriais, importantes em termos de eficácia e baixo custo. Os bioprocessos baseados nos usos de lipases tem um futuro promissor; no entanto, a taxa de progresso é lenta. Os fatores relevantes para estas limitações incluem ainda, o custo elevado das lipases, principalmente nas formas mais puras, e ausência de uma gama de enzimas para atender as especificidades catalíticas e as propriedades requeridas em várias aplicações. Assim, apesar do consistente número de lipases relatados, ainda existe hoje uma necessidade de continuar o rastreamento de novas fontes de lipases, o desenvolvimento de sistemas de produção e de imobilização, que sejam eficazes em termos de custos, simples e não demorados. Além disso, os modernos métodos de engenharia genética combinados com um crescente conhecimento da estrutura e função estão permitindo ainda mais construções de enzimas e adaptações às necessidades industriais e a exploração de novas aplicações.

APÊNDICE A

Caracterização de óleos vegetais por transesterificação alcalina

Para realizar a caracterização dos óleos naturais utilizados no Projeto, primeiro foi feita uma extração de todos os componentes apolares presentes. Foi pesado 1 g de cada óleo em tubos de ensaio e adicionado 7,5 mL de solução extratora (3:2 hexano/isopropanol v:v) e 5 mL de Na_2SO_4 $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta mistura foi mantida em um banho de ultrassom durante 10 minutos e em seguida em um vortex com velocidade máxima durante 1 minuto, sendo colocada em banho de gelo até a separação de fases. A fase orgânica foi transferida para um béquer, e a fase aquosa foi lavada duas vezes com a solução extratora, sendo recolhida a fase orgânica. A fase orgânica foi rotavaporada à 40°C , até todo solvente ser retirado da amostra.

Em seguida foi realizada a transesterificação alcalina dos triglicerídeos, onde 2 mL de metóxido de sódio ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em metanol foi adicionado a fase orgânica obtida e mantida em banho a 50°C com refluxo durante 10 minutos. A solução foi resfriada e adicionado 100 μL de ácido acético glacial para neutralizar o extrato, juntamente com 5 mL de água deionizada e 3 mL de hexano. A mistura foi agitada em vortex e mantida em banho de gelo para separar as fases. A fase orgânica foi retirada e 3 mL de hexano foi adicionado a fase aquosa e novamente agitado em vortex e mantido em banho de gelo para separação de fases. A fase orgânica foi coletada e adicionada à primeira fase orgânica coletada. Por fim, 1 g de Na_2SO_4 anidro foi adicionado a fase orgânica para secar a solução e armazenado a -20°C (PORTO et al., 2015)*.

A quantificação dos ésteres etílicos foi realizada por cromatografia gasosa utilizando detector de ionização de chama (GC-FID). As amostras foram injetadas em um Cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 480 e coluna Agilent Select Biodiesel for FAME, usando o software Totalchrom (Perkin Elmer). A programação térmica foi de 160 a 230°C , mantendo uma taxa de aquecimento de $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. As temperaturas do injetor e do detector foram 250°C e 300°C respectivamente, utilizando-se o gás nitrogênio como gás de arraste (split 1:30, pressão cabeça da coluna: 100 kPa). Considerando-se que havia somente triglicerídeos na fase orgânica utilizada na reação de transesterificação, a soma de todos os picos obtidos no cromatograma foi utilizada como 100 %, e a porcentagem de cada ácido graxo foi obtida em relação a

esta soma. Os ácidos graxos são representados pela letra C, seguido do número de carbonos presente em suas cadeias (NC) e quantidade de insaturações (I) respectivamente (C NC:I).

Tabela A.1 - Principais ácidos graxos presentes nos óleos utilizados.

Óleos naturais	Ácidos graxos (%)								
	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Canola					4,80	2,01	62,1	20,7	10,3
Coco	7,70	6,20	47,5	18,4	9,00	1,50	8,30	1,20	
Dendê				<1,0	15,5	4,05	28,5	45,0	6,00
Milho					11,45	2,00	35,0	50,0	1,50
Girassol					6,25	3,35	24,5	66,5	
Linhaça					5,90	4,50	19,1	15,0	55,5
Gergelim					9,15	7,10	42,5	38,6	2,60
Oliva					10,6	4,30	28,7	50,7	6,60
Algodão				<1,0	13,3	3,80	23,3	50,2	8,50
Soja					10,8	3,40	25,6	53,3	6,70
Mamona					1,0	1,0	93,0*	2,0	3,0
Andiroba					28,5	9,0	47,0	15,5	
Pequi			<1,0	<1,0	22,0	<1,0	27,0	47,0	<1,0
Buriti					14,0	2,0	48,5	30,5	5,0

* PORTO, B. L. S. et al. Fast screening method for the analysis of trans fatty acids in processed food by CZE-UV with direct detection. **Food Control**, v. 55, p. 230-235, Setp. 2015.