

**APLICAÇÃO DO FUNGO
TERMOFÍLICO *Thermomyces lanuginosus* NA
SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES**

GIANCARLO SONCINI JÚNIOR

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas.**

(Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Junho de 2008**

APLICAÇÃO DO FUNGO
TERMOFÍLICO *Thermomyces lanuginosus* NA
SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES

GIANCARLO SONCINI JÚNIOR

Orientador(a): Profa. Dra. SANDRA MARA MARTINS FRANCHETTI

Co-orientador(a): Prof. Dra. ROSELY PICCOLO GRANDI

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas.**

(Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Junho de 2008**

*“Al mio nonno”, Cassiano Soncini (in memoriam),
pelo modelo de conduta, honra, dignidade e sabedoria.*

*Aos meus pais, Giancarlo e Cely pelo amor e
incentivo constante.*

*A Glaudilene, esposa amada e mãe zelosa “del mio
piccolino” Giancarlo Soncini Netto.*

Dedico.



Aos meus automóveis (Stan Laurel & Oliver Hardy) que por incontáveis oportunidades propiciaram-me memoráveis e inesquecíveis viagens em busca dos conhecimentos e aprendizados vitais à elaboração deste trabalho. Os óleos que lubrificam vossas bielas são como o sangue que corre em minhas veias, parceiros...

“Chi non ha che un momento da vivere, non ha più nulla da nascondere.”

(Edgar Allan Poe)

AGRADECIMENTOS

Se há provérbio que seja verdadeiro, é este: “As grandes dores encerram o germe de alívio em si mesmas”. Ao ter contribuído para poluir o planeta ao longo de minha experiência profissional como químico até hoje, urge o momento em que o estudo da Microbiologia levar-me-á a enfoques de maior beleza, importância e nobreza. A todos aqueles que contribuíram para esta conscientização: - Muito obrigado!

À gentil Sra. Dra. Sandra Mara Martins Franchetti, pela imediata acolhida e atendimento aos meus anseios em aprender da fascinante ciência que é a Microbiologia, e pelo modelo de conduta científica que constantemente inspira-me acima de qualquer outro valor. O mais valioso tesouro foi ter sido considerado um de seus amigos durante o mestrado e o doutorado.

À gentil Sra. Dra. Rosely Piccolo Grandi, pela co-orientação e por ter descido dos altos de sua sapiência e ter contribuído com tantos ensinamentos em Micologia e valiosa cooperação na caracterização das culturas de *Thermomyces lanuginosus*.

À gentil Sra. Dra. Dejanira De Franceschi De Angelis, por compartilhar comigo sua sabedoria e inspirar-me no apreendizado da Microbiologia e ciências correlatas.

Ao cavalheiro Sr. Dr. José Carlos Marconato, por sua sempre pronta colaboração e com pertinentes sugestões, e sua simpatia pelo meu glorioso Fernandópolis Futebol Clube.



Ao cavalheiro Sr. Dr. Joaquim José Lopez de Brito, por compartilhar seus profundos conhecimentos em síntese orgânica e, por ter honrado-me com sua liderança na BASF – S.B.do Campo – Brasil, empresa que estará sempre nas minhas mais caras recordações.

Ao cavalheiro Sr.Dr. Klaus-Wilhelm Lienert, por rico apreendizado em química orgânica, além de ter-me honrado como supremo anfitrião em viagens de transferência de tecnologia em laboratórios da ELANTAS – Hamburgo - Alemanha.

Ao cavalheiro Gabriel Birenbaum, diretor presidente da Elantas Isolantes Elétricos do Brasil, por ter consentido em que tais estudos fossem concluídos durante minhas atividades como Gerente de Pesquisa & Desenvolvimento desta multinacional alemã.

Ao cavalheiro Lord Azuma, filho do grande Imperador Azuma, por seu companheirismo na Elantas Isolantes Elétricos do Brasil.

Ao *Egregio* cavalheiro Furlan, filho de Geraldo, por seu companheirismo na Elantas Isolantes Elétricos do Brasil.

Aos amigos Barão Daros, filho de Jaime e Visconde Kélcio, filho de José Dorival, por inúmeras sínteses orgânicas extravagantes executadas comigo nos laboratórios da Elantas Isolantes Elétricos do Brasil.

“Porque se um cair, o outro levanta o seu companheiro: mas aí do que estiver só; pois, caindo, não haverá outro que o levante”.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xx
ABSTRACT.....	xxi
 1. INTRODUÇÃO.....	 01
 2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 A Biocatálise.....	03
2.2 Enzimas Hidrolíticas.....	05
2.2.1 Lipases.....	06
2.3 A Biocatálise com Microrganismos vivos.....	07
2.3.1 A Imobilização de Culturas.....	09
2.4 Fungos Termofílicos.....	14
2.4.1 <i>Thermomyces lanuginosus</i>	15
2.4.1.1 Enzimas do fungo.....	23
2.4.1.2 Morfologia do fungo.....	27
2.4.1.3 Crescimento do fungo.....	35
2.5 Esterificação.....	36
2.5.1 Substituições Nucleofílicas Bimoleculares (S _N 2).....	42
2.6 Fungos Termofílicos na Biotecnologia: Síntese Enzimática de Ésteres.....	45
2.6.1 Interação entre fungos e poliésteres.....	50

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Materiais.....	51
3.1.1 Meios de Cultura.....	51
3.1.2 Reagentes.....	63
3.1.3 Microrganismo.....	63
3.2 Métodos.....	64
3.2.1 Manutenção do Fungo.....	64
3.2.2 Método de micro-cultivo.....	64
3.2.3 Obtenção e Encapsulamento do Micélio.....	66
3.2.3.1 Obtenção de <i>Pellet</i> Único.....	70
3.2.4 Índice de Acidez.....	70
3.2.5 Medidas de pH.....	72
3.2.6 Medidas de FTIR.....	72
3.2.6.1 FTIR – Preparo de Amostras do Pigmento do Fungo.....	72
3.2.6.2 FTIR – Preparo de Hifas.....	72
3.2.7 Medidas de Cromatografia Gasosa.....	73
3.2.8 Microscopia Ótica.....	73

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	74
4.1.1 Verificação Visual.....	74
4.1.2 Microscopia Ótica.....	75
4.2 Morfologia da Cultura em Diferentes Fontes de Carbono.....	76
4.2.1 Microscopia Ótica.....	78
4.2.1.1 Meio de Cultura Padrão (extrato de levedura) – YpSs Standard.....	78
4.2.1.2 Meio de Cultura YpSs variante I (fonte de carbono = Pentaeritritol)....	79
4.2.1.3 Meio de Cultura YpSs variante II (fonte de carbono = Ácido Oleico)..	80
4.2.1.4 Meio de Cultura YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol).....	81

4.2.1.5	Meio de Cultura YpSs variante IV (sem fonte de carbono adicionada)..	82
4.2.1.6	Meios de Cultura variantes V, VI, VII, VIII e IX (sem extrato de levedura adicionado).....	83
4.2.1.7	Meio de Cultura variante X (fonte de carbono = 1,6-Hexanodiol).....	83
4.2.1.8	Meio de Cultura variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol).....	84
4.2.2	Produção de Pigmento Róseo.....	86
4.2.3	Medidas do crescimento de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	92
4.2.4	Caracterização dos Pigmentos de <i>Thermomyces lanuginosus</i> utilizando FTIR.....	96
4.2.4.1	Hifas de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	99
4.3	Imobilização de <i>Thermomyces lanuginosus</i> de Gel de Alginato de Cálcio.....	106
4.3.1	<i>Pellets</i>	106
4.3.2	<i>Pellet</i> Único.....	106
4.4	Acidez de Acidez dos Meios Reacionais.....	108
4.4.1	Índice de Acidez do Meio Reacional A (Ácido Oleico/Pentaeritritol).....	108
4.4.2	Índice de Acidez do Meio Reacional B (Dioleato de Pentaeritritol).....	112
4.4.3	Índice de Acidez do Meio Reacional C (Ácido Oleico/1,6-Hexanodiol)....	114
4.4.4	Índice de Acidez do Meio Reacional D (Dioleato de 1,6-Hexanodiol).....	116
4.5	Cromatografia Gasosa.....	117
4.6	Interação Fungo/Poliéster (Poliácido láctico - PLLA).....	127
5.	CONCLUSÕES.....	131
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Influência do meio de cultura na produção de lipase.....	46
Tabela 2 - Produção de lipase por <i>Sporotrichum termophile</i> imobilizado.....	47
Tabela 3 - Biotransformações na Indústria	49
Tabela 4 – Dioleato de Pentaeritritol.....	54
Tabela 5 - Dioleato de 1,6-Hexanodiol.....	59
Tabela 6 - Crescimento (mm) das culturas de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	85
Tabela 7 - Características morfológicas de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	85
Tabela 8 - Valores de pH antes e depois do crescimento de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	86
Tabela 9 - Crescimento (mm) das culturas de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	93

Tabela 10 - Valores de pH antes e depois do crescimento de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	94
Tabela 11 - Comparação entre valores de Índice de Acidez obtidos após inoculação com micélio encapsulado oriundo de YpSs Standard e YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol).....	111
Tabela 12 - Comparação entre valores de Índice de Acidez obtidos após inoculação com <i>pellets</i> contendo micélio encapsulado oriundo YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol) e <i>pellet</i> único oriundo de YpSs variante III.....	112
Tabela 13 - Comparação entre valores de Índice de Acidez obtidos após inoculação com micélio encapsulado oriundo de YpSs Standard e YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol).....	114
Tabela 14 - Comparação entre valores de Índice de Acidez obtidos após inoculação com <i>pellets</i> contendo micélio encapsulado oriundo YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol) e <i>pellet</i> único oriundo de YpSs variante XI.....	116
Tabela 15 — Resumo dos parâmetros dos experimentos de Cromatografia Gasosa..	125

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Esterificação enantiosseletiva do (R,S)-ibuprofeno com 1-propanol catalisada por lipase com enantiopreferência para o ®-ibuprofeno.....	07
Figura 2 – Unidade estrutural do Alginato (Chaplin, 2004).....	10
Figura 3 - Tipos de blocos de resíduos no Alginato, mostrando similaridade ou alternância (Chaplin, 2004).....	11
Figura 4 - “Caixa de ovos” formada após uma gelificação de alginato por íons Ca^{2+} . (Chaplin, 2004).....	12
Figura 5 – Curva de Arrhenius (Q_{O_2} - microlitros de O_2 / mg de micélio seco. h^{-1}). Adaptado de Prasad <i>et al.</i> , 1979.....	20
Figura 6 - Conídios e conidióforos de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (aumento 1600x)..	28
Figura 7 – Conídios e conidióforos de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (aumento 1350x)..	29
Figura 8 - Conídios e conidióforos de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (aumento 5500x)..	30

Figura 9 – Ilustração de conidióforos e conídios de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	31
Figura 10 - Ilustração de hifa septada de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	32
Figura 11 - Tubos de cultura de <i>Thermomyces lanuginosus</i> mostrando a difusão de pigmentação rósea.....	33
Figura 12 - Isômeros do ácido dipicolínico.....	34
Figura 13 - Hidrólise de triacilglicerol.....	45
Figura 14 – Exemplos de catálise com lipase.....	48
Figura 15 - Planta e Reatores de acilação (cortesia BASF AG).....	49
Figura 16 - Pentaeritritol.....	52
Figura 17 - 1,6-Hexanodiol.....	57
Figura 18 – Obtenção do micélio de <i>Thermomyces lanuginosus</i> e <i>posteriori</i> fragmentação.....	66

Figura 19 – Funil de adição esterilizado e CaCl_2 gelado em agitação.....	67
Figura 20 - Aparelhagem completa para encapsulamento.....	68
Figura 21 - Obtenção dos <i>pellets</i> e micélio encapsulado.....	68
Figura 22 - Esquema ilustrativo do encapsulamento das hifas.....	69
Figura 23 - Leitura de Índice de Acidez por titulometria.....	71
Figura 24 - Recuperação de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (Castellani).....	74
Figura 25 - Microscopia ótica antes (a) e após a recuperação do fungo (b).....	75
Figura 26 – Interação entre fatores endógenos e exógenos para produção de um efeito morfogênico (Adaptado de Forchiassin, 1989).....	77
Figura 27 - <i>Thermomyces lanuginosus</i> em YpSs Standard (aumento 400x).....	78
Figura 28 - <i>Thermomyces lanuginosus</i> em YpSs variante I (aumento 400x).....	79
Figura 29 - <i>Thermomyces lanuginosus</i> em YpSs variante II (aumento 400x).....	80

Figura 30 - <i>Thermomyces lanuginosus</i> em YpSs variante III (aumento 400x).....	81
Figura 31 - <i>Thermomyces lanuginosus</i> em YpSs variante IV(aumento 400x).....	82
Figura 32 - <i>Thermomyces lanuginosus</i> em YpSs variantes V, VI, VII, VIII e IX.....	83
Figura 33 - <i>Thermomyces lanuginosus</i> em YpSs variante X (aumento 400x).....	83
Figura 34 - <i>Thermomyces lanuginosus</i> em YpSs variante XI (aumento 400x).....	84
Figura 35 – Pigmentos fúngicos (adaptado de Espósito & Azevedo, 2004).....	87
Figura 36 – Reverso da placa de Petri de YpSs variante II.....	88
Figura 37 – Comparação entre reversos de YpSs Standard e variantes I, II, III e IV..	89
Figura 38 – <i>Thermomyces lanuginosus</i> em YpSs variante XII (aumento 400x).....	90
Figura 39 - Reverso de placas de Petri com YpSs Standard, YpSs v.XIII e YpSs v.XIV.....	91
Figura 40 - Monitoramento do crescimento de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	92

Figura 41 - FTIR de meio YpSs Standard desidratado.....	96
Figura 42 - FTIR do meio YpSs inoculado com <i>Thermomyces lanuginosus</i> e desidratado.....	97
Figura 43 - Estrutura da quitina.....	99
Figura 44 - FTIR de hifas de <i>Thermomyces lanuginosus</i> inoculadas em meio YpSs Standard.....	100
Figura 45 - FTIR de hifas de <i>Thermomyces lanuginosus</i> inoculadas em meio YpSs variante I (fonte de carbono = Pentaeritritol).....	101
Figura 46 - FTIR de hifas de <i>Thermomyces lanuginosus</i> inoculadas em meio YpSs variante II (fonte de carbono = Ácido Oleico).....	101
Figura 47 - FTIR de hifas de <i>Thermomyces lanuginosus</i> inoculadas em meio YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol).	102
Figura 48 - FTIR de hifas de <i>Thermomyces lanuginosus</i> inoculadas em meio YpSs variante IV (sem adição de fontes de carbono).....	102

Figura 49 - FTIR de hifas de <i>Thermomyces lanuginosus</i> inoculadas em meio YpSs variante X (fonte de carbono = 1,6-Hexanodiol).....	104
Figura 50 - FTIR de hifas de <i>Thermomyces lanuginosus</i> inoculadas em meio YpSs variante XI (fonte de carbono = 1,6-Hexanodiol).....	105
Figura 51 – Tubo de cultura contendo <i>pellet</i> único.....	106
Figura 52 - <i>Pellet</i> preenchido com micélio (a esquerda) e <i>pellet</i> vazio (a direita)....	107
Figura 53 - Acompanhamento do Índice de Acidez no Meio Reacional A.....	110
Figura 54 - Acompanhamento do Índice de Acidez do Meio Reacional C.....	115
Figura 55 - Acompanhamento do Índice de Acidez no Meio Reacional C com <i>pellet</i> gigante.....	115
Figura 56 - Cromatograma de uma solução 0,01 % m/m de 1,6-Hexanodiol.....	118
Figura 57 – Cromatograma de uma solução 0,01 % m/m de Dioleato de 1,6-Hexanodiol.....	119

Figura 58 - Cromatograma de uma solução 0,01 % m/m de Meio Reacional C após esterilização.....	120
Figura 59 – Cromatograma de uma solução 0,01 % m/m de Meio Reacional C contendo <i>peletts</i> oriundos de YpSs Standard.....	121
Figura 60 – Cromatograma de uma solução 0,01% m/m de Meio Reacional C contendo <i>pellet</i> único oriundo de YpSs Standard.....	122
Figura 61 - Cromatograma de uma solução 0,0% m/m de Meio Reacional C contendo <i>pellets</i> oriundos de YpSs variante XI.....	123
Figura 62 - Cromatograma de uma solução 0,01% m/m de Meio Reacional C contendo <i>pellet</i> único oriundo de YpSs variante XI.....	124
Figura 63 – Estrutura de um Políácido láctico.....	127
Figura 64 - Biofilme obtido após a inoculação de <i>Thermomyces lanuginosus</i> em meio YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol), contendo disco de PLLA.....	128
Figura 65 - Pedacos do disco de PLLA.....	128

Figura 66 - FTIR de biofilme obtido após a inoculação de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante XI contendo disco de PLLA..... 129

Figura 67 - Efeito inibidor da água sobre a atividade catalítica (esterificação) lipase produzida por *Thermomyces lanuginosus* encapsulado..... 132

RESUMO

Neste trabalho o crescimento micelial, os aspectos morfológicos e o potencial para catálise enzimática foram avaliados em relação ao fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, quando inoculado em meios de cultura YpSs (extrato de amido + água + Agar), com fonte de carbono substituída por matérias-primas encontradas na indústria química, como intermediários clássicos, na síntese de diversos ésteres. O monitoramento do crescimento do microrganismo envolvendo parâmetros tais como aspecto das hifas, quantidade de conídios e conidióforos, produção de pigmentos, pH, além das condições de imobilização do fungo, serviram para a averiguação da capacidade do microrganismo em expressar uma eventual condição de transformação de reagentes (di-álcoois e ácidos graxos) em produtos de síntese (ésteres). Os *pellets* contendo micélio de *Thermomyces lanuginosus* em erlenmeyers com as matérias-primas acima citadas, permaneceram em estufa microbiológica durante 15 dias, sendo, então, averiguadas as transformações decorrentes dos diferentes meios, evidenciando o consumo dos reagentes. Para a caracterização do material, foram realizadas medidas de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) efetuadas com o próprio micélio e meios de cultura, microscopia ótica (MO) de micro cultivo do fungo nos diversos meios de cultura propostos, e avaliações com cromatografia gasosa (GC). Os resultados obtidos, acrescidos ao crescimento de *Thermomyces lanuginosus* em todos os meios propostos, bem como a manutenção da sua capacidade de reprodução, mostram ser esse fungo termofílico altamente promissor em futuros trabalhos de biocatálise com microrganismos vivos. A capacidade demonstrada de catalisar reações de esterificação e a adaptação deste fungo as diversas fontes de carbono a que foi exposto, sugerem diversos trabalhos futuros visando a otimização da produção de ésteres em escala, ou até mesmo a utilização de sua capacidade em promover tais reações quando impedimentos estéricos já se fazem presentes.

ABSTRACT

In this work, the mycelial growth, the morphologic aspects and the potential for enzymatic catalysis were evaluated considering the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, when inoculated in YpSs media (starch extract + water + Agar), with its carbon source substituted by different raw materials normally found in the chemical industry, as classics intermediates used in diverse ester synthesis. The continuous observation of the microorganism growth involving parameters as hyphae aspect, amount of conidia and conidiophores, pigment production, pH and the fungus immobilization conditions, avoid the ascertainment of the fungus capacity to show an eventual condition of transform reagents (dialcohol and fatty acids) in synthesis products (esters). Erlenmeyers with the mentioned raw-materials and pellets containing *Thermomyces lanuginosus* mycelium, were allocated in microbiological oven for 15 days and transformations due to the different media were studied and interpreted showing the reagents consumption. Measures of absorption in the transformed infra-red ray with transformed of Fourier (FTIR) of the fungus mycelium and the media, optical microscopy (MO) of the fungus micro-culture in several media, and evaluations with gas chromatography (GC) were evaluated for the material characterization. The obtained results, added to the growth of *Thermomyces lanuginosus* in all the considered media, as well as the maintenance of its capacity of reproduction, aimed to understand and evaluate that *Thermomyces lanuginosus* is promising microorganism alternative for immobilized biocatalysts. The demonstrated capacity to catalyze esterifications reactions and the adaptation of this fungus to different carbon sources, suggest several future works aiming the optimization of ester production, or even though, the use of its capacity in promoting such reactions when sterical hindrances already are significant.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos são utilizados pelo homem desde os tempos mais longínquos, para preparar bebidas, alimentos, vestimentas, muito antes que a existência deles tenha sido reconhecida e estudada no século XIX (Alexopoulos *et al.*, 1996). Quando um microrganismo é introduzido num meio de cultura que lhe é conveniente, ele desenvolve uma atividade relacionada com sua composição e com as condições que o rodeiam (Beer *et al.*, 1994). Essa atividade pode apresentar dois aspectos que estão relacionados entre si:

1. O microrganismo se reproduz e tem-se o aumento da concentração da biomassa e a biossíntese dos constituintes celulares que é feita a partir dos compostos do meio de cultura.

2. O microrganismo excreta através de seus invólucros celulares, este ou aquele composto interessante que pode ser concentrado, purificado e recuperado no final da cultura, ou ainda este mesmo composto pode causar mudanças no meio que sejam de grande valor tecnológico. Um exemplo disto, é a produção de enzimas, catalisadores biológicos de natureza protéica que intervêm em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis as quais elas aceleram por ativação específica. São as peças chaves da biotecnologia e da bioindústria. O uso de células microbianas imobilizadas tem encontrado um vasto campo de aplicações nos últimos anos. Quando comparamos a catálise induzida por microrganismos e a catálise química, destacam-se *a priori* dois fatores que favorecem a biocatálise com microrganismos: a alta atividade catalítica e a grande seletividade de substratos que causam uma redução na formação de subprodutos (Hartmeier, 1988).

Existem basicamente duas estratégias para a condução adequada de uma biotransformação (Scriban, 1985):

- O uso de enzimas purificadas que são isoladas em nível comercializável por fornecedores diversos.
- O uso de células vivas.

Evidentemente, a despeito do custo muito elevado da purificação de enzimas, a manutenção da integridade das células também pode trazer significativas vantagens como a maior estabilidade das enzimas que permanecem protegidas pelo ambiente celular e a preservação da dependência destas enzimas de co-fatores presentes no microrganismo.

Com base nestes efeitos conhecidos, porém pouco estudados, foram delimitados os seguintes objetivos específicos:

1° Identificar a capacidade do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* quanto a produção de lipases, correlacionando esta produção com o advento de reações de esterificação induzidas ao meio, e avaliar a interação deste fungo com polímeros contendo alta densidade de grupamentos éster (PLLA).

2° Verificar a manutenção das condições de crescimento do fungo em diversas variantes do meio YpSs usando ácidos graxos, glicóis e ésteres de ácidos graxos como fonte de carbono.

3° Verificar a manutenção da capacidade de produção de metabólitos secundários em diversos meios de cultura e avaliar eventuais mudanças morfológicas no microrganismo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Biocatálise

Nos últimos trinta anos, alguns poucos laboratórios (alguns relacionados à indústria e outros ligados à pesquisa universitária) demonstraram interesse no estudo das reações catalisadas por enzimas (biotransformações) nas mais diversas sínteses orgânicas (Tortora *et al.*, 2000). A partir do ano de 1980 registrou-se, no entanto, um crescimento exponencial nas investigações das reações envolvendo biotransformações (Poppe, 1992). Naturalmente, relacionam-se estes fatos à dedicação dos pesquisadores em seus desenvolvimentos e ao concomitante aumento do conhecimento sobre a variedade de enzimas disponíveis e sua capacidade de transformar uma grande quantidade de compostos sintéticos (Roberts, 1995).

A utilização de enzimas em sínteses orgânicas pode ser vantajosa devido a uma série de razões, a saber: (Suckling, 1990).

1. Reações catalisadas por enzimas podem ser processadas em condições extremamente brandas como, por exemplo, temperaturas abaixo de 40° C, pressão atmosférica e pH próximo à neutralidade. Assim, evidenciamos que tais condições propiciam um considerável ganho de energia quando comparamos as sínteses clássicas verificadas nos processos industriais.

2. Geralmente, as enzimas promovem reações com alta quimiosseletividade, regioseletividade e estereosseletividade, visto que como catalisadores quirais, podem gerar compostos que apresentam atividade ótica, o que passa a ser, em muitos casos, verificados na indústria farmacêutica e de agroquímicos, uma vantagem considerável.

3. As enzimas podem promover reações que seriam extremamente difíceis ou até mesmo impossíveis segundo as técnicas ou catálises convencionais da síntese química.

4. Enzimas são consideradas catalisadores naturais, o que passa a ser uma vantagem considerável no aspecto ambiental, consideradas como um benefício ecológico da chamada “química verde”.

5. Enzimas utilizam água como meio reacional e a constante preocupação com o uso de solventes fazem deste quesito uma vantagem notável. Por outro lado, algumas enzimas como a lipase têm notória atividade em meio orgânico, como será visto *a posteriori*, permitindo assim a escolha adequada do sistema de solventes a ser utilizado.

Faz-se necessário salientar, que um dos maiores obstáculos observados no campo da biotransformação, passou a ser a etapa de industrialização. Os experimentos conduzidos com relativo êxito em tubos de ensaio devem ter seu potencial gradativamente avaliado em escala industrial.

Existem basicamente duas estratégias para a condução das reações de biotransformação: (1) o uso de enzimas pura ou parcialmente purificadas, isoladas por um pesquisador em especial ou por um fabricante comercial, ou (2) o uso das células íntegras de um microrganismo (Poppe, 1992).

Microrganismos isolados em território brasileiro têm demonstrado excelente potencial biocatalisador frente a diferentes substratos orgânicos de interesse, como por ex. na hidrólise de óleos marinhos, na síntese de ésteres de ácidos graxos poliinsaturados e de ésteres de aroma (Pelczar *et al.*, 1996).

2.2 Enzimas Hidrolíticas

Uma grande variedade de enzimas hidrolíticas pode ser produzida por fungos. A produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos e leveduras é muito explorada tecnologicamente, com aplicação em vários setores industriais (Roberts *et al.*, 1995).

Graças às suas características, as hidrolases possuem um grande potencial biotecnológico, constituindo o grupo de enzimas mais explorado comercialmente.

Estimativas referentes ao final dos anos 90 apontam que o mercado de enzimas movimentou cerca de U\$1,5 bilhão, sendo liderado pelas proteases e carboidrases. Normalmente, a produção de enzimas por microrganismos é derivada do metabolismo aeróbio dos nutrientes (Roberts *et al.*, 1995).

A maioria das enzimas empregadas na indústria é extracelular e de origem microbiana. Essas enzimas são empregadas na forma solúvel sem recuperação no final do processo. O custo do tratamento enzimático por lote de substrato ainda é baixo, e o emprego de enzimas imobilizadas recicláveis no processo ainda tem custo não-justificável. O custo global de produção de enzimas intracelulares é maior que o de enzimas extracelulares e, como consequência, as intracelulares geralmente são utilizadas imobilizadas para que propiciem a recuperação após o processo. Sabe-se, ainda, que o custo de produção de enzimas está associado não só ao tipo de excreção celular, mas também ao grau de pureza requerido no processo (Packowski, 1978).

Por necessidade, portanto, as tecnologias para produção de enzimas cada vez mais puras evoluíram em diversas direções. Em aplicações alimentares, a necessidade de controlar os custos é muito maior do que na indústria farmacêutica, por exemplo. Esse aspecto fica claro quando se associa o valor agregado de um alimento por quilograma a uma droga. A base competitiva para produzir e vender enzimas está em conseguir a qualidade do produto desejado a um custo aceitável por unidade de produto final como uma bebida, um xarope, etc. (Roberts *et al.*, 1995)

Com base nesses princípios é que se direciona a busca por microrganismos para a produção de enzimas industriais (Smith, 1980).

Dentre as enzimas hidrolíticas de maior interesse estão as lipases (glicerol éster hidrolase).

2.2.1 Lipases

São biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas e, na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como “Generally Regarded as Safe – GRAS”. Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação. Os trabalhos relatados em literatura sobre lipases fúngicas são numerosos, sendo que os mais extensivamente estudados são os fungos *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus delemar* e *Penicillium cyclopium* (Vulfson, 1994).

As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, óleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel (Roberts *et al.*, 1995).

A importância do uso de enzimas em biocatálise é cada vez mais evidente, dado a grande versatilidade de reações catalisadas, condições brandas de reação, de natureza regio, quimio e enantiosseletiva (Teich, 1992). A reação de esterificação enantiosseletiva catalisada por lipases tem sido usada com sucesso na resolução de racêmicos de fármacos. Para o caso da obtenção da forma (S)-ativa presente na mistura racêmica do fármaco realiza-se a reação de esterificação utilizando lipase que apresente enantiosseletividade para a forma (R)-ibuprofeno (Roberts *et al.*, 1995).

Desta forma, a enzima catalisa seletivamente a conversão para (*R*)-éster, discriminando o (*S*)-ibuprofeno da mistura racêmica, conforme ilustrado na Figura 1.

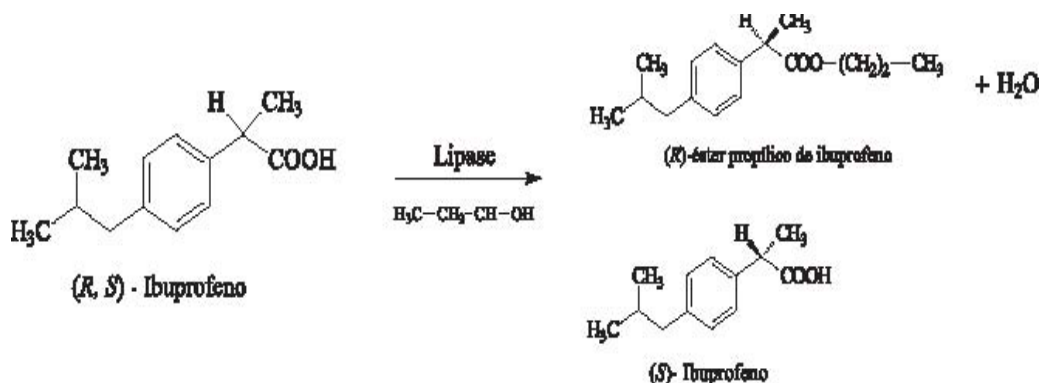


Figura 1. Esterificação enantiosseletiva do (*R,S*)-ibuprofeno com 1-propanol catalisada por lipase com enantiopreferência para o (*R*)-ibuprofeno.

Posteriormente, o ácido discriminado, (*S*)ibuprofeno, pode ser separado do meio de reação reagindo-o com uma base forte em meio aquoso.

Considerando a extraordinária diversidade microbiana e a importância dos fungos como produtores de enzimas, justifica-se a busca de novos biocatalisadores com características especiais e passíveis de aplicação em biocatálise.

2.3 A Biocatálise com Microrganismos Vivos

- Por que utilizar células vivas, ao invés de enzimas isoladas?

✓ As enzimas classicamente usadas em reações de biotransformação são sintetizadas por células de microrganismos vivos.

✓ De uma forma geral, a quantidade de substratos que podem ser metabolizados por uma célula microbiana, é muito mais extensa do que aquela passível de ser utilizada por células animais ou vegetais. Um bom exemplo disto encontra-se em *Pseudomonas fluorescens* que são nutricionalmente altamente versáteis, podendo utilizar mais de 60 compostos orgânicos diferentes como fonte de carbono e energia.

✓ As células microbianas são muito mais facilmente cultiváveis em culturas além de mostrarem uma resistência maior a condições adversas.

Todas as enzimas factíveis de serem sintetizadas, são produzidas dentro do perímetro celular definido pela membrana plasmática. Apesar da maioria das enzimas sintetizadas permanecerem retidas e assim desempenharem funções no interior da célula, algumas enzimas denominadas de “extracelulares” são excretadas para fora da célula. Muitas enzimas potencialmente úteis a biocatálise são relativamente instáveis quando fora do ambiente celular no qual elas geralmente atuam. Consequentemente tais enzimas passariam a ter um baixo rendimento como agentes de biotransformações se extraídas da célula onde foram originadas.

Via de regra a instabilidade e concomitante perda da atividade catalítica está associada à alteração conformacional da estrutura protéica das formas ativas desta enzima. Se tais “ambientes” forem destruídos durante a extração da enzima, a estabilidade da enzima estará comprometida.

Atualmente, estudos sobre a imobilização de enzimas buscam a obtenção de formas ou matrizes que possam garantir a manutenção da mesma conformação quando da extração enzimática (Roberts *et al.*, 1995).

✓ Muitas enzimas potencialmente úteis a biocatálise são suscetíveis a ataques e hidrólise por parte de outras enzimas (particularmente as proteases) que são expressadas durante os procedimentos clássicos de ruptura celular. As proteases são essenciais em várias etapas do crescimento celular, assim estão constantemente presente nas células vivas.

✓ Algumas enzimas intracelulares podem ser do tipo “co-fator dependentes” e uma vez fora do ambiente celular continuarão dependendo de tais co-fatores, o que poderia tornar inviável o processo catalítico.

✓ A preparação e a obtenção de enzimas purificadas fora do ambiente celular pode levar a um processo inviável em termos econômicos, devido aos fatores tempo e custo envolvido nas diversas etapas necessárias.

Assim, nota-se que nenhum destes aspectos críticos podem ser aplicados a maioria das enzimas extracelulares.

2.3.1 A Imobilização de culturas

A imobilização de culturas de microrganismos tem sido muito estudada e revisada. O uso de células microbianas imobilizadas teve efetivamente um grande desenvolvimento, desde os últimos 30 anos (Ohlson *et al.*, 1979). A possibilidade de imobilizarem-se microrganismos vivos tem sido reconhecida como uma técnica vantajosa, uma vez que as células vivas possibilitam regeneração *in situ*, mediante o simples fornecimento de nutrientes adequados ao metabolismo (Tomaska *et al.*, 1995).

Geralmente, a imobilização de células pode ocorrer como um fenômeno natural ou através de processos artificiais, embora neste caso ao contrário do que ocorre na natureza, o crescimento fica limitado. Esta imobilização conduzida é geralmente processada mediante o uso de um gel polimérico hidrofílico e de alta massa molar, por exemplo, o alginato, a agarose e a carragena. (Ramakrishna & Prakasham, 2005). Imobilizações em géis de pectina também tem sido exploradas em diversos trabalhos de biocatálise (Tomaska *et al.*, 1995).

Um gelificante é uma substância que confere textura através da formação de um gel. Por sua vez, o gel é uma dispersão de sólido em líquido com uma quantidade de sólido bem maior que pode ser obtida por evaporação do líquido (Larsson *et al.*, 1976).

Os alginatos são produzidos comumente por algas marinhas (*Phaeophyceae*, principalmente *Laminaria*). São polímeros não ramificados contendo ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) de resíduos de Ácido D-manurônico (**M**) e ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) de resíduos de Ácido L-gulurônico (**G**) (Chaplin, 2004). A unidade estrutural pode ser exemplificada na Figura 2.

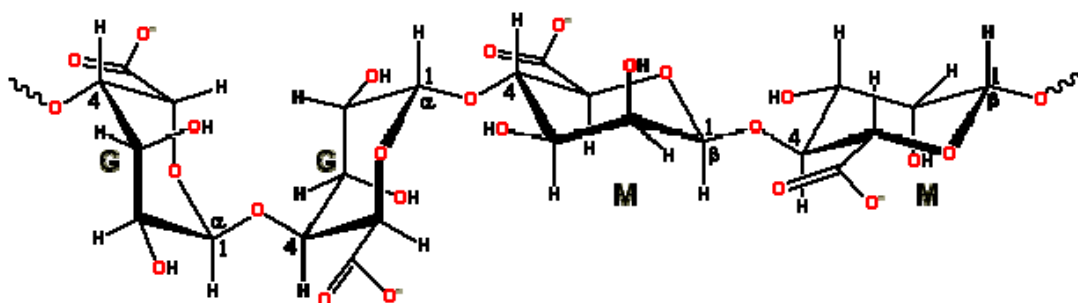


Figura 2. Unidade estrutural do Alginato (Chaplin, 2004).

Embora esses resíduos sejam epímeros (resíduos de Ácido D-manurônico sendo enzimaticamente convertidos a Ácido L-gulurônico após polimerização) e apenas diferenciando-se no carbono 5, eles possuem diferentes conformações, uma vez que o Ácido D-manurônico possui ligações diequatoriais entre os carbonos 4C_1 enquanto que o Ácido L-gulurônico possui ligações diaxiais entre os carbonos 1C_4 (Chaplin, 2004).

Os alginatos bacterianos são geralmente O-acetilados nas posições 2 e/ou 3 dos resíduos de Ácido D-manurônico, e assim, a O-acetilase bacteriana pode ser utilizada com a finalidade de promover a O-acetilação de alginatos de algas, o que por conseguinte irá aumentar ligações de hidrogênio com a água (Chaplin, 2004).

Os alginatos produzidos por algas não são copolímeros randômicos, mas dependendo da espécie da alga consistem em blocos ou resíduos alternados (ex.: **MMMMMMMM**, **GGGGGGGG** e **GMGMGMGM**), os quais têm diferentes preferências conformacionais e comportamentos conforme evidencia a Figura 3 (Chaplin, 2004).

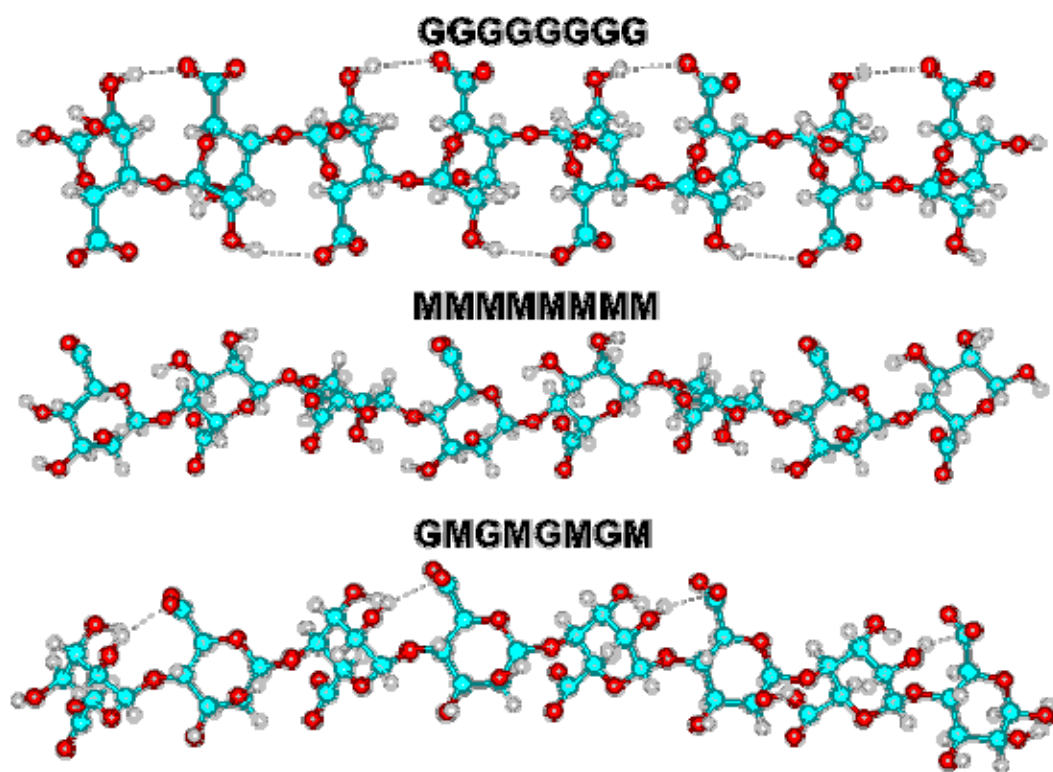


Figura 3. Tipos de blocos de resíduos no Alginato, mostrando similaridade ou alternância (Chaplin, 2004).

Como exemplos de relações entre resíduos **M/G** o alginato obtido de *Macrocystis pyrifera* tem esta relação aproximadamente igual a 1,6, ao passo que para *Laminaria hyperborea* este valor é de aproximadamente 0,45. Alginatos podem ser preparados numa ampla faixa de massas molares (50 a 100000 resíduos) para diversos tipos de aplicação (Chaplin, 2004).

Quando íons de cálcio são adicionados à uma solução de alginato de sódio, ocorre um fenômeno descrito como sendo um alinhamento dos blocos **G**, e desta forma os íons de cálcio acabam-se ligando a duas cadeias, numa estrutura que pode ser comparada a ovos dentro de uma caixa de ovos (Figura 4).

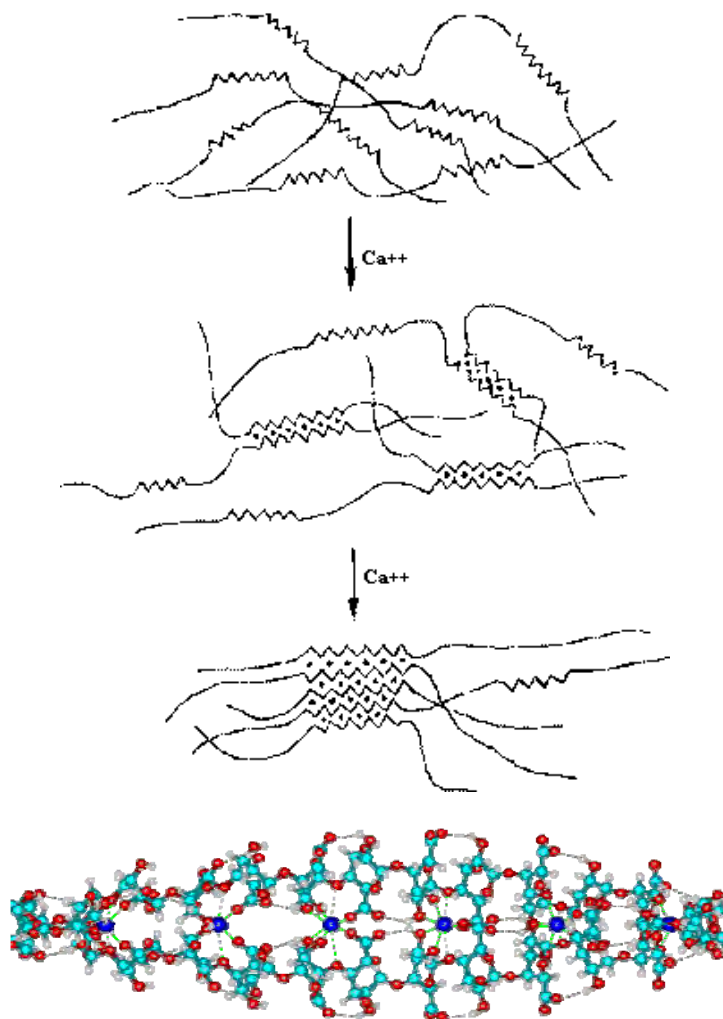


Figura 4. “Caixa de ovos” formada após uma gelificação de alginato por íons Ca^{++} . (Adaptado de Chaplin, 2004).

Dependendo da quantidade de cálcio adicionado, as associações entre as cadeias de alginato podem ser temporárias ou permanentes. Com baixos teores de cálcio, associações temporárias são obtidas, gerando soluções altamente viscosas e tixotrópicas. Alternativamente, altos teores de cálcio geram precipitações e gelificações que são resultantes de associações permanentes entre as cadeias.

Alginatos comerciais são derivados de uma infinidade de variedades de algas. Desta forma, os alginatos diferem em sua composição monomérica e também na capacidade de promover interações com os íons de cálcio. Embora a relação entre os resíduos de ácido manurônico e ácido gulurônico possam ser determinadas facilmente, a composição molecular exata dos alginatos em termos da distribuição de blocos de resíduos é difícil de ser conhecida. Como resultado desta dificuldade, os alginatos geralmente são referidos como “alto M” ou “alto G”, em função das proporções de ácido manurônico ou ácido gulurônico contido nas macromoléculas.

De forma geral, alginatos “alto G” produzem géis mais duros e quebradiços, sendo no entanto, mais resistentes à altas temperaturas que os “alto M”, que por sua vez geram géis mais elásticos. Todavia os alginatos “alto M” também têm melhor resistência às temperaturas de congelamento (Chaplin, 2004).

O alginato de sódio ocorre como pó fino quase inodoro e insípido, de cor branco ou amarelado. É usado na indústria alimentícia (sorvete, molhos de salada, bebidas lácteas, glacês e confeitarias em geral), mas também encontra aplicações na indústria de cosméticos, comprimidos e na produção de rações.

A solubilidade e capacidade de captação de água dependerá do pH (geralmente alginatos precipitam abaixo de 3,5), da massa molar, da concentração iônica e da natureza dos íons presentes. Todavia, geralmente apresentam sempre alta capacidade de absorção de água. (Chaplin, 2004).

2.4 Fungos Termofílicos

Fungos termofílicos representam uma pequena fração dentro da micota conhecida e podem ser definidos como tendo uma temperatura mínima de crescimento próxima ou acima de 20 °C e uma temperatura máxima de crescimento estendendo-se até 62 °C. Como únicos representantes de organismos eucariotos que podem crescer em temperaturas acima de 45 °C, os fungos termofílicos apresentam grande valor experimental, e constituem-se objeto de interesse a investigação de seus mecanismos metabólicos, que permitem sua sustentabilidade em temperaturas da ordem de 60 °C. Embora dispersos em ambientes terrestres, eles ainda permanecem praticamente inexplorados quando comparados à diversas espécies de bactérias, todavia despertam crescente interesse devido ao potencial de suas enzimas com possíveis aplicações científicas e industriais (Maheshwari *et al.*, 2000). Os fungos termofílicos podem crescer em meios simples expressando taxas de crescimento comparáveis aos fungos mesofílicos, além de demonstrar grande habilidade em degradar polissacarídeos constituintes da biomassa. As propriedades de suas enzimas mostram diferenças não apenas entre espécies diferentes mas também dentro de uma mesma cepa. Além disso, suas enzimas extracelulares revelam temperaturas ótimas de atividade, muito próximas à temperatura de crescimento do fungo ou até mesmo, em certos casos, acima da temperatura ótima de crescimento e são de forma geral, mais estáveis termicamente, do que enzimas produzidas por fungos mesofílicos (Maheshwari *et al.*, 2000).

Algumas enzimas extracelulares de fungos termofílicos já estão sendo produzidas comercialmente, e outras já entraram no mercado (Esposito & Azevedo, 2004). Genes de fungos termofílicos que conferem a habilidade da expressão de lipase, protease, xilanase e celulase, têm sido clonados e expressos em outros fungos heterólogos. Também proteínas puras têm sido obtidas permitindo a elucidação de diversos mecanismos de catálise, evidenciando também os mistérios de sua termoestabilidade (Blöchl *et al.*, 1997).

Todavia, de forma surpreendente, algumas enzimas intracelulares foram purificadas e submetidas também a ensaios de termoestabilidade revelando resultados comparáveis aos fungos mesofílicos ou em certos casos valores inferiores. Embora ainda exista falta de maiores informes científicos, aparentemente a habilidade termofílica de um organismo eucarioto parece estar ligada a uma série de mecanismos de estabilização de suas enzimas, ou até mesmo otimização de sua atividade, com mecanismos regidos por enzimas diferentes (Adams, 1993).

Não devem ser confundidos os vocábulos termofílico e termotolerantes. Por fungos termofílicos entendam-se microrganismos que não conseguem crescer abaixo de 20 °C, ao passo que termotolerantes podem crescer abaixo desta temperatura, mas nunca excedendo 55 °C. Considerando que a maioria dos eucariotos não podem sobreviver a longa exposição a temperaturas superiores a 45 °C, esta habilidade de aproximadamente 30 espécies conhecidas é um fenômeno que merece ser elucidado (Bononi & Grandi, 1998).

Os fungos termofílicos são constituídos por um grupo fisiologicamente heterogêneo, composto de vários gêneros de Phycomicetos, Ascomicetos, Fungos Anamórficos e Mycelia Sterilia. (Mouchacca, 1997). Esses ocorrem normalmente em ambiente quente e úmido, como em amontoado de material vegetal em decomposição ou em pilhas de compostagem, sendo predominantes a qualquer outro fungo, neste tipo de meio. (Esposito, 2004).

2.4.1 *Thermomyces lanuginosus*

Descoberto por Tsiklinskaya, como contaminante, em batata (Noack, 1920). O trabalho de Miehe (1930) com pilhas de compostagem esterilizadas e inoculação de microrganismos mesofílicos e termofílicos, mostrou que a temperatura do meio podia atingir 40 °C e esta seria uma condição favorável à germinação de conídios da microflora termofílica (Miehe, 1930).

Allen e Emerson (1949) também conseguiram isolar microrganismos termofílicos capazes de expressar crescimento em temperaturas de até 60 °C.

Este estudo revelou também que para o desenvolvimento adequado dos fungos no meio em questão, fatores como umidade e nutrientes também eram importantes, além da formação de poros de ar na massa vegetal que permitiam a difusão de oxigênio, facilitando assim a respiração aeróbica dos fungos (Prasad *et al.*, 1979).

Os primeiros meios de cultura propostos para fungos termofílicos (*Thermoascus aurantiacus*, *Anixia spadicea*, *Mucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus* e *Thermoidium sulfureum* eram baseados em glicose, sais minerais, peptona e além disto eram líquidos e recebiam ainda a adição de pilhas de compostagem “cozidas” (Noack, 1920). Até os idos de 1980, os fungos termofílicos eram tidos como sendo de difícil cultivo em laboratório, exigindo para isto um complexo conjunto de componentes nutricionais para a composição adequada do meio. Como exemplo disto, Miller e colaboradores chegaram a publicar que: “Nenhum meio de cultura pode ser definido com exatidão para o correto crescimento de fungos termofílicos” (Miller *et al.*, 1974).

Rosenberg reportou no entanto que mais da metade das espécies de fungos termofílicos e termotolerantes apenas precisavam de 0,01 % m/m de extrato de levedura para crescerem num meio sólido (Rosenberg, 1975).

Wali e colaboradores relataram que para o bom crescimento de fungos termofílicos em meio líquido contendo apenas glicose e sulfato de amônia, seria necessário um suplemento extra de ácido succínico (como um intermediário para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos). Isto ficou claramente demonstrado, uma vez que a baixa concentração de fosfato de amônia no meio condicionava a um abaixamento do pH do meio na ausência do ácido orgânico, atingindo valores de pH de aproximadamente 3,5, ocasionando assim o cessamento do crescimento do microrganismo (Wali *et al.*, 1978). De uma maneira geral, nenhum dos ácidos envolvidos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos caracterizou-se como um estimulante de crescimento para fungos termofílicos, assim, considera-se que o papel exercido por tais compostos como agente tampão seja muito mais significativo do que seu valor nutricional (Maheshwari *et al.*, 2000).

Fungos termofílicos crescem satisfatoriamente em um meio mínimo se o pH do meio for controlado entre 5,5 e 7,5 através do aumento da concentração de fosfato no meio e reajustando o pH com a adição de álcalis, incluindo-se carbonato de cálcio como reserva de álcalis, ou substituindo-se a fonte de nitrogênio inorgânico por uma fonte de nitrogênio orgânica (L-asparagina). Um baixo pH reduz a solubilidade do CO₂ no meio e limita sua disponibilidade de assimilação pela enzima anaplerótica piruvato carboxilase (Gupta, 1985). Embora o CO₂ não seja considerado como um quesito nutricional para fungos, o crescimento de *Thermomyces lanuginosus* é severamente afetado se a fase gasosa de um frasco de cultura for desprovida de CO₂.

A concentração de CO₂ em pilhas de compostagem pode atingir valores de até 15 %, atribuindo-se assim ao CO₂ um importante papel no desenvolvimento de fungos termofílicos, que são os componentes primários na microflora destes *habitats*. (Derikx *et al.*, 1990).

Os fungos termofílicos têm uma distribuição ao longo do planeta tanto em zonas tropicais como em zonas temperadas. Tandler e colaboradores ressaltaram que “a distribuição de microrganismos no planeta que tem uma temperatura mínima de crescimento superior à temperatura obtida em seu *habitat* natural permanece como sendo um crime perfeito na história dos sistemas biológicos” (Tandler *et al.*, 1967).

Uma grande influência sobre esses valores de temperatura vem da escolha do tipo de inóculo, podendo mostrar diferenças entre conídios ou conídios germinados/micélio. Um bom exemplo disto ocorre com *Mucor miehei* que não cresce em culturas submersas a 25 °C se conídios são utilizados. Este mesmo microrganismo cresce, no entanto, consideravelmente nas mesmas condições de meio e temperatura se forem usados conídios germinados/micélio (Streets, 1972).

De forma semelhante o mesmo foi observado para *Thermomyces lanuginosus* a 25 °C que cresceu nesta temperatura apenas quando conídios previamente germinados (apresentando micélio) foram usados ao invés de conídios. O crescimento deste microrganismo ocorreu mostrando uma fase lag quase imperceptível, contudo ainda assim, o crescimento foi inferior quando comparado a 50 °C.

Em uma pilha de compostagem, durante o processo de seu auto-aquecimento o meio tornar-se-á deficitário em termos de oxigênio disponível. Noack estudou o comportamento de *Thermoascus aurantiacus* sujeito à uma condição de anaerobiose e observou claramente que uma diminuição na quantidade de oxigênio afeta consideravelmente o crescimento do microrganismo (Noack, 1920).

Embora os fungos termofílicos não tenham a habilidade de crescimento em condições de anaerobiose, existem trabalhos mostrando o crescimento de *Humicola insolens* de forma significativa em condições de micro aerobiose superiores ao mesmo microrganismo, quando submetido à aerobiose em temperaturas elevadas (Henssen, 1957).

As pesquisas de Kurt Noack (1920) foram também direcionadas na tentativa de se determinar uma relação que pudesse evidenciar coeficiente envolvendo gramas de açúcar consumido por grama de micélio seco formado.

Ele observou que esta relação era a mesma tanto para *Thermoascus aurantiacus*, que crescia em um meio mínimo a 45 °C, quanto para o fungo mesofílico *Aspergillus niger*, que crescia a 25 °C. A partir deste coeficiente obtido em seus experimentos, ele estimou que de uma forma geral o metabolismo destes dois tipos de fungos deveriam ser bastante similares. Seus resultados estimavam que ambos os fungos convertiam cerca de 55% do açúcar para a síntese de biomassa e 45% para seu metabolismo (Noack, 1920). *Thermomyces lanuginosus* produz cerca de 100 g de biomassa úmida/mol de glicose utilizada, semelhante a um fungo mesofílico (Noack, 1920).

Muitos organismos têm a capacidade de modificar a composição de seus ácidos graxos presentes na membrana fosfolipídica em função da elevação de temperatura, mantendo assim a fluidez da membrana essencial à sobrevivência, uma vez que isto garante o adequado transporte de substâncias e enzimas para dentro e fora das células.

Um exemplo claro deste fenômeno é observado quando ao aumentarmos a temperatura do meio, ocorre em certos organismos um aumento considerável na proporção de ácidos graxos saturados incorporados aos fosfolipídios, ao passo que com a diminuição da temperatura uma maior proporção de ácidos graxos insaturados se faz

presente. Esta habilidade é chamada de Adaptação homeoviscosa (Shepherd *et al.*, 1981).

Wright e colaboradores examinaram que a falta de capacidade de regular-se a fluidez da membrana em *Talaromyces thermophilus* poderia ser um dos motivos pelo qual este fungo apresenta uma temperatura mínima de crescimento de aproximadamente 33 °C. Experimentos efetuados evidenciaram que o índice de insaturações dos ácidos graxos permaneceu inalterado mesmo em temperaturas oscilando entre 33 e 50 °C. Atribuíram adicionalmente a este fungo uma limitação metabólica, possivelmente associada a falta de enzimas específicas que restringiam a habilidade do microrganismo em converter oleato a linoleato em baixas temperaturas (Wright *et al.*, 1983).

Todavia os resultados com *Thermomyces lanuginosus* são diferentes. Para este fungo a concentração de ácido linoleico (18:2) a 30 °C foi encontrada como sendo o dobro da mesma concentração a 50 °C. O grau de insaturação de ácidos graxos incorporados aos fosfolipídios foi de 0,88 em um micélio de *Thermomyces lanuginosus* crescendo a 50 °C, mas este valor sobe para 1,0 em culturas mantidas entre 30 e 50 °C, e finalmente atinge até 1,06 em culturas que crescem a temperatura constante de 30 °C (Rajasekaran & Maheshwari, 1990).

Noack (1920) também estudou a respiração dos fungos termofílicos e verificou que a quantidade de oxigênio utilizado numa suspensão de micélio homogêneo de fungos termofílicos (*Thermomyces lanuginosus* e *Penicillium duponti*), medido por manometria Warburg, foi afetada consideravelmente em mudanças de temperatura mínima (30 °C) e temperatura ótima (50 °C). Em contraste a esta observação, para fungos mesofílicos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenicis* e *Trichoderma viride*) nenhum deles foi afetado pela mudança de temperatura entre 15 e 40 °C.

A base bioquímica para esta diferença não é conhecida, mas este comportamento pode ser significativo para explicar o crescimento de fungos termofílicos na natureza.

Se um micélio responde de maneira semelhante em um meio nutricionalmente pobre no solo, um determinado fungo que conseguir manter um grau de metabolismo ótimo num maior espectro de temperaturas pode ter uma vantagem competitiva considerável àqueles que não expressarem esta habilidade. Fungos mesofílicos ao contrário de fungos termofílicos são melhores adaptados ao solo onde as temperaturas variam apenas temporariamente.

A figura 5 mostra uma avaliação da quantidade de microlitros de O_2 consumido por mg de micélio seco por hora em um *shaker* comparando-se *Thermomyces lanuginosus* e *Aspergillus niger*.

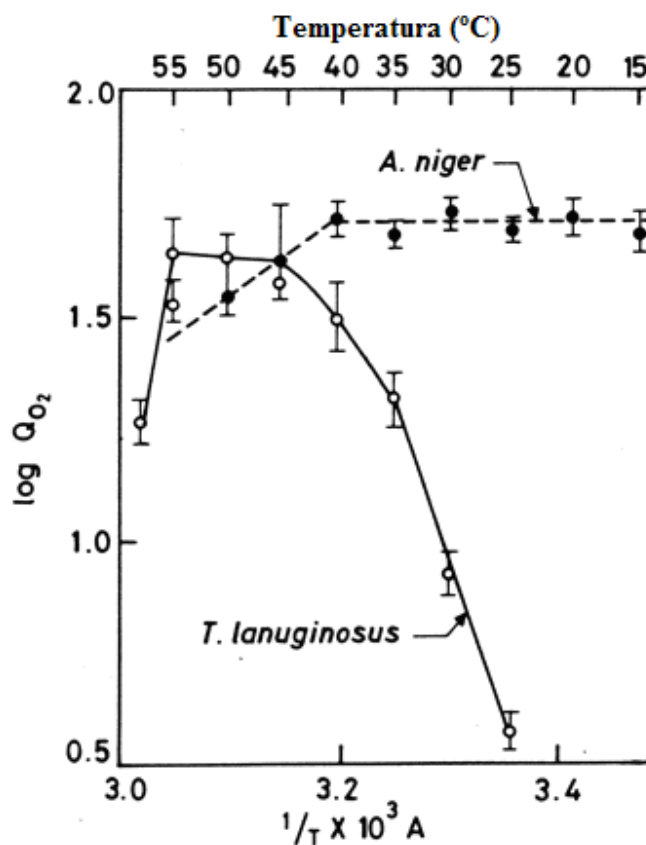


Figura 5. Curva de Arrhenius (Q_{O_2} - microlitros de O_2 / mg de micélio seco. h^{-1}). (Adaptado de Prasad *et al.*, 1979).

Fungos termofílicos utilizam predominantemente polissacarídeos constituintes da biomassa, em pilhas de compostagem, cujo principal componente é a celulose. (Chang, 1967). No entanto, alguns fungos termofílicos como *Thermomyces lanuginosus*, *Talaromyces duponti*, *Malbranchea pulchella* var. *sulfúrea*, *Mucor pusillus* e *Melanocarpus albomyces* não são capazes de utilizar a celulose como fonte de carbono (Hedger, 1974).

Essas espécies não celulolíticas podem crescer em pilhas de compostagem em comensalismo utilizando açúcares liberados durante a hidrólise da hemicelulose e da celulose por seus parceiros celulolíticos. Um bom exemplo desta associação é o *Thermomyces lanuginosus* que mostra grande crescimento em culturas mistas quando associado ao fungo celulolítico *Chaetomium thermophile* (Palanivelu *et al.*, 1984).

De uma forma geral, muitas espécies não celulolíticas utilizam a xilana, a qual caracteriza-se por ser uma porção mais externa à celulose na célula vegetal e é portanto a fonte de carbono mais acessível (Prabhu & Maheshwari, 1999). Efetivamente isto pode ser confirmado quando alguns fungos como *Chaetomium thermophile* e *Humicola insolens* crescem de forma mais efetiva na presença de xilana do que quando submetidos a açúcares simples (Chang, 1967). A secreção de enzimas extracelulares termoestáveis que degradam polissacarídeos e a simultânea captura de açúcares disponíveis é um passo importante para fungos termofílicos em processos de auto-aquecimento de substratos.

Devido ao fato de ser indireta a medida da biomassa de fungos crescendo em polissacarídeos insolúveis, raramente a mesma é efetuada.

Maheshwari & Balasubramanyam (1988) estudaram o consumo de dois açúcares (glicose e sacarose) em meios de cultura onde foram inoculados *Thermomyces lanuginosus* e *Penicillium duponti*. Os resultados apontaram para um consumo concomitante de glicose e sacarose, sendo que a 50 °C, tanto *Thermomyces lanuginosus* quanto *Penicillium duponti* consumiram sacarose de forma mais rápida.

Adicionalmente, este fenômeno foi investigado apenas para *Thermomyces lanuginosus*. Seu crescimento em meios de cultura contendo apenas um tipo de açúcar (glicose ou sacarose) e em meios contendo uma mistura desses açúcares foi comparado a temperatura de 50 °C (Maheshwari & Balasubramanyam, 1988). Os resultados mostraram que a utilização de glicose e sacarose quando misturadas, foi inferior ao consumo desses açúcares separadamente, indicando que os dois açúcares juntos influenciaram seu consumo de forma recíproca na mistura. A utilização de sacarose na presença de glicose ocorre basicamente porque:

- i) A invertase é insensível à repressão catabólica da glicose
- ii) A atividade de captura da glicose é inibida pela própria glicose, assim como pela sacarose.

Ambos os açúcares na condição de 30 °C, foram consumidos em proporções semelhantes. Esta observação indica que a atividade dos transportadores de nutrientes e a sensibilidade de enzimas catabólicas à repressão pela glicose podem ser influenciados de forma diferenciada em diferentes temperaturas.

Os fungos termofílicos são capazes de sintetizar proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* - HSP's) e adquirir termotolerância. Trent *et al.* (1994) observaram que os conídios de *Thermomyces lanuginosus* germinados a 50 °C e expostos a choque térmico a 55 °C por 60 minutos antes da exposição a 58 °C, mostraram aumento da capacidade de sobrevivência quando comparados a conídios que não eram expostos a choques térmicos. Essa termotolerância era, no entanto, eliminada se a síntese de proteínas durante o choque térmico era inibida pela ação de ciclohexamida (Trent *et al.*, 1994).

2.4.1.1 Enzimas do fungo

Enzimas de fungos termofílicos têm sido estudadas como candidatas em procesos biotecnológicos, e em menor escala, para que seja estabelecido um parâmetro de comparação entre semelhanças e diferenças em potencial de suas propriedades físico-químicas quando comparadas às enzimas de fungos mesofílicos. A seguir, apresentar-se-á algumas das mais destacáveis e conhecidas enzimas produzidas por estes microrganismos.

i) **PROTEASE:** *Thermomyces lanuginosus* e *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* exibiram a capacidade de produzir halos em uma placa contendo ágar e caseína, indicando assim atividade proteolítica. Os fungos produziram proteases durante sua fase de crescimento micelial na presença de 2 a 8% m/v de caseína respectivamente, sugerindo que a produção enzimática era induzida pela proteína presente no meio (Stevenson & Gaucher, 1975).

ii) **LIPASES:** Lipases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis e síntese de ésteres envolvendo ácidos graxos de cadeia longa. Estas enzimas expressam o fenômeno conhecido como ativação interfacial, como por exemplo o aumento da atividade catalítica nos agregados lipídicos (micelas) preferencialmente a monômeros de lipídios em solução aquosa. Quando usadas como componentes de detergentes de lavanderia, as lipases demonstram-se estáveis em pH 10 a 11 e temperaturas oscilando entre 30 a 60 °C (Arima *et al.*, 1972).

Omar e colaboradores relataram que a produtividade e a termoestabilidade de lipases podem variar entre diferentes cepas de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*). Estes pesquisadores desenvolveram e otimizaram um meio contendo sorbitol, xarope de milho, óleo de silicone (anti-espumante) e óleo de mamona como indutor da produção enzimática.

Com pH sendo mantido entre 7 e 8 e temperatura fixada em 45 °C, a produção máxima de enzima ocorreu após 30 horas. Seguindo-se a precipitação em acetona e sucessivas etapas de purificação por cromatografia, obtiveram uma enzima termicamente estável a 60 °C (Omar *et al.*, 1987).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase; Novo Industri S/A) vem sendo utilizada já industrialmente em formulações de detergentes em conjunto com outras enzimas microbianas (protease, amilase, celulase, etc.) (Derewenda *et al.*, 1994).

Adicionalmente as lipases têm aplicações na indústria de alimentos e são usadas em procesos de biocatálise de transformações estereoseletivas (Jaeger & Reetz, 1998).

Lipases (Lipozyme; Novo Industri S/A) produzidas por *Rhizomucor miehei* são utilizadas para a produção de manteiga de cacau que é um substituto mais barato que o óleo de cacau propriamente dito (Boel *et al.*, 1986).

iii) **α -AMILASE:** α -Amilase hidrolisa as ligações α -1,4-glicosídicas em amido e produzem maltose e oligossacarídeos de vários tamanhos. Todas as espécies de fungos termofílicos até hoje estudadas têm a capacidade de secretar amilases (Fergus, 1969). Todavia, apenas a α -amilase de *Thermomyces lanuginosus* foi caracterizada. A adição de Tween 80 a culturas submersas munidas de agitação provoca um aumento na produção de α -amilase. Esta enzima produziu altos níveis de maltose em um meio de cultura contendo batata.

Estas α -amilases produzidas por *Thermomyces lanuginosus* mostraram uma massa molecular de 54 kDa e tiveram sua termoestabilidade aumentada com a adição de uma solução contendo Ca^{+2} (Mishra & Maheshwari, 1996).

iv) **GLUCOAMILASE:** Glucoamilase é uma enzima que tem a capacidade de hidrolisar as ligações α -1,4-glicosídicas e menos freqüentemente as ligações α -1,6-glicosídicas de terminações não redutoras do amido, produzindo β -D-glicose como produto único. Durante o crescimento de *Thermomyces lanuginosus* em um meio contendo amido, este fungo expressa a capacidade de produzir glucoamilase, a qual é separada das demais α -amilases por procedimentos convencionais de purificação de enzimas (Rao *et al.*, 1981).

Embora a maltose tenha sido relatada como sendo como um bom indutor à produção de glucoamilase para este fungo, o seu crescimento em meios contendo amido propiciam a produção simultânea de glucoamilase e α -amilase, mas ao contrário da α -amilase, a glucoamilase deste fungo é menos estável termicamente quando na presença de íons Ca^{+2} (Mishra & Maheshwari, 1996).

Esta glucoamilase mostrou a capacidade de conversão de até 76% de amido solúvel em glicose em intervalos de 24 horas, indicando assim que esta enzima não é sensível a inibição por terminação.

v) **XILANASE:** Assim como a celulose, a xilana também caracteriza-se por um polissacarídeo estrutural presente em abundância na natureza. Sua degradação completa exige no entanto uma ação conjunta de uma série de enzimas hidrolíticas: as endoxilanases as quais aleatoriamente clivam ligações β -1,4 da xilose, as β -xilosidases que hidrolisam xilooligômeros e outras enzimas como a α -glucuronidase e α -arabinose que liberam açúcares que estão presentes nas cadeias laterais da xilana (Biely, 1985).

As xilanases de fungos termofílicos têm recebido atenção especial devido à sua aplicação na indústria do papel, como um agente bio clarificante que facilita a remoção da lignina da polpa, sem a utilização de cloro.

vi) **LACASE**: Lacases são enzimas contendo cobre que catalisam a reação de oxidação de compostos fenólicos a qual é acompanhada pela redução do oxigênio da água. A quantidade de substratos oxidados pode variar de uma lacase para outra. Os núcleos fenólicos são oxidados por um agente removedor de elétrons, gerando assim um produto conhecido como radicais livres fenóxi, os quais são passíveis de *posteriori* polimerização. Assim, a atividade de lacases pode ser um importante fator na polimerização de compostos fenólicos em substâncias húmicas (Chefetz *et al.*, 1998).

O gene que codifica lacase em *Myceliophthora thermophila* foi clonado e expressado em *Aspergillus oryzae* e a enzima recombinante foi purificada.

A atividade ótima da enzima ocorreu em pH de 6,5 e permaneceu completamente ativa mesmo quando incubada por 60 °C por 20 minutos. Esta enzima tem a capacidade de polimerizar matéria orgânica de baixa massa molar solúvel em água e que foi isolada de compostagem, produzindo compostos de alta massa molar. Esta propriedade sugere que esta enzima efetivamente possa estar envolvida em processos de humificação durante a compostagem (Chefetz *et al.*, 1998).

vii) **FITASE**: Fitases (*myo*-inositol hexakisfosfato fosfohidrolases) catalisam a hidrólise do ácido fítico (*myo*-inositol hexakisfosfato) gerando mono, di, tri, tetra e penta-fosfatos de *myo*-inositol e fosfato inorgânico.

O ácido fítico é a reserva primária de fósforo em algas marinhas. Fitases termoestáveis que possuem alta eficiência catalítica têm boas perspectivas comerciais visto que podem ser usadas como um agente que aumenta a capacidade de absorção do fósforo presente em rações para porcos. Genes que codificam a fitase em diversos fungos, incluindo as espécies termofílicas *Myceliophthora thermophila*, *Talaromyces thermophilus* e *Thermomyces lanuginosus* foram clonados e expressados em hospedeiros heterólogos. Aparentemente tratam-se de glicoproteínas de massa molecular 63, 128 e 99 kDa respectivamente (Wyss *et al.*, 1999).

2.4.1.2 Morfologia do fungo

Thermomyces lanuginosus pertence ao grupo dos fungos anamórficos, também referidos como Deuteromycotina, Deuteromycetes, Fungos Imperfeitos, Fungos Assexuais, Fungos Conidiais ou ainda, Fungos Mitospóricos, que compreende aproximadamente 2600 gêneros e 20000 espécies. Estes fungos são disseminados por propágulos que não se formam de células onde a meiose tenha ocorrido (Kirk *et al.*, 2001). Alguns fungos anamórficos aparentam ter perdido sua sexualidade e suas funções são algumas vezes substituídas por um mecanismo referido como ciclo parasexual. Neste tipo de reprodução apenas fenômenos mitóticos estão envolvidos.

Um fungo é referido como holomorfo quando ele exibe as fases assexuada e sexuada ao mesmo tempo. Isto quer dizer que no mesmo micélio podem ser encontradas estruturas que produzem conídios e que produzem ascos. Quando o micélio apresenta somente estruturas conidiais dizemos que o fungo está na fase assexuada, imperfeita ou anamórfica. Já no caso de apresentar somente estruturas de reprodução sexuada, chamamos de fase perfeita ou teleomorfa (Bononi & Grandi, 1998).

Os anamórficos podem ser unicelulares, possuir pseudomicélio ou mais comumente ter hifas bem definidas e micélio desenvolvido, com ramificações e septos evidentes. As hifas podem ser hialinas, constituídas por células multinucleadas e núcleos haplóides. Várias estruturas somáticas podem ser encontradas no micélio como clamidósporos, armadilhas para capturar nematóides, haustórios, apressórios e bulbilhos (Bononi & Grandi, 1998).

Os conídios são as unidades de disseminação das espécies, sendo uma estrutura de origem assexual, especializada e imóvel. Podem ser esféricos, ovóides, elípticos, clavados, filiformes, espiralados, estrelados e tantas outras formas. Podem ser produzidos um a um ou em grupos. Quando em grupos, podem estar em cadeias simples ou ramificadas e facilmente destacáveis das cadeias, ou ainda estarem agrupados em massa mucilaginosa (Bononi & Grandi, 1998).



Figura 6. Conídios e conidióforos de *Thermomyces lanuginosus* (aumento 1600x).

Obs: Imagem adaptada (microscopia eletrônica) de Atlas of Clinical Fungi (de Hoog et al., 2002).

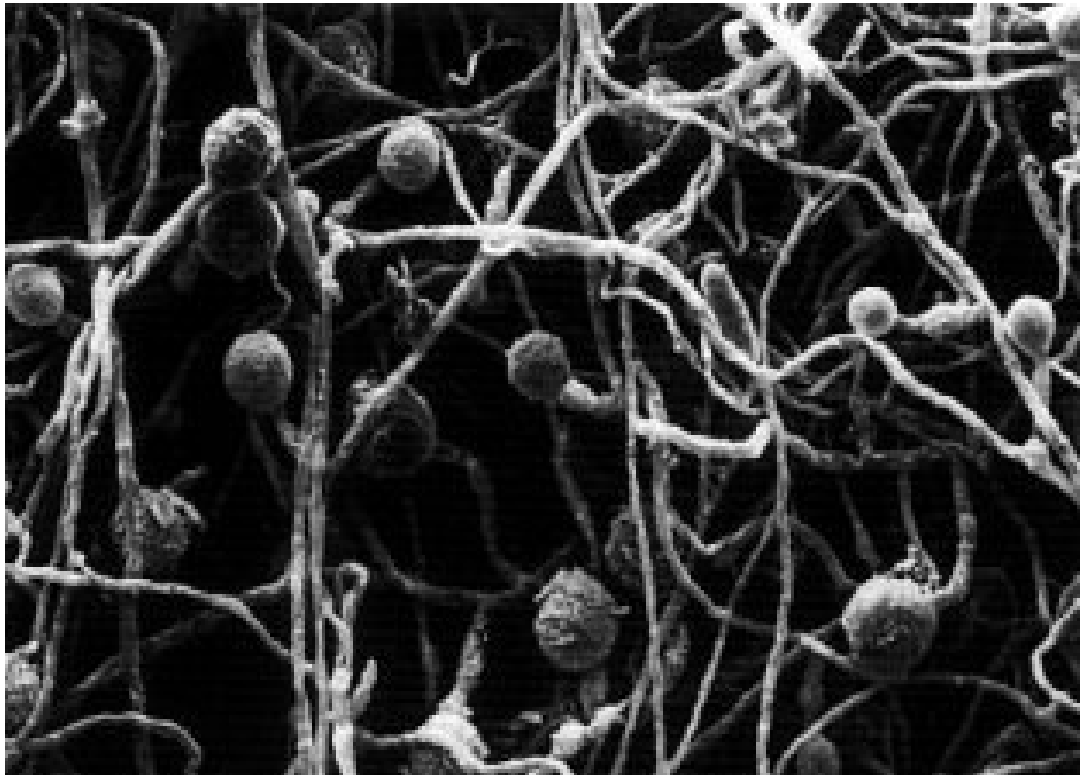


Figura 7. Conídios e conidióforos de *Thermomyces lanuginosus* (aumento 1350x).

Obs: Imagem adaptada (microscopia eletrônica) do Atlas of Clinical Fungi (de Hoog et al., 2002).

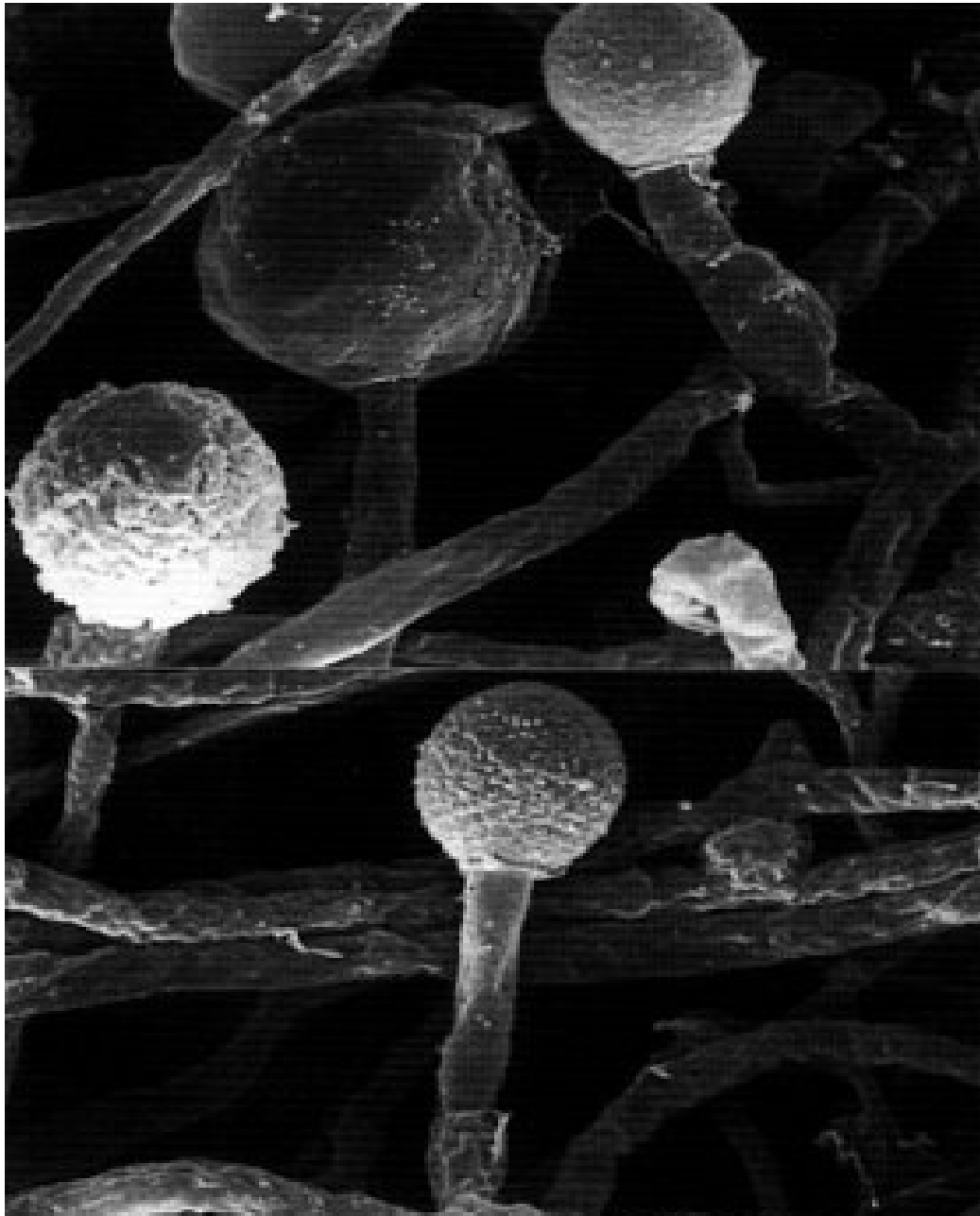


Figura 8. Conídios e conidióforos de *Thermomyces lanuginosus* (aumento 5500x).

Obs: Imagem adaptada (microscopia eletrônica) do Atlas of Clinical Fungi (de Hoog et al. ,2002).

O gênero Hyphomycete *Thermomyces* é muito semelhante a *Humicola* Traaen 1914 e tem sido associado por diversos outros autores (Cooney & Emerson, 1964). Ele pode no entanto ser distinguido pelos conídios os quais apresentam uma superfície ornamentada e são geralmente suportados por conidióforos bem definidos (Cooney & Emerson, 1964).

Como já foi mencionado, seus conidióforos são curtos medindo de 10 a 15 μ , não ramificados ou raramente ramificados e neste caso, sempre próximo a base. São sempre septados, com ângulos geralmente a direita dos filamentos. Apresentam conídios simples em cada conidióforo, esféricos, sem cor e de parede macia quando jovens, tornando-se marrom escuro e escurados quando maduros, medindo de 6 a 10 μ de diâmetro (Cooney & Emerson, 1964).

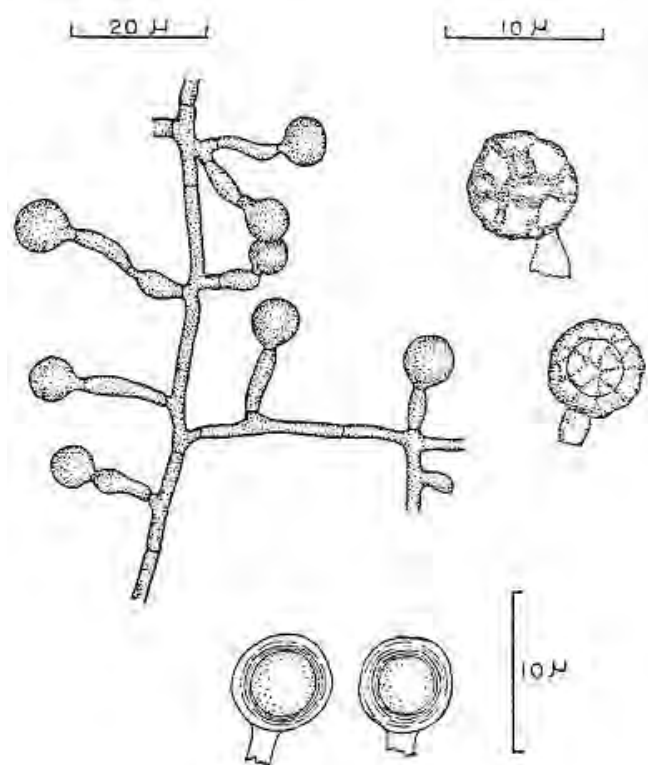


Figura 9. Ilustração de conidióforos e conídios de *Thermomyces lanuginosus*. (Adaptado de Cooney, Emerson, 1964).

Suas hifas são desprovidas de cor, septadas e apresentando diâmetro de 1,5 a 4 μ (Figura 10).

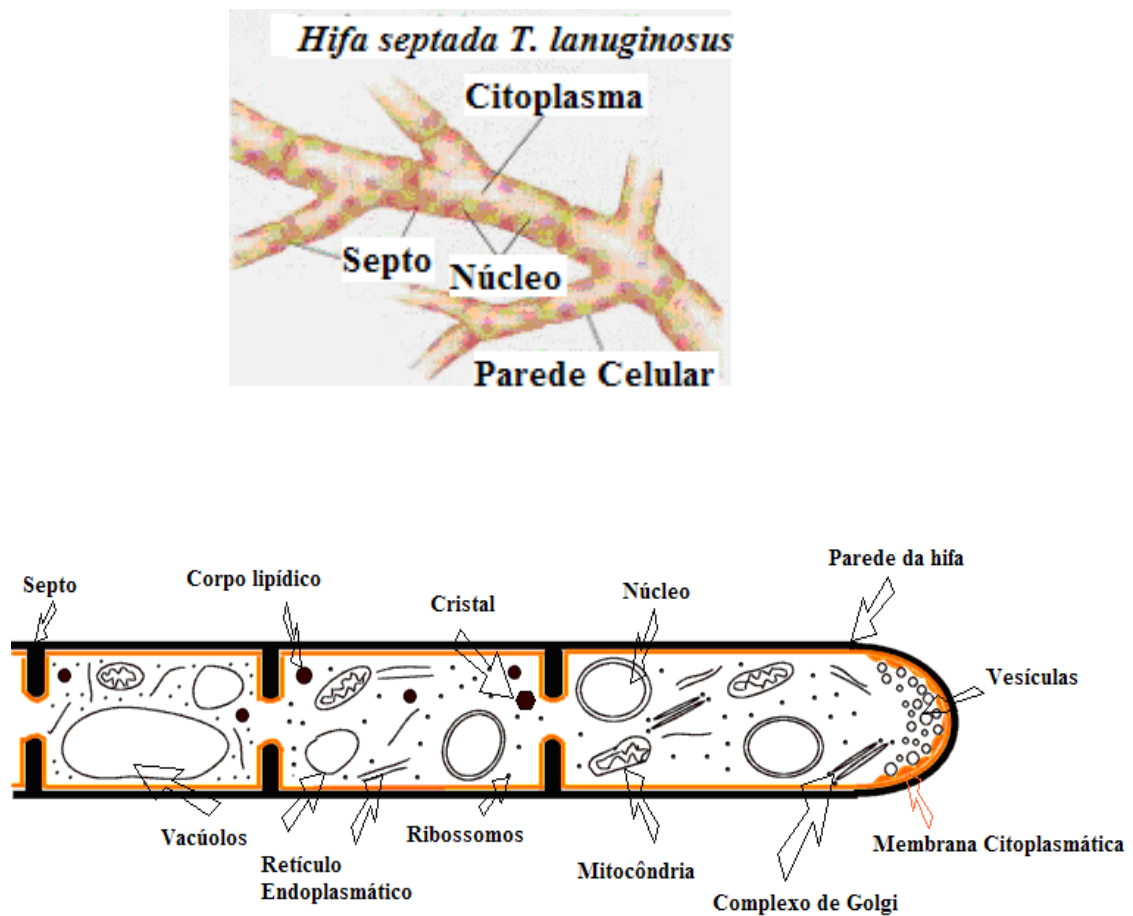


Figura 10. Ilustração de hifa septada de *Thermomyces lanuginosus* (Adaptado de Alexopoulos et al., 1996).

Todas as espécies conhecidas até hoje são termofílicas. As culturas de *Thermomyces lanuginosus* crescem rapidamente, atingindo de 2,5 a 5,0 cm de diâmetro em diversos meios a temperatura de 45-50 °C em dois dias (Cooney & Emerson, 1964). Inicialmente apresentam coloração branca e aspecto aveludado, tornando-se posteriormente verde acinzentado, púrpura escuro e eventualmente até negras. Uma característica marcante é a difusão de um pigmento róseo ou vinho que espalha-se rapidamente no agar durante o crescimento do microrganismo (Figura 11) (Cooney & Emerson, 1964).

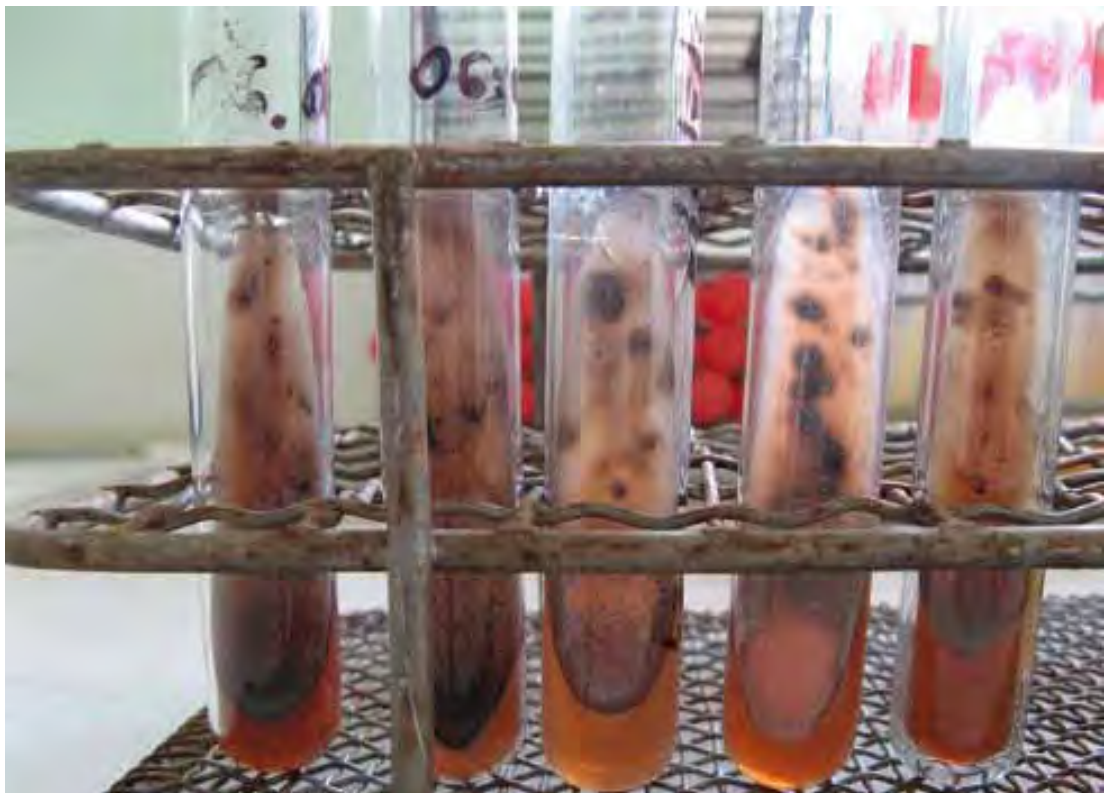


Figura 11. Tubos de cultura de *Thermomyces lanuginosus* mostrando a difusão de pigmentação rósea (Cooney & Emerson, 1964).

Os conídios geralmente se manifestam em conidióforos que atingem de 10 a 15 μm , sendo globosos, de coloração marrom escuro, de paredes espessas e superfície rugosa, e têm de 6 a 10 μm de diâmetro.

Thermomyces lanuginosus foi impropriamente descrito e em consequência disto foi rejeitado ou ignorado por diversos autores, até que sua descrição tivesse sido executada de modo correto.

Uma análise química de seu micélio, mostrou cerca de 21,4% de ácidos graxos C_{16} , 4,5% de ácidos graxos saturados C_{18} e 65,2% de ácidos graxos C_{18} contendo uma insaturação (Cooney & Emerson, 1964). Nos conidióforos foi encontrado ácido dipicolínico, o qual tem importante participação na resistência a altas temperaturas neste microrganismo. A figura 12 mostra dois isômeros do ácido dipicolínico que podem ser encontrados em hifas de *Thermomyces lanuginosus*.

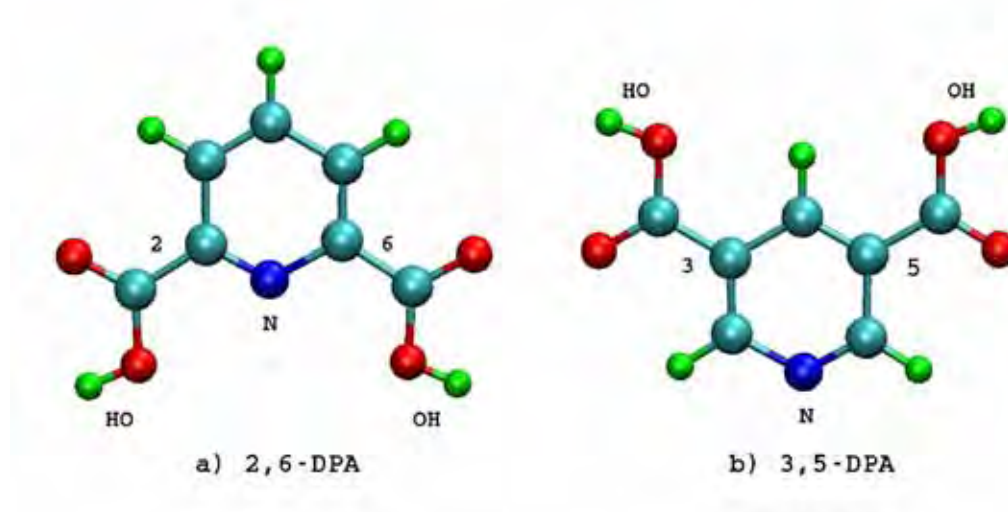


Figura 12. Isômeros do ácido dipicolínico.

Quando *Thermomyces lanuginosus* cresce em altas temperaturas é possível visualizar-se em suas hifas por microscopia ótica, uma membrana densa e formada por ligações entre lipídios (Cooney & Emerson, 1964).

2.4.1.3 Crescimento do fungo

A ocorrência de *Thermomyces lanuginosus* é praticamente global, tendo sido já isolado nas Ilhas Inglesas, Dinamarca, Itália, Estados Unidos, Canadá, Nigéria, Ghana, África do Sul, Índia, Indonésia, Brasil e Japão (Cooney & Emerson, 1964).

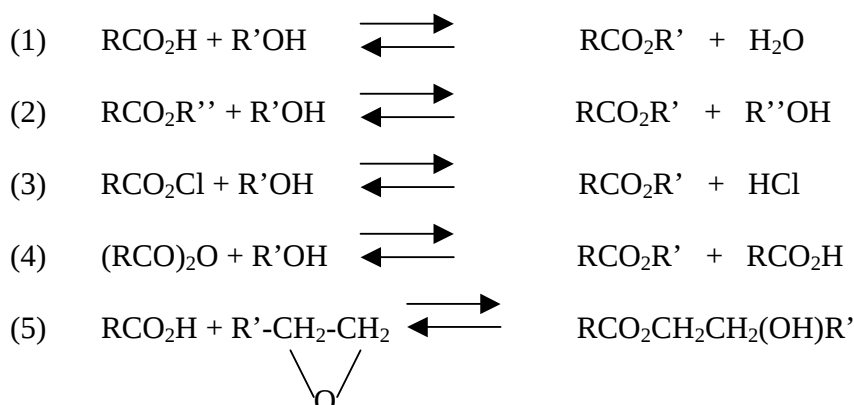
Um bom crescimento e concomitante esporulação ocorrem entre temperaturas de 40 e 55 °C, sendo a temperatura ótima de 47,5 a 52,5 °C e a temperatura mínima de crescimento até 30 °C. Os melhores crescimentos *in vitro* foram obtidos em PDA, ágar glicose-peptona, ágar extrato de levedura, ágar caldo de carne e agar-amido (YpSs). A morte por aquecimento deste microrganismo deu-se a 68 °C por 45 minutos, embora alguns conidióforos fossem capazes de sobreviver a 100 °C por 5 minutos. Em temperatura acima de 55 °C muito *Mycelia esterilia* foi formado. O pH ótimo *in vitro* foi de 6,8 a 7,3. Nenhum crescimento verificou-se em concentrações de O₂ abaixo de 0,7% e nenhuma esporulação ocorreu abaixo de 1,0% de O₂ (Cooney & Emerson, 1964). *Thermomyces lanuginosus* é incapaz de crescer num meio cuja fonte de carbono seja celulose, mas pode beneficiar-se de comensalismo com algum fungo celulolítico. A hemicelulose pode ser utilizada, em particular a arabinoxilana (Cooney & Emerson, 1964).

A produção ótima de lipase ocorre em um meio contendo 2% de amido solúvel, mas também pode ocorrer produção desta enzima em outras fontes de carbono, tais como xilose, arabinose, glicose, etc. As fontes de nitrogênio são nitrato de amônia, uréia e asparagina. O fungo também pode utilizar ácido mirístico, oléico, palmítico, esteárico e glicerina em seu metabolismo. Produz substâncias húmicas quando cresce em substratos de madeira. Uma fosfatase ácida de considerável termoestabilidade é produzida também. Muitos plastificantes são atacados por esterases de *Thermomyces lanuginosus* (Cooney & Emerson, 1964).

2.5 Esterificação

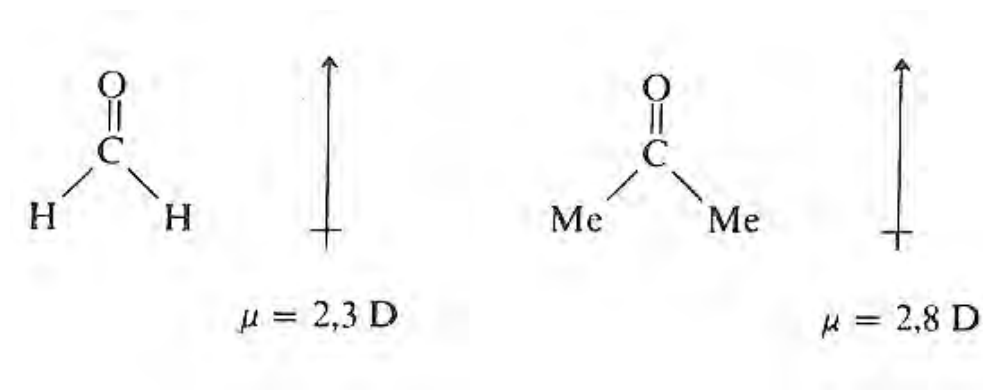
Alguns aspectos importantes das reações de esterificação serão apresentados para a compreensão da síntese enzimática de ésteres, utilizando fungos termofílicos.

Os grupamentos éster podem ser sintetizados através de reações de esterificação direta (1), transesterificação (2), reações de álcoois com cloretos de acila (3) e reações de álcoois com anidridos (4) ou reações de grupos carboxílicos com oxiranos (5) (Billmeyer, 1984).

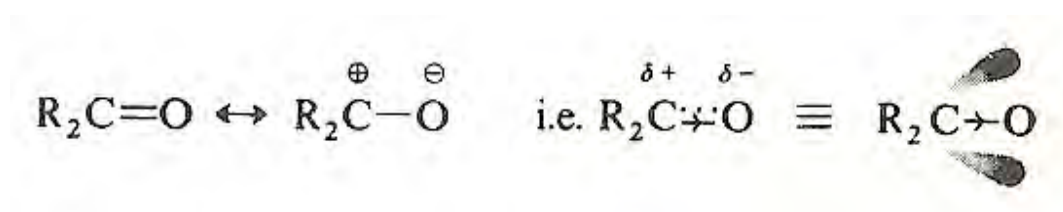


Cada uma das reações acima descritas, envolve uma adição nucleofílica ao grupo carbonila, adição esta que é facilitada pela natureza polar da dupla ligação carbono-oxigênio, pela habilidade do átomo de oxigênio da carbonila assumir a forma negativamente carregada e finalmente pela configuração planar do carbono que minimiza interferências estéricas (Stevens, 1990).

Os compostos carbonílicos apresentam momentos dipolares (μ) visto que o átomo de oxigênio é mais eletronegativo que o átomo de carbono.

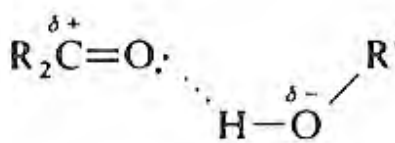
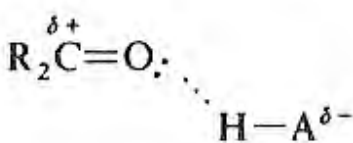
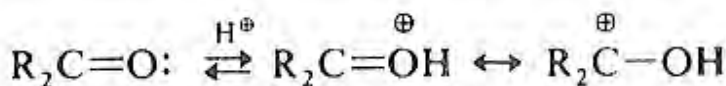


O efeito indutivo $\text{C} \rightarrow \text{O}$ que atua na ligação σ que une os dois átomos, afeta também os elétrons π mais facilmente polarizáveis, de tal maneira que podemos representar também o grupo carbonila pela estrutura híbrida conforme esquema abaixo.



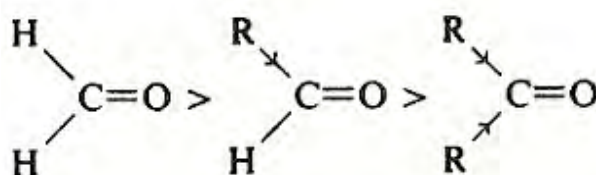
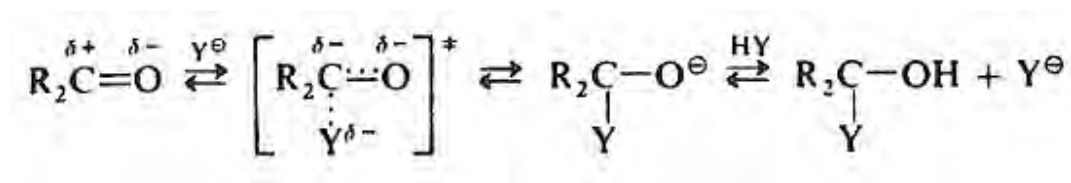
Devido a sua natureza bipolar, a carbonila pode sofrer ataque eletrófilo de uma espécie X^+ ou X no oxigênio ou principalmente ataque nucleófilo de uma espécie Y^- ou Y no carbono (as reações de adição de compostos carbonílicos induzidas por radicais são raras) (Morrison & Boyd, 1996).

Na prática, o ataque eletrófilo inicial no oxigênio tem pouco significado, a não ser quando o eletrófilo é um ácido (ou ácido de Lewis), caso em que uma protonação rápida e reversível pode ser o prelúdio de um ataque lento, determinante da velocidade, de um nucleófilo no carbono, para completar a adição (catálise ácida). A protonação aumenta o caráter positivo de átomo de carbono e facilita assim o ataque nucleófilo nesse átomo. Uma ativação semelhante (embora menos pronunciada), pode também resultar do estabelecimento de ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da carbonila e um ácido, ou até mesmo um solvente hidroxilado.

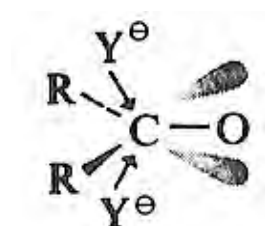


Entretanto, enquanto os ácidos podem ativar o carbono carbonílico, simultaneamente podem reduzir a concentração do nucleófilo real. Observa-se assim que muitas reações de adição simples a compostos carbonílicos têm um pH ótimo, fato que pode ser de grande importância para efeitos preparativos (Sykes, 1981).

Nas adições nucleofílicas simples em que a etapa determinante da velocidade é o ataque por Y^- , o caráter positivo do átomo de carbono carbonílico é reduzido ao passar-se do estado inicial para o estado de transição. Deve-se, prever portanto, uma redução na velocidade de adição por grupamentos R doadores de elétrons e um aumento na velocidade de adição por grupamentos R aceptores de elétrons, o que pode ser evidenciado no esquema a seguir.

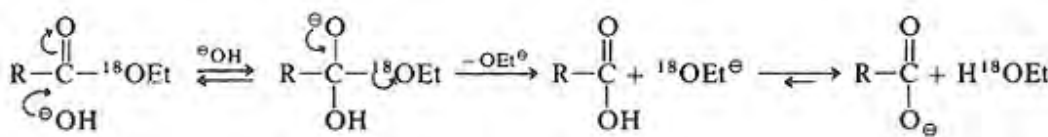


No que se refere aos efeitos estereoquímicos, a direção de aproximação do nucleófilo ao átomo de carbono carbonílico, que requer menor energia, é aquela acima ou abaixo do plano axial da carbonila, essencialmente planar. É também provável que ocorra no plano equatorial ao carbono da carbonila, devido à repulsão eletrostática entre o nucleófilo que se aproxima e a densidade eletrônica elevada no átomo de oxigênio carbonílico.



Um aumento no volume dos grupos R torna a reação mais lenta uma vez que o átomo de carbono hibridizado sp^2 no composto carbonílico original ($R-CO-R \sim 120^\circ$) é convertido num átomo de carbono hibridizado sp^3 no aduto e no estado de transição que o precede ($R-CO-R \sim 109^\circ$). Assim, os grupos R aproximam-se mais a medida que a reação procede (o estado de transição torna-se mais obstruído), aumentando assim o nível de energia e a velocidade de reação diminui, a medida que aumenta o tamanho de R. A queda da velocidade de reação observada ao longo de uma série de compostos carbonílicos $H_2C=O > RHC=O > R_2C=O$ é portanto determinada quer por fatores eletrônicos, quer por fatores estereoquímicos. Para um determinado composto carbonílico, o aumento do tamanho do nucleófilo também pode provocar pela mesma razão, o decréscimo da velocidade de reação (Morrison & Boyd, 1996).

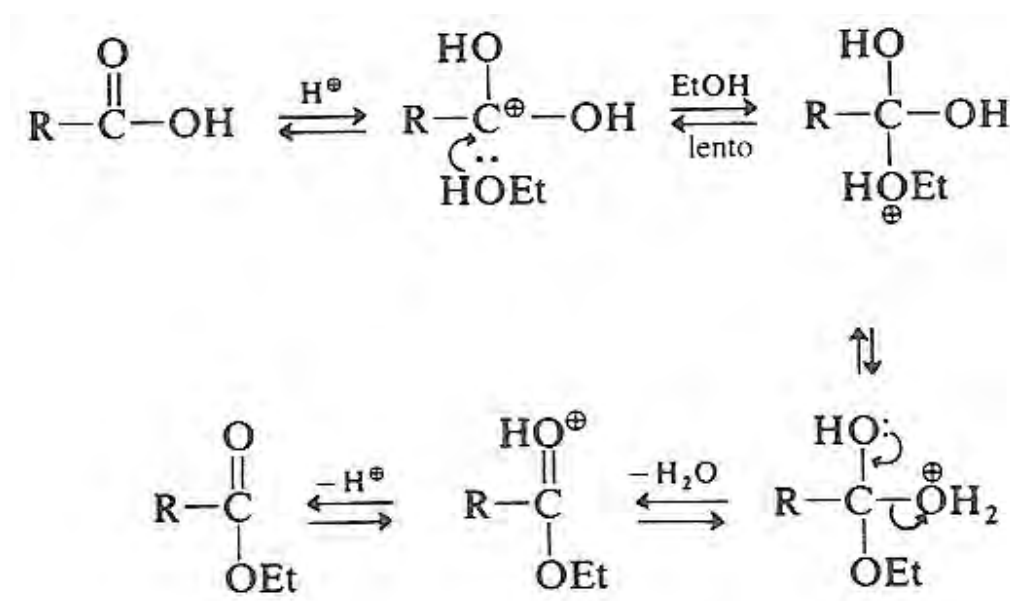
Uma reação que tem sido objeto de muitos estudos é a hidrólise de ésteres por base aquosa OH^- . Verifica-se que a cinética é de segunda ordem, e experiências com marcação isotópica com ^{18}O demonstraram que este composto sofre normalmente uma ruptura acilo-oxigênio compatível com o mecanismo geral envolvendo um intermediário tetraédrico.



A etapa determinante da velocidade é quase com certeza o ataque de OH^- no éster inicial e a reação global é irreversível, já que OEt^- tem a capacidade de remover um próton, enquanto que o ânion carboxilato não é mais suscetível ao ataque nucleofílico por EtOH ou OEt^- . Esse mecanismo é geralmente designado como $B_{AC}2$ (catalisado por base, ruptura acilo-oxigênio, bimolecular). Quando o ataque nucleofílico é feito por OR^- ao invés de OH^- , ocorre transesterificação, e obtém-se um mistura em equilíbrio de ambos os ésteres (a posição de equilíbrio irá depender constantemente das concentrações relativas e capacidades nucleófilas relativas respectivamente de OEt^- e OR^- (Sykes, 1981).

Em reações catalisadas por ácido, é difícil efetuar o ataque ao carbono carbonílico de RCO_2H com nucleófilos do tipo geral Y^- , já que geralmente estes compostos abstraem um próton e o RCO_2^- resultante não é suscetível ao ataque nucleofílico.

Os nucleófilos mais fracos da forma YH (exemplo: ROH) não apresentam esta limitação, mas as suas reações com o átomo de carbono da carbonila relativamente pouco reativo (RCO_2H) são lentas.

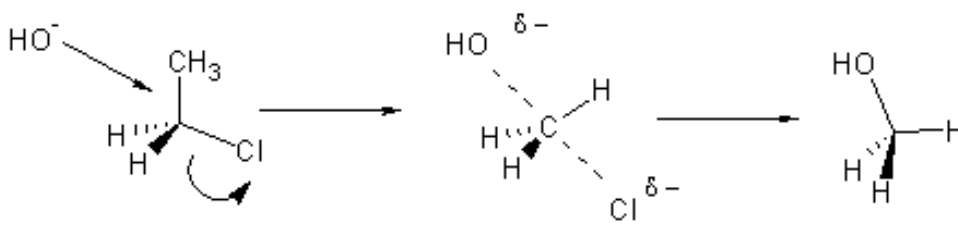


A espectrometria de r.n.m. apóia a protonação preferencial do átomo de oxigênio carbonílico do ácido na reação direta (esterificação), e do éster na reação inversa (hidrólise). A catálise ácida também tem o efeito de fomentar a perda do grupo de saída (Morrison & Boyd, 1996).

O equilíbrio pode ser deslocado no sentido pretendido, utilizando-se para tal excesso de ROH (ou de H₂O para a hidrólise). Esse mecanismo é geralmente designado A_{AC}2 (catalisado por ácido, ruptura acilo-oxigênio, bimolecular).

2.5.1 Substituições Nucleofílicas Bimoleculares (S_N2).

Uma reação diz-se bimolecular quando (a pressão e temperatura constantes) a sua velocidade depende da concentração de dois reagentes. Isto significa que o passo limitante da reação (o passo mais lento), envolve colisão de duas moléculas.



No estado de transição o carbono está rodeado por cinco substituintes: existe uma ligação parcialmente formada entre o carbono e o oxigênio, ao mesmo tempo que, a ligação entre o carbono e o cloro se rompe. Nesta reação ocorre inversão de configuração.

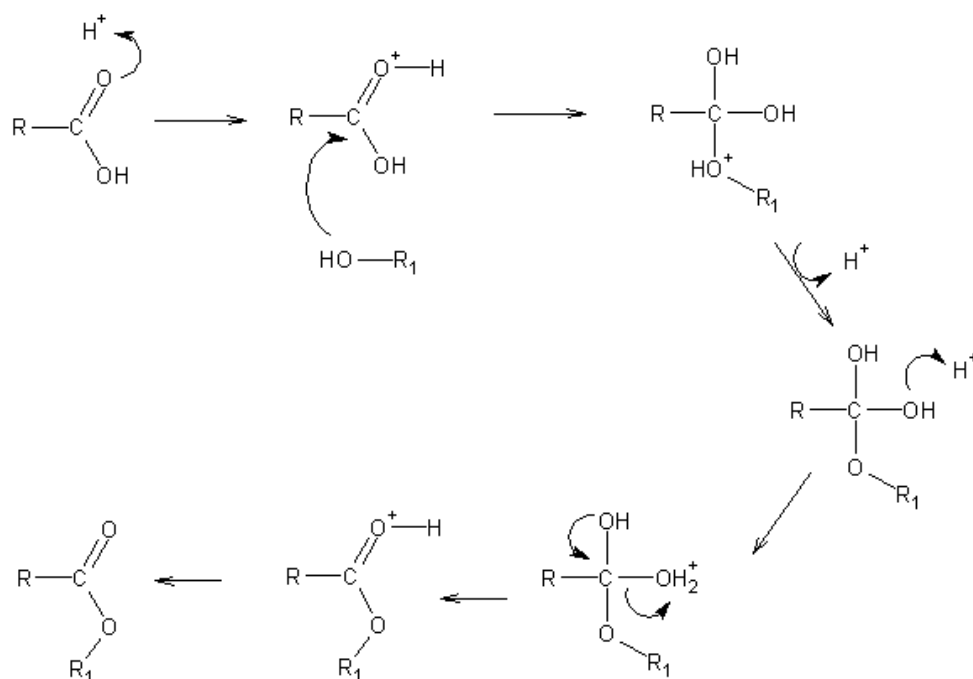
As condições básicas para a ocorrência desta reação são:

- Os nucleófilos deverão ser muito ativos. Por exemplo: RO^- , HO^- , I^- , CN^- . Nestes casos, os nucleófilos têm tendência a reagir com o átomo central ainda antes do grupo migrante sair.
- Os carbonos atacados não deverão ter grupos capazes de estabilizar cargas positivas. Portanto, SN_2 ocorrerá bem em carbonos primários.
- Os grupos que rodeiam o carbono devem ser pequenos, para permitir a presença simultânea de cinco grupos em torno do átomo central.

Quanto ao solvente, a reação tanto pode ser acelerada como retardada. Tudo depende da comparação dos estados inicial e de transição. Se forma-se carga, solventes polares favorecerão SN_2 . Nas outras situações, a reação será retardada por solventes polares.

Os ésteres podem ser facilmente preparados por condensação de um ácido carboxílico com um álcool em condições de catálise ácida. Os catalisadores comumente utilizados na indústria são geralmente organometálicos derivados de Sn, Ti e Pb. As temperaturas de cocção podem variar de 150 a 250 °C, sendo que também muitas vezes em sínteses industriais, solventes promotores de azeotropia são utilizados (azeótropos), facilitando assim a remoção da água formada e deslocando o equilíbrio da reação no sentido desejado.

As reações abaixo ilustram este tipo de síntese (Carey & Sundberg, 1990).



A protonação do átomo de oxigênio da carbonila, produz uma ressonância intermediária estabilizada, a qual é sensível à presença de nucleófilos.

A carga positiva do intermediário atrai uma molécula de álcool, levando à formação de uma ligação entre o carbono da carbonila e um átomo de oxigênio. Forma-se, portanto, um intermediário tetraédrico.

Em condição de reações, moléculas de solvente rapidamente transferem prótons de um átomo de oxigênio para outro.

O intermediário produzido segue uma reação de desidratação. Esta é uma típica reação de álcoois protonados.

2.6 Fungos Termofílicos na Biotecnologia: Síntese Enzimática de Ésteres

Durante as duas últimas décadas, pesquisas relacionadas à lipases fúngicas envolvendo fungos termofílicos têm recebido atenção especial. As lipases têm sido também estudadas do ponto de vista acadêmico e industrial, devido sua multiplicidade de usos, sendo que de várias possibilidades, destaca-se a capacidade de promover a catálise da hidrólise de triacilgliceróis (Figura 13) (Johri *et al.*, 1999).

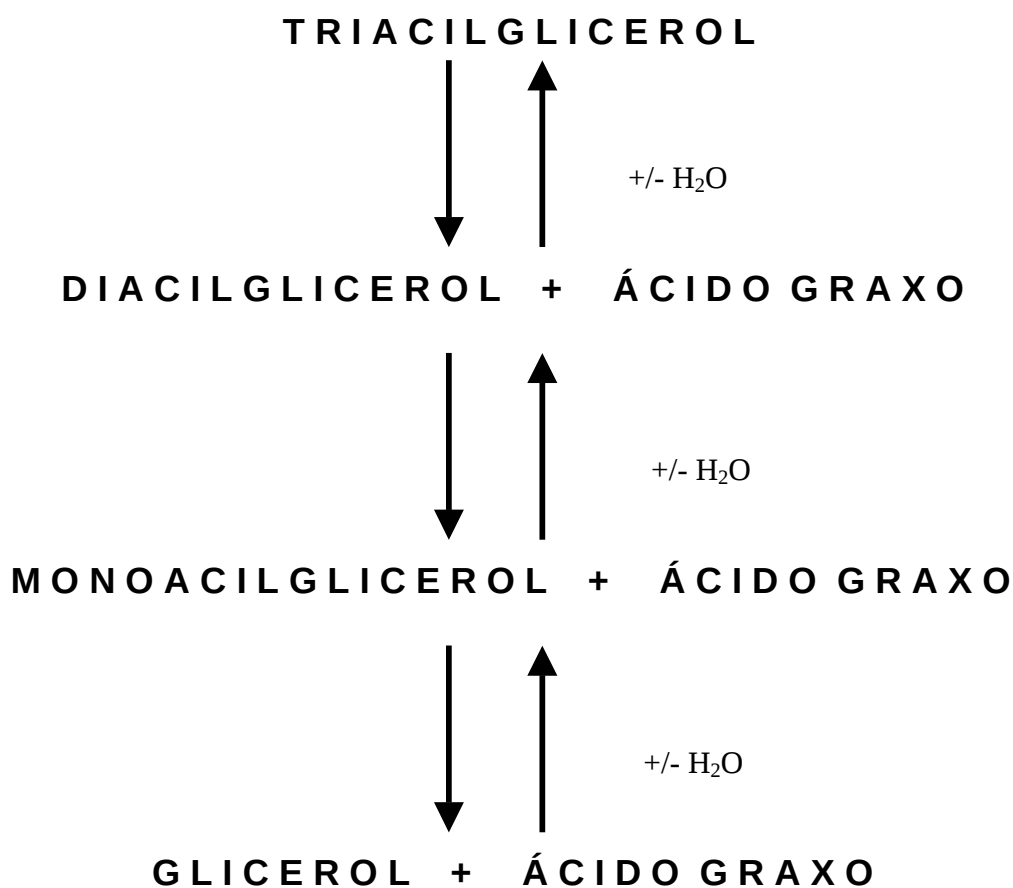


Figura 13. Hidrólise de triacilglicerol (Adaptado de Johri *et al.*, 1999).

Muitas lipases obtidas de fungos termofílicos revelam boa estabilidade térmica além de serem tolerantes a meios alcalinos.

Admite-se, em geral, que a produção de lipase está associada a uma concentração de nitrogênio superior a qualquer concentração de outro elemento qualquer, quando a produção de uma determinada enzima é desejada. A tabela 1 mostra a influência do meio em relação à produção de lipase.

Tabela 1. Influência do meio de cultura na produção de lipase. (Adaptado de Johri *et al.*, 1999).

Microrganismo	Meio/Temperatura/pH	Lipase (U/mL)
<i>Humicola grisea</i>	Glicose 45 °C 5,7	25
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amido-peptona 45 °C 6,5	4
<i>Humicola laniginosa I</i>	Farelo de trigo 45 °C 6,5	16,2
<i>Humicola lanuginosa II</i>	Farelo de trigo 45 °C 6,5	9,2
<i>Mucor pusillus</i>	Glicose 45 °C 5,7	28
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Glicose - Ftalatos 45 °C 5,7	4
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Glicose - Ftalatos 45 °C 5,7	20

Todavia um resultado relevante foi obtido com *Sporotrichum termophile* que foi imobilizado em alginato, para a produção de lipase em bateladas. A tabela 2 revela os interessantes resultados obtidos por Johri *et al.*, 1999.

Tabela 2. Produção de lipase por *Sporotrichum termophile* imobilizado.

Sistema	Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Atividade Específica
Células livres	40	3,63	20,74
Alginato + Esporos	40	3,57	23,03
Alginato + Micélio	18	5,40	14,50
Quitosana + Esporo	40	2,97	15,60
Carragenato + Esporo	40	3,03	22,95

Até 1961, nenhum procedimento para purificação de lipases de fonte animal, vegetal ou microbiana tinha sido estabelecido. O primeiro sucesso foi obtido apenas em 1973, com uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Johri *et al.*, 1999).

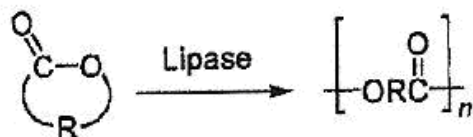
O potencial para catálise de reações de esterificação (efeito catalítico reverso à hidrólise) tem sido explorado recentemente. Alguns ésteres de álcoois terpênicos já foram obtidos mediante catálise conduzida por lipases purificadas e são atualmente utilizados em fragrâncias (Patterson *et al.*, 1979)

Recentemente, Kobayashi & Uyama conseguiram conduzir a síntese de poliésteres usando lipases como catalisadores (Kobayashi & Uyama, 2001). De acordo com suas conclusões, as lipases são efetivamente catalisadores que podem atuar sobre a hidrólise de ésteres de ácidos graxos quando em solução aquosa. Por outro lado solventes orgânicos funcionam, também, como catalisadores de esterificação, em transesterificação, sob condições anidras.

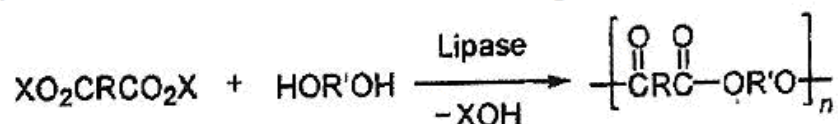
Em termos gerais, aceita-se que uma reação enzimática possa ser virtualmente reversível, e que o equilíbrio é controlado pelas condições impostas ao meio reacional. Baseando-se neste conceito, muitas hidrolases, podem ser empregadas como catalisadores para as reações reversas da hidrólise (esterificação).

A figura 14 evidencia exemplos clássicos de reações típicas que poderiam ser conduzidas pela ação favorável e controlada de uma lipase fúngica.

Polimerização por abertura de anel de lactonas

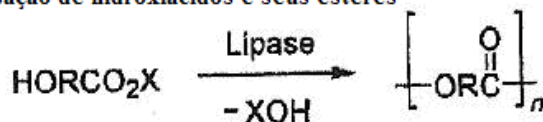


Policondensação de ácidos dicarboxílicos ou seus derivados com glicóis



X: H, alquil, alquil halogenado, vinil, etc.

Policondensação de hidroxiácidos e seus ésteres



X: H, alquil, alquil halogenado, vinil, etc.

Figura 14. Exemplos de catálise com lipase (Adaptado de Kobayashi & Uyama, 2001).

Os fungos termofílicos são capazes de incluir muitos compostos em suas vias metabólicas e transformá-los, parcial ou totalmente, em produtos de síntese de grande interesse industrial (Tabela 3).

Tabela 3. Biotransformações na Indústria.

Processo	Biocatalisador	Operando desde	Empresa
Interesterificação	Lipase	1983	Unilever
Hidrólise de ésteres	Lipase	1988	Sumitomo
Transesterificação	Lipase	1990	Unilever
Acilação	Lipase	1996	BASF

A figura 15 mostra uma planta de biotransformações, utilizando lípases, em plena atividade na Alemanha desde 1996 (cortesia BASF AG).

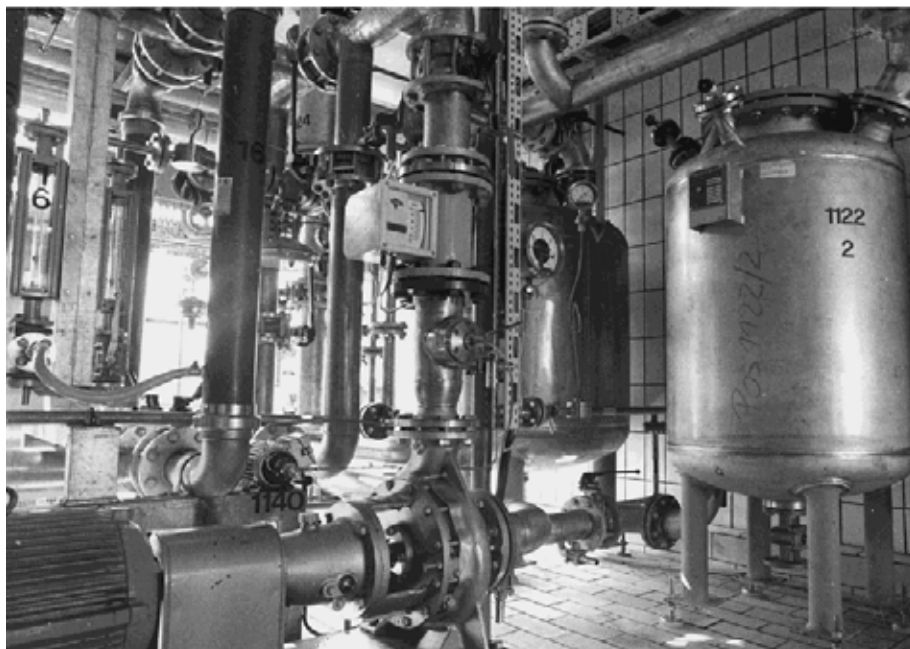


Figura 15. Planta e Reatores de acilação (cortesia BASF AG).

2.6.1 Interação entre fungos e poliésteres

Para a difusão dos nutrientes solúveis e metabolismo normal dos fungos, faz-se imperiosa a presença de água disponível e acessível a estes microrganismos, o que de um certo modo, em se tratando de macromoléculas sintéticas, passa a ser um fator limitante diante da grande gama de polímeros apresentando características hidrofóbicas (Alexopoulos *et al.*, 1996). A introdução de uma determinada macromolécula em um meio de crescimento pode induzir o microrganismo à produção de enzimas, metabólitos e por vezes biofilmes de interesse específico (Soncini *et al.*, 2004).

Dentre estes, o poli(L-ácido láctico) PLLA é um polímero biodegradável cuja temperatura de transição vítrea (Tg) é de 60°C e temperatura de fusão (Tf) de cerca de 130 a 180°C (Lunt, 1998), aplicável na área médica em produtos de implante e em cápsulas de liberação controlada de drogas (Motta & Duek, 2006). Devido à presença de grupos ésteres na cadeia, ele é hidrolisável no corpo humano (Loo *et al.*, 2004). Por ser formado a partir do ácido láctico, apresenta altíssima densidade de grupamentos ésteres.

Se uma eventual biodegradação for por meio de enzimas, a cadeia polimérica deverá ajustar aos sítios ativos das enzimas, o que é favorecido pela flexibilidade das cadeias poliméricas alifáticas (Chandra & Rustgi, 1998). Este poliéster pode ser produzido a partir de recursos renováveis por vários métodos (Tsuji *et al.*, 2002). É um polímero importante por suas propriedades tecnológicas, boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas (Jain, 2000).

A biodegradação de polímeros é influenciada por vários fatores incluindo massa molar, cristalinidade, estrutura química, composição co-polimérica, estereoquímica, balanço hidrofílico/hidrofóbico e mobilidade de cadeia. As enzimas se organizam para diminuir a hidrofobicidade e tornam os sítios ativos das moléculas dos polímeros mais acessíveis a sua ação. Sendo assim, uma diminuição na tensão superficial (aumento de hidrofiliidade) é um fator importante na biodegradação (Rizzarelli *et al.*, 2004).

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Materiais

Os materiais e microrganismos utilizados são descritos conforme segue.

3.1.1 Meios de Cultura

O meio de cultura que se demonstrou extremamente favorável ao crescimento do fungo termofílico e propiciou boas condições para uma avaliação de aspectos inerentes à morfologia e capacidade de adaptação do microrganismo, foi o meio YpSs: *yeast-starch agar medium* (Cooney & Emerson, 1964).

Quando necessário, a fonte de carbono utilizada (amido solúvel) foi substituída diversas vezes criando assim variantes que serão abaixo descritas em função do interesse específico da investigação.

Meio YpSs (Emerson, 1941)

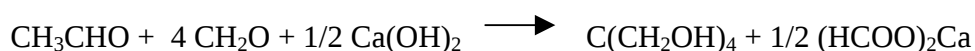
Extrato de levedura.....	0,40 g
K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Amido solúvel.....	1,50 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

Este meio de cultura será denominado doravante como “YpSs Standard”.

Meio YpSs variante I

Extrato de levedura.....	0,40 g
K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Pentaeritritol.....	1,50 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

O Pentaeritritol (2,2-Bis(hidroximetil)-1,3-propanodiol; pentaeritrita, tetrahidroximetilmetano; tetrakis(hidroximetil)metano; tetrametilolmetano) de grau técnico é um pó cristalino branco, inodoro e não higroscópico. É solúvel em água, pouco solúvel em álcoois e insolúvel em benzeno, tetracloreto de carbono e éteres a temperatura ambiente. É formado pela condensação do formaldeído com o acetaldeído em meio básico (condensação aldólica seguida de reação de Cannizaro) (Carey & Sundberg, 1990).



Sua estrutura contém quatro grupos metilóis arranjados simetricamente em torno de um átomo central de carbono. (Figura 16). Grande parte do Pentaeritritol é aplicada na produção de resinas alquídicas, utilizadas na formulação de tintas e vernizes. O Pentaeritritol é utilizado na produção de resinas e lubrificantes. Os ésteres de ácidos graxos de Pentaeritritol também são utilizados como lubrificantes, devido à sua resistência a altas temperaturas.

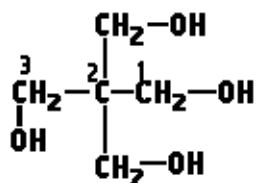


Figura 16. Pentaeritritol.

Meio YpSs variante II

Extrato de levedura.....	0,40 g
K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Ácido Oleico.....	1,50 g
Tween 40.....	0,05 g
Triton X-100.....	0,05 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

O ácido oleico é um ácido graxo monoinsaturado encontrado em várias fontes de origem animal e vegetal. Sua fórmula empírica é C₁₈H₃₄O₂ e sua nomenclatura de acordo com a IUPAC é ácido cis-9-octadecanóico, (18:1 cis-9). Pode ser produzido pela hidrólise do sebo bovino e é largamente empregado na indústria de ésteres graxos (Carey & Sundberg, 1990). Uma vez que o ácido oleico não é solúvel em água, a elaboração de um meio de cultura com esta fonte de carbono exigiu a elaboração de uma emulsão que fosse o mais estável possível.

Uma emulsão consiste em uma fase líquida suspensa na forma de minúsculas gotículas em um segundo líquido. Para o caso de YpSs variante I, este segundo líquido é a água e as gotículas compõem-se de ácido oleico (“óleo-na-água”). A adição de Triton X-100 (α -[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]- ω -hydroxypoly(oxy-1,2-ethanediyl) e Tween 40 (polisorbato) criou também condições de emulsões estáveis, em outros exemplos abaixo mencionados em que a fonte de carbono não é solúvel em água.

Meio YpSs variante III

Extrato de levedura.....	0,40 g
K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Dioleato de Pentaeritritol.....	1,50 g
Tween 40.....	0,05 g
Triton X-100.....	0,05 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

Dioleato de pentaeritritol consiste num éster de pentaeritritol e ácido oleico de massa molar aproximadamente 700 g/mol, sintetizado em laboratório. (Tabela 4).

Tabela 4. Dioleato de Pentaeritritol.

Matéria-prima	Número de mol
A.....Pentaeritritol	0,85 a 1,00
B.....Ácido oleico	2,35 a 2,55
C.....Organometálico	ppm's
D.....Hidrocarbonetos	1,00 a 2,00

✓ Carregar “A”, “B”, “C” e “D”. Ligada agitação do balão e introduzida cobertura com N₂. Aquecer para 250 °C. Manter sob cocção e refluxo até o fim da obtenção da água de reação (azeotropia). Ao atingir-se o índice de acidez desejado, resfriar e descarregar.

Meio YpSs variante IV

Extrato de levedura.....	0,40 g
K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

A criação de YpSs variante IV visa a avaliação de resultados numa condição onde o fungo não têm nenhuma fonte de carbono disponível além de suas reservas e componentes inerentes ao extrato de levedura.

Meio YpSs variante V

K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

A criação de YpSs variante V visa a avaliação de resultados numa condição onde o fungo não têm nenhuma fonte de carbono ou extrato de levedura.

Meio YpSs variante VI

K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Amido solúvel.....	1,50 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

A criação de YpSs variante VI visa a avaliação de resultados numa condição onde o fungo não têm extrato de levedura disponível.

Meio YpSs variante VII

K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Pentaeritritol.....	1,50 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

A criação de YpSs variante VII visa a avaliação de resultados numa condição onde o fungo não têm extrato de levedura disponível.

Meio YpSs variante VIII

K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Ácido Oleico.....	1,50 g
Tween 40.....	0,05 g
Triton X-100.....	0,05 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

A criação de YpSs variante VIII visa a avaliação de resultados numa condição onde o fungo não têm extrato de levedura disponível.

Meio YpSs variante IX

K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Dioleato de pentaeritritol.....	1,50 g
Tween 40.....	0,05 g
Triton X-100.....	0,05 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

A criação de YpSs variante IX visa a avaliação de resultados numa condição onde o fungo não têm extrato de levedura disponível.

Meio YpSs variante X

Extrato de levedura.....	0,40 g
K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
1,6-Hexanodiol.....	1,50 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

O 1,6-Hexanodiol é constituído de cristais brancos, altamente higroscópicos e de baixo ponto de fusão, solúveis em água e em ácidos graxos como por exemplo o ácido oleico. Sua estrutura contém seis carbonos apresentando duas hidroxilas nas extremidades (Figura 17).

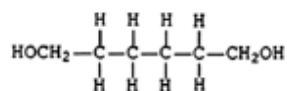


Figura 17. 1,6-Hexanodiol.

A produção de 1,6-Hexanodiol dá-se por hidrogenação seletiva do adipato de dimetila. O 1,6-Hexanodiol é utilizado na produção de resinas e lubrificantes. Os ésteres de ácidos graxos de 1,6-Hexanodiol também são utilizados como lubrificantes, e encontram aplicações diversas na indústria química.

Baseando-se nos parâmetros de solubilidade de Hansen, evidencia-se que pentaeritritol e ácido oleico são compostos imiscíveis. Assim, visando a melhor disponibilização das fontes de carbono ao microrganismo, um diol solúvel em ácido oleico foi avaliado adicionalmente. Esta solubilidade do diol em ácido oleico se faz possível pela presença de uma cadeia de 6 carbonos alifáticos em 1,6-Hexanodiol, aproximando os parâmetros de solubilidade δ_H , δ_P e δ_D dos valores pré-determinados para o ácido oleico (Hansen, 1967). De forma análoga, o éster obtido através de uma reação de síntese envolvendo ácido oleico e 1,6-Hexanodiol também foi avaliado.

A criação de YpSs variante X visa a comparação dos parâmetros de crescimento do fungo na presença de um glicol (1,6-Hexanodiol) alternativo a outro glicol (Pentaeritritol).

Meio YpSs variante XI

Extrato de levedura.....	0,40 g
K ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Dioleato de 1,6-Hexanodiol.....	1,50 g
Tween 40.....	0,05 g
Triton X-100.....	0,05 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

Dioleato de 1,6-Hexanodiol consiste num éster de 1,6-Hexanodiol e ácido oleico de massa molar aproximadamente 650 g/mol, sintetizado em laboratório. (Tabela 5).

Tabela 5. Dioleato de 1,6-Hexanodiol.

Matéria-prima	Número de mol
A.....1,6-Hexanodiol	0,95 a 1,05
B.....Ácido oleico	1,70 a 1,75
C.....Organometálico	ppm's
D.....Hidrocarbonetos	1,00 a 2,00

✓ Carregar “A”, “B”, “C” e “D”. Ligada agitação do balão e introduzida cobertura com N₂. Aquecer para 220 °C. Manter sob cocção e refluxo até o fim da obtenção da água de reação (azeotropia). Ao atingir-se o índice de acidez desejado, resfriar e descarregar.

A criação de YpSs variante XI visa a avaliação do crescimento do fungo tendo como fonte de carbono um éster sintetizado em laboratório.

Meio YpSs variante XII

Extrato de levedura.....	0,40 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Amido solúvel.....	1,50 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

A criação de YpSs variante XII visa a avaliação de resultados numa condição onde o fungo não tem K₂HPO₄ disponível.

Meio YpSs variante XIII

Extrato de levedura.....	0,40 g
Na ₂ HPO ₄	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Amido solúvel.....	1,50 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

A criação de YpSs variante XIII visa a avaliação de resultados numa condição onde o fungo tem K₂HPO₄ substituído por Na₂HPO₄.

Meio YpSs variante XIV

Extrato de levedura.....	0,40 g
KNO ₃	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Amido solúvel.....	1,50 g
Ágar.....	2,00 g
H ₂ O.....	100 mL

A criação de YpSs variante XIV visa a avaliação de resultados numa condição onde o fungo têm K₂HPO₄ substituído por KNO₃.

Portanto, a elaboração dos meios YpSs variantes XII, XIII e XIV, tiveram a finalidade de associar a produção do pigmento róseo, por parte de *Thermomyces lanuginosus*, a um eventual componente do meio de cultura.

Para a avaliação de variações de índice de acidez e resultados de cromatografia gasosa, foram preparados os “MEIOS REACIONAIS”, contendo ou a combinação de um glicol (pentaeritritol ou 1,6-Hexanodiol) e ácido oléico, ou então, apenas o éster sintetizado quimicamente.

Meio Reacional A

Pentaeritritol.....	16,48 g
Ácido Oleico.....	83,15 g

Meio Reacional B

Dioleato de Pentaeritritol.....	100,00 g
---------------------------------	----------

Meio Reacional C

1,6-Hexanodiol.....	19,60 g
Ácido Oléico.....	80,40 g

Meio Reacional D

Dioleato de 1,6-Hexanodiol.....	100,00 g
---------------------------------	----------

Para a avaliação de possíveis efeitos indutores sobre a produção de lipases de *Thermomyces lanuginosus*, este fungo termofílico foi inoculado em meios contendo poliácido láctico, de massa molar 100.000 g/mol, gentilmente doado pelo Sr. Dr. Agnelli Dema – Universidade Federal de São Carlos.

3.1.2 Reagentes

➤ Alginato de Sódio & Cloreto de Cálcio

O alginato de sódio (gentilmente cedido pela Labysynth Produtos para Laboratórios) e cloreto de cálcio, utilizados tais como recebidos.

➤ Hidróxido de Potássio 0,1 N

A solução de hidróxido de potássio 0,1N (KOH, Eq.: 56,11, fator 0,9919) foi utilizada para titular amostras e calcular o Índice de Acidez (I.Ac.).

O hidróxido de potássio absorve CO₂ e é altamente higroscópico, sendo portanto necessária a padronização desta solução para a correta leitura do índice de acidez de uma determinada substância ou solução. Como indicador, foi utilizada solução de fenolftaleína 1 % m/v em álcool metílico.

3.1.3 Microrganismo

***Thermomyces lanuginosus* Tsiklinskaya 1899**

Também denominado: *Sepedonium lanuginosum* Griffon and Maublanc 1911

Sepedonium thermophilum cyclosporum Velich 1914

Sepedonium thermophilum ovosporum Velich 1914

Acremoniella sp. Rege 1927

Acremoniella thermophila Curzi 1929

Monotospora lanuginosa (Griffon and Maublanc) Mason 1933

Humicola lanuginosa (Griffon and Maublanc) Bunce 1961

Culturas do fungo foram doadas gentilmente pelo Professor Doutor Roberto da Silva, pertencente ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE – São José do Rio Preto, São Paulo. O fungo foi recebido em meio sólido de Sabouraud.

3.2 Métodos

Os métodos utilizados são descritos conforme segue:

3.2.1 Manutenção do Fungo

As colônias foram mantidas sempre em meio de cultura YpSs a 50 °C (Estufa de Cultura Modelo 002B – Fanem), com transferências e repiques periódicos (intervalos de 14 dias).

O crescimento e aspectos correlatos de *Thermomyces lanuginosus* foram avaliados nos 15 meios de cultura acima descritos (item 3.1.1), em intervalos de tempo pré-determinados, onde todos os meios de cultura considerados foram previamente esterilizados (Autoclave Vertical Phoenix AV75).

O fungo *Thermomyces lanuginosus* teve um crescimento melhor em meio de levedura e amido (Yeast/Starch – YpSs). Para a manutenção da viabilidade deste microrganismo sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas, o método de preservação Castellani foi escolhido. (Castellani, 1967).

Após o cultivo em placa de Petri contendo meio YpSs, *Thermomyces lanuginosus* foi mantido por 7 dias a 50 °C, mostrando um crescimento vigoroso. Com o auxílio de uma espátula estéril, blocos de 4 a 6 mm de camada fina foram cortados e transferidos assepticamente para frascos contendo 10 a 15 mL de água previamente esterilizada. Os frascos foram fechados com tampões de algodão revestidos com papel alumínio (também previamente esterilizados) e armazenados em geladeira com temperatura de aproximadamente 8 °C.

A recuperação da cultura foi feita para a averiguação da viabilidade do isolado fúngico após um período de pouco mais de 32 meses (2 anos e 8 meses). Para tanto, após a aclimatização à temperatura ambiente, fragmentos do micélio preservado foram inoculados em meio YpSs e incubados a 50 °C por 7 dias.

A acidez residual de cada meio de cultura foi medida antes e depois do processo de esterilização mediante titulometria, assim como também avaliou-se o pH (pHgâmetro Digital Digimed DMPH-1).

3.2.2 Método de micro-cultivo

O método de micro-cultivo consiste na inoculação de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs e incubação por 7 dias a 50 °C. Após este período, sobre um novo disco de YpSs de aproximadamente 15 mm de diâmetro faz-se o repique do fungo, cobrindo este disco com uma lamínula esterilizada e incubando-se por um período de apenas 3 dias a 50 °C (neste caso, 7 dias a 50 °C provocariam uma desidratação proibitiva no disco de meio de cultura YpSs).

A lamínula é retirada e após coloração com lactofenol azul de algodão é submetida à leitura de microscopia ótica.

3.2.3 Obtenção e Encapsulamento do Micélio

O micélio do fungo foi obtido conforme o esquema da figura 18. Após o crescimento do microrganismo em um meio líquido escolhido (YpSs e suas variantes sem a adição de ágar), as hifas foram lavadas por 3 vezes com solução salina 0,85 % m/v e um triturador de vidro foi utilizado para a fragmentação inicial das hifas do fungo termofílico (2,5 g de micélio – peso bruto). Este simples dispositivo propicia uma melhor desagregação das hifas, melhorando assim o encapsulamento (passo subsequente).

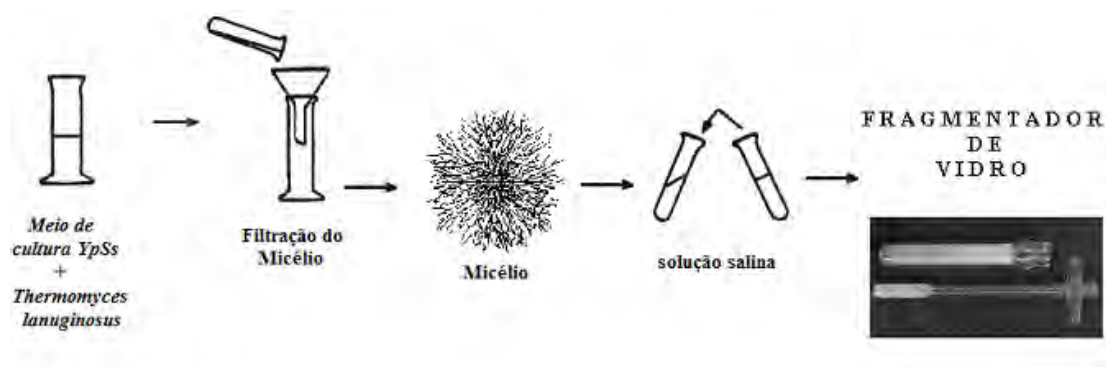


Figura 18. Obtenção do micélio de *Thermomyces lanuginosus* e posteriori fragmentação.

Após este procedimento, as hifas resultantes foram transferidas para uma solução de CaCl_2 gelada que foi mantida em um becker sob agitação magnética.

Paralelamente, 1,8 g de alginato de sódio foram dissolvidos em 100 mL de água destilada, e posteriormente esterilizado em auto-clave. Após o resfriamento desta solução (36 a 40 °C), a mesma foi transferida para um funil de adição previamente esterilizado.

A solução de alginato de sódio foi então adicionada lentamente (gota a gota) mediante a adaptação de um conta-gotas de diâmetro reduzido no funil de adição, sob a solução gelada de CaCl_2 contendo as hifas de *Thermomyces lanuginosus* pré-trituradas.

No bequer contendo as hifas do fungo termofílico, um agitador tipo hélice cortante foi adaptado, girando no sentido inverso à agitação magnética visando assim, melhorar a capacidade de fragmentação das hifas pré-trituradas.

A figura 19 ilustra o procedimento adotado. A esquerda o funil de adição com o conta-gotas adaptado e a direita, o bequer contendo CaCl_2 0,5 M gelado e as agitações propostas (sentidos inversos).



Figura 19. Funil de adição esterilizado e CaCl_2 gelado em agitação.

A figura 20 mostra a aparelhagem completa montada e pronta para iniciar o processo de encapsulamento das hifas (faltando apenas o motor elétrico para o agitador de hélice cortante).



Figura 20. Aparelhagem completa para encapsulamento.

Uma vez adaptado o motor elétrico, o método de encapsulamento tem início mediante a adição da solução de alginato de sódio a 36 – 40 °C (Figura 21).

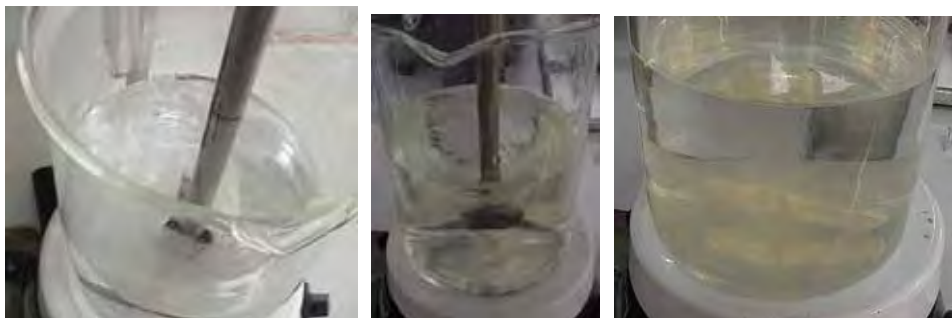


Figura 21. Obtenção dos *pellets* e micélio encapsulado.

A figura 22 mostra um esquema prático que ilustra a obtenção de hifas encapsuladas em géis de alginato de cálcio.

A técnica proposta no entanto, também gera muitos *pellets* vazios, o que foi parcialmente minimizado com a advento de uma agitação magnética em conjunto com um agitador dotado de hélice cortante no sentido inverso a agitação magnética, na solução gelada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e hifas fragmentadas.

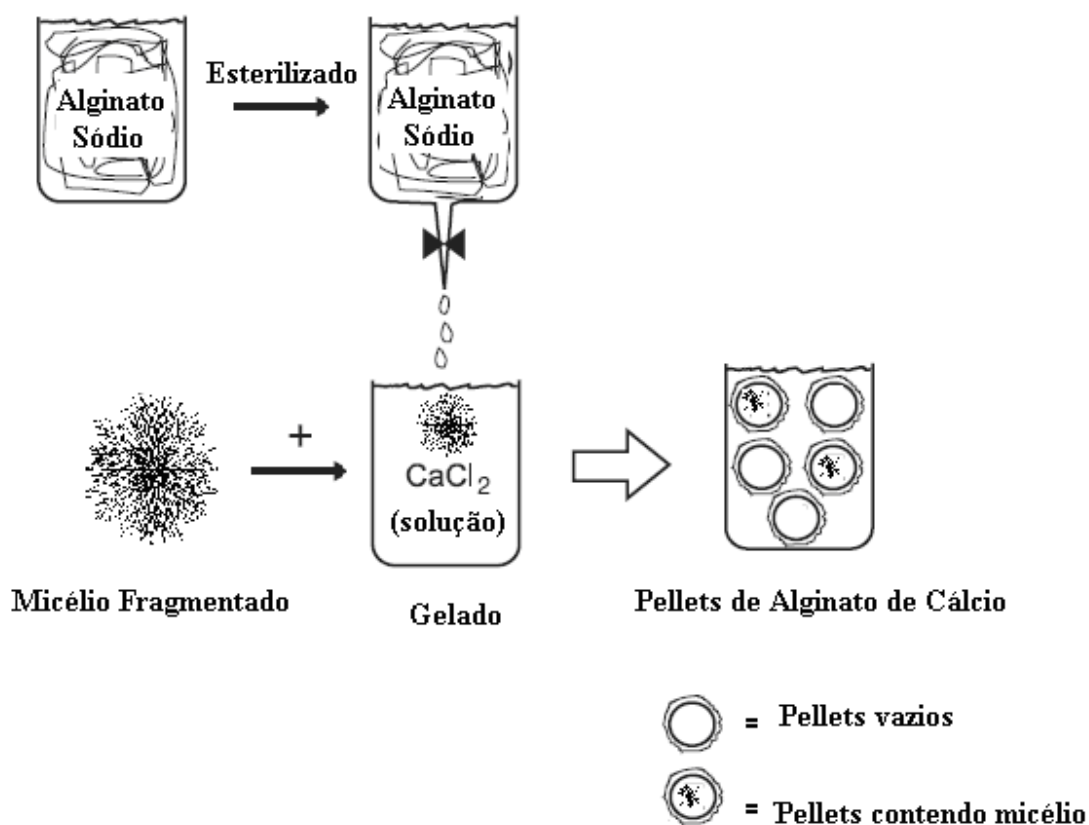


Figura 22. Esquema ilustrativo do encapsulamento das hifas.

3.2.3.1 Obtenção de *Pellet* único

Neste caso, após a inoculação do fungo, filtração e lavagem das hifas, as mesmas foram acondicionadas num tubo de cultura e adicionou-se sobre as mesmas a solução esterilizada de alginato de sódio a 36 – 40 °C e posteriormente CaCl₂ gelado. Todos *pellets* únicos foram preparados com aproximadamente 3 g de hifas (peso bruto).

3.2.4 Índice de Acidez

O Índice de Acidez (I.Ac.), expresso em mgKOH/g, faz-se mediante uso da seguinte expressão:

$$\text{I.Ac (mgKOH/g)} = \frac{\text{Vgasto KOH} \times 0,1 \times 56,11 \times F}{\text{massa de amostra}}$$

Onde: 0,1 = Normalidade da solução de KOH

56,11 = Equivalente grama de KOH

F = Fator de correção da solução de KOH

Por definição, o índice de acidez utilizado neste trabalho é o mesmo empregado convencionalmente no estudo do controle de qualidade e na síntese de ésteres ou polímeros que, de alguma maneira, envolvam grupamentos carboxilas em sua síntese. De acordo com a DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft), caracteriza-se pela massa de hidróxido de potássio, em miligramas, gasta na neutralização dos ácidos livres presentes em 1 g de amostra.

A amostra é dissolvida em solvente, ou mistura de solventes adequada (álcool etílico, xileno, tolueno, etc) e os ácidos presentes são titulados com solução padronizada de KOH e 5 gotas de indicador solução 1 % m/v de fenolftaleína em álcool metílico (Figura 23).



Figura 23. Leitura de Índice de Acidez por titulometria.

3.2.5 Medidas de pH

Ao contrário da temperatura que foi fixada em 50 °C, o pH para o crescimento de *Thermomyces lanuginosus* foi mensurado inicialmente quando da preparação dos meios e após o término do sexto dia de crescimento do fungo a 50 °C. Para isto, uma solução 1:1 em massa, com água destilada, foi preparada para cada meio YpSs e suas variantes, onde o fungo conseguiu expressar um crescimento significativo.

3.2.6 Medidas de FTIR

Os meios de cultura YpSs e suas variantes, e o respectivo crescimento de micélio nos mesmos foram submetidos a leituras de IR com transformada de Fourier, em equipamento Shimadzu, modelo FTIR-8300, com resolução de 4 cm⁻¹.

3.2.6.1 FTIR - Preparo de Amostras do Pigmento do Fungo

Thermomyces lanuginosus foi inoculado e incubado por 7 dias a 50 °C e, imediatamente após o descarte das hifas por raspagem, o meio YpSs foi mantido por mais 14 dias a 50 °C para a desidratação do mesmo. Os espectros foram obtidos mediante a elaboração de pastilhas de KBr.

3.2.6.2 FTIR – Preparo de Hifas

Para *Thermomyces lanuginosus*, após a inoculação do microrganismo em meios líquidos (sem ágar) YpSs Standard e suas variantes I, II, III e IV e incubação por 7 dias a 50 °C, as hifas foram separadas por filtração, lavadas com solução salina 0,9 % m/v e mantidas em estufa de cultura por 14 dias a 50 °C, para eliminação da maior quantidade de água possível. Os espectros foram obtidos mediante a elaboração de pastilhas de KBr.

3.2.7 Medidas de Cromatografia Gasosa

Os “MEIOS REACIONAIS” A, B, C e D foram submetidos a leituras de GC em equipamento Shimadzu Gas Chromatograph GC-14A acoplado a um microcomputador C-R4A Chromatopac, com coluna 1419 10% PEG de 20 metros e empacotamento CHR-WHP de 220 gramas, diâmetro 1/8” por 2 metros e detector FID.

Como fase estacionária, foi utilizado um polímero poroso obtido por técnicas especiais de polimerização envolvendo monômeros bi e poli-funcionais de tal maneira a se obter macromoléculas termorrígidas e insolúveis em solventes comuns, expressando alta área superficial.

Como fase móvel, o gás Nitrogênio foi utilizado (Hidrogênio, Nitrogênio, Argônio e Hélio são os gases mais empregados como fase móvel em cromatografia gasosa). Assim, a separação cromatográfica ocorre devido a uma seqüência de estágios de partição ou adsorção dos constituintes da amostra entre duas fases imiscíveis (móvel e estacionária).

3.2.8 Microscopia Ótica

O crescimento e aspectos morfológicos de *Thermomyces lanuginosus* nos meios YpSs e suas variantes, foi acompanhado por leituras de microscopia ótica com microscópio ótico Jenaval, com lâmpada de halogênio – luz transmitida, marca Carl Zeiss e resolução de 0,4 µm. Todas as fotografias de hifas foram efetuadas com o corante lactofenol azul de algodão.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de *Thermomyces lanuginosus*

Os resultados obtidos são descritos conforme segue:

4.1.1 Verificação Visual

Após o cultivo em meio YpSs (item 3.2.1) e preservação em geladeira por 32 meses, verificou-se um bom desenvolvimento do fungo: - massa branca cobrindo a placa. A produção do pigmento róseo ou vinho pode ser observada através do reverso da placa de Petri (Figura 24 - último *slide*).



Figura 24. Recuperação de *Thermomyces lanuginosus* (Castellani).

4.1.2 Microscopia Ótica

Através da figura 25 ilustra-se uma comparação entre fotos obtidas por microscopia ótica do microrganismo submetido a micro-cultivo em 16/04/2005 (a esquerda) e o mesmo fungo após sua recuperação em 29/12/2007 (a direita), onde verifica-se que não há alteração morfológica do fungo após mais de dois anos de preservação.

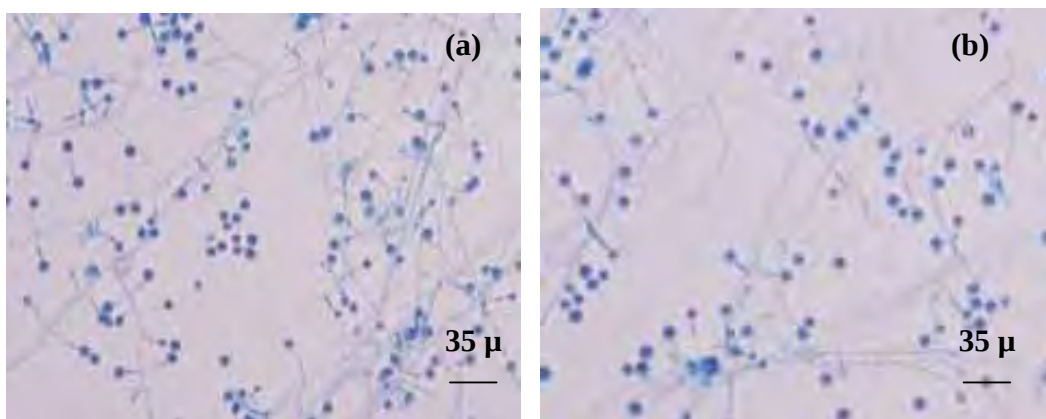


Figura 25. Microscopia ótica antes (a) e após a recuperação do fungo (b) (aumento 400x).

(a) – Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em 16/04/2005.

(b) – Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em 29/12/2007.

4.2 Morfologia da Cultura em Diferentes Fontes de Carbono

Os fatores do ambiente têm uma profunda influência sobre o crescimento dos fungos. As diferenças fisiológicas de *Thermomyces lanuginosus* e outros fungos termofílicos consistem principalmente na capacidade de manter a integridade das membranas e proteínas, tanto estruturais como funcionais quando ocorrem grandes variações ambientais.

Morfogênese significa o desenvolvimento da forma, implicando mudanças qualitativas a partir do crescimento. Algumas células ou grupo de células podem escolher um programa de desenvolvimento diferente que leva a mudanças morfológicas. Esse fenômeno ocorre continuamente à medida que progride o ciclo de vida do fungo.

A germinação de um conídio já é um processo de diferenciação que implica um crescimento polarizado. As hifas, ao crescerem e ramificarem-se, já começam um processo de diferenciação hifal. Ainda neste nível, é possível distinguir-se hifas líderes que diferem das ramificações em velocidades de crescimento, diâmetro, espessura da parede, ângulo de ramificação, etc.

A possibilidade de se diferenciar é dada pela informação genômica que tem um organismo. Mas o genoma não codifica a forma por si só, porém tem as instruções para gerá-la. Por outro lado, pode-se submeter *Thermomyces lanuginosus* à condições modificantes do meio (fontes de carbono) que poderia (ou não) controlar a progressão ou a supressão de atividades celulares.

Esses sinais seriam percebidos pelo fungo mediante receptores, cuja existência depende do genoma, logo traduzidos por meio de modificações bioquímicas que implicam fundamentalmente na ativação/inativação enzimática, e na indução/repressão gênica.

Um efeito morfogênico pode ser visto no esquema seguinte (figura 26), proposto por Forchiassin (1989), mostrando interações entre fatores endógenos e exógenos.

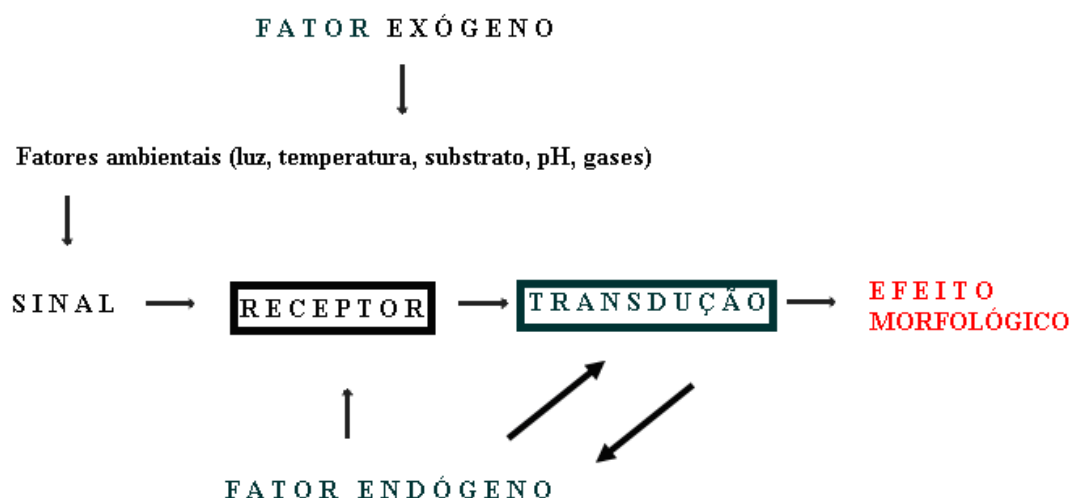


Figura 26. Interação entre fatores endógenos e exógenos para a produção de um efeito morfogênico (Adaptado de Forchiassin, 1989).

Todos os microrganismos estão expostos inevitável e necessariamente a um conjunto de fatores do ambiente que influirão sobre seu desenvolvimento.

Variações na disponibilidade de fontes de carbono podem influenciar os procesos de diferenciação, sendo que as variações que permitem um processo morfogênico sejam mais restritas que as que permitem crescimento.

A partir da germinação de um conídio, o primeiro evento observável é o aumento do volume celular devido à entrada de água, que pode ser acompanhada de um crescimento isodiamétrico da parede, após o que se produz uma mudança para crescimento polarizado originando-se um tubo germinativo, que originará o novo micélio.

O aspecto do micélio somado a diversas observações efetuadas em placas de Petri foram considerados na análise de algumas modificações notadas nos parâmetros de crescimento de *Thermomyces lanuginosus* quando inoculado em meios de cultura YpSs e variantes contendo diferentes fontes de carbono. As matérias-primas que foram avaliadas como eventuais fontes de carbono disponíveis ao microrganismo são comumente encontradas na indústria química como intermediários clássicos na síntese de diversos ésteres com as mais variadas aplicações.

4.2.1 Microscopia Ótica

As figuras 27 a 34 mostram as micrografias óticas do fungo em diferentes meios de cultura.

4.2.1.1 Meio de Cultura Padrão (extrato de levedura) - YpSs Standard (Figura 27).

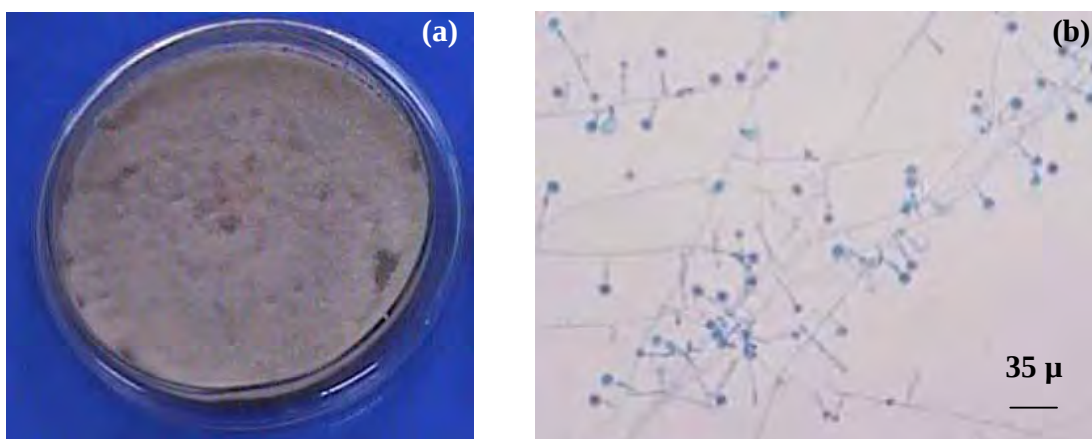


Figura 27. *Thermomyces lanuginosus* em YpSs Standard (aumento 400x).

(a) – Aspecto da cultura de *Thermomyces lanuginosus* crescendo em YpSs Standard.

(b) – Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs Standard.

4.2.1.2 Meio de cultura YpSs variante I (fonte de carbono = Pentaeritritol) (Figura 28).

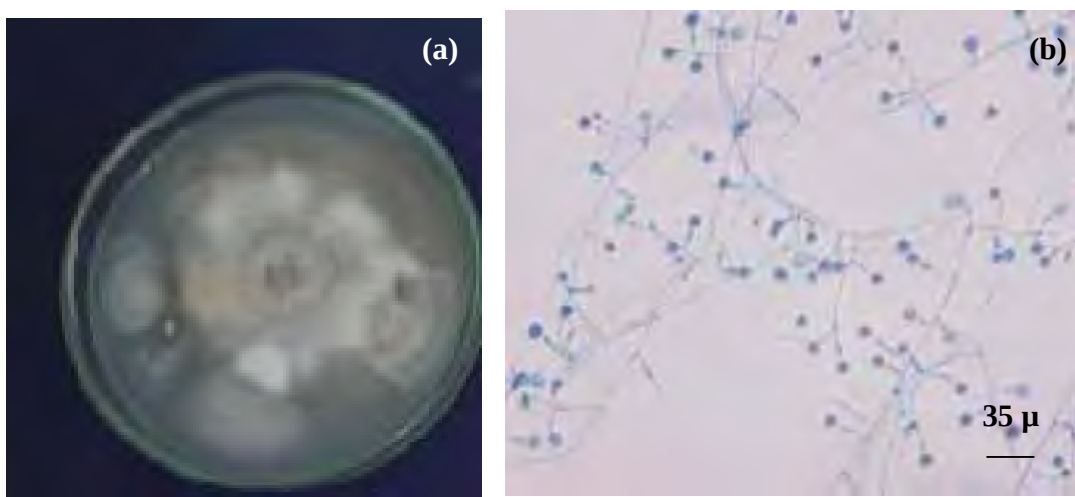


Figura 28. *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante I (aumento 400x).

(a) – Aspecto da cultura de *Thermomyces lanuginosus* crescendo em YpSs variante I.

(b) – Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante I.

O aspecto desta cultura é semelhante ao Standard, com micélio rente ao meio, bordas irregulares e setores brancos e cinza claros. Como diferença, esta cultura apresentou apenas um micélio um pouco menos denso do que o controle. O reverso da placa de Petri evidenciou a coloração rosada típica deste microrganismo (Figura 28).

4.2.1.3 Meio de cultura YpSs variante II (fonte de carbono = Ácido Oleico) (Figura 29).

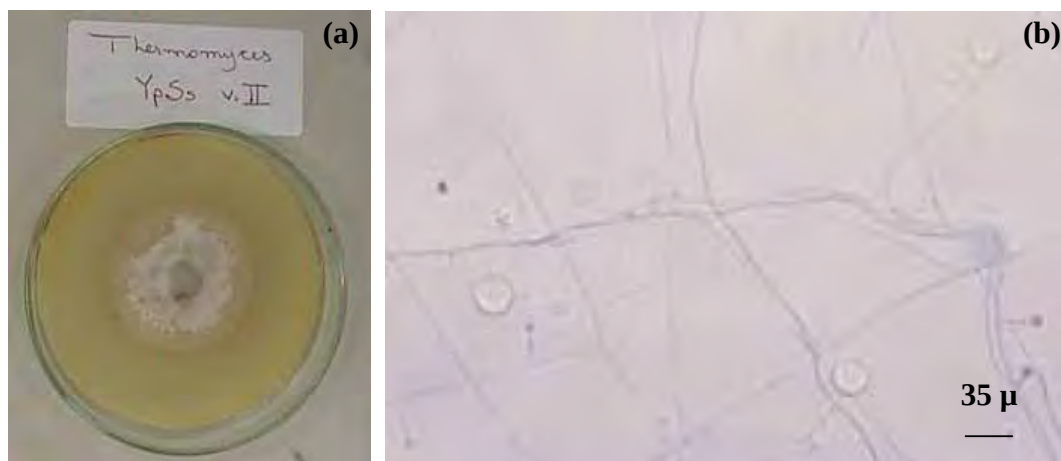


Figura 29. *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante II (aumento 400x).

- (a) – Aspecto da cultura de *Thermomyces lanuginosus* crescendo em YpSs variante II.
(b) – Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante II.

Este meio de cultura apresenta uma fonte de carbono insolúvel em água (ácido oleico) e portanto, uma emulsão foi criada onde o ácido oleico é disponibilizado ao fungo na forma de uma micela estabilizada por agentes tensoativos (Triton X-100 e Tween 40).

O aspecto desta cultura é semelhante ao Standard, com micélio rente ao meio, bordas irregulares e setores brancos e cinza claros. Esta cultura apresentou um crescimento menos significativo do que o controle (Figura 29). O reverso da placa de Petri evidenciou a coloração rosada típica deste microrganismo.

4.2.1.4 Meio de cultura YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol) (Figura 30).

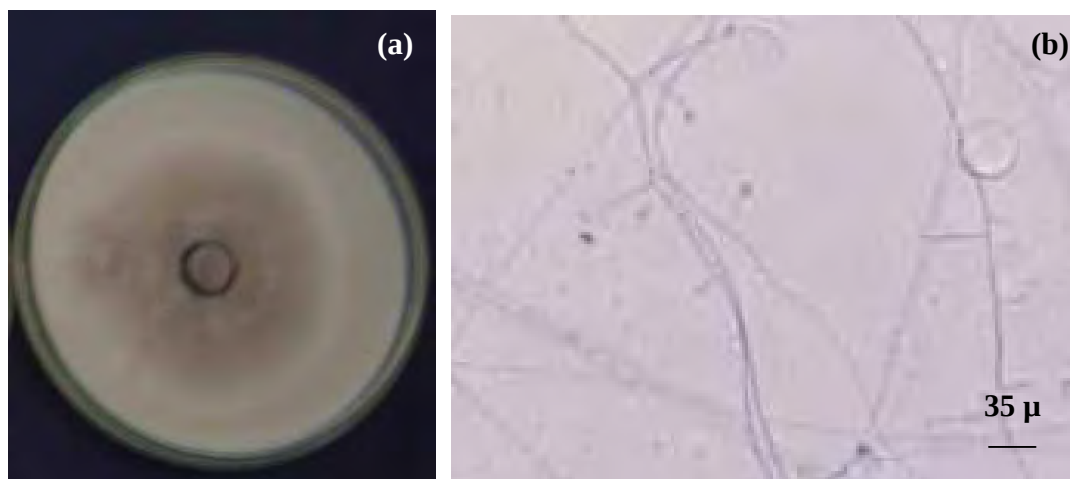


Figura 30. *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante III (aumento 400x).

(a) – Aspecto da cultura de *Thermomyces lanuginosus* crescendo em YpSs variante III.

(b) – Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante III.

Este meio de cultura apresenta uma fonte de carbono insolúvel em água (Dioleato de Pentaeritritol) e portanto, uma emulsão foi criada onde o éster sintetizado dioleato de pentaeritritol é disponibilizado ao fungo na forma de uma micela estabilizada por agentes tensoativos (Triton X-100 e Tween 40).

O aspecto desta cultura é semelhante ao Standard, com micélio rente ao meio, bordas irregulares e setores brancos e cinza claros. Como diferença, esta cultura apresentou apenas um micélio um pouco menos denso do que o controle (Figura 30). O reverso da placa de Petri evidenciou a coloração rosada típica deste microrganismo.

4.2.1.5 Meio de cultura YpSs variante IV (sem fonte de carbono adicionada) (Figura 31).

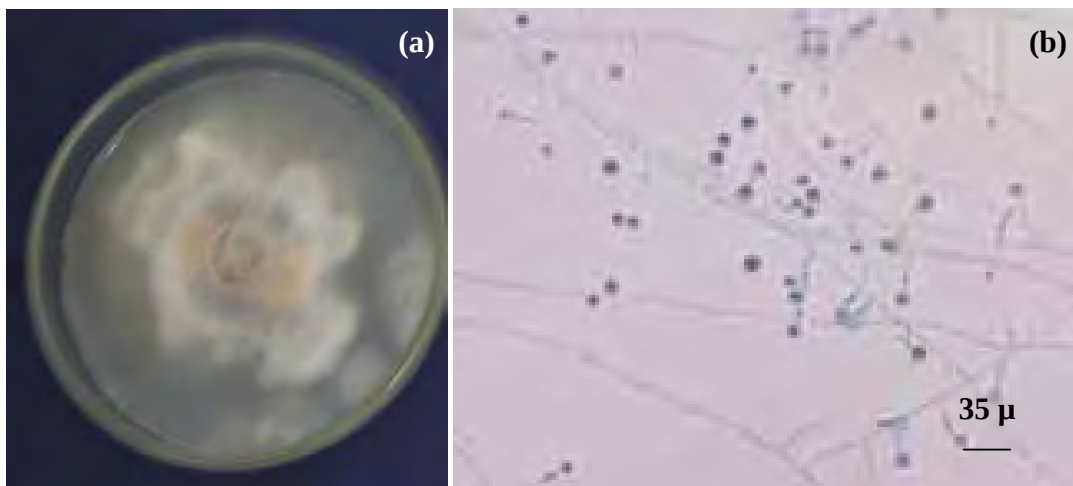


Figura 31. *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante IV (aumento 400x).

- (a) – Aspecto da cultura de *Thermomyces lanuginosus* crescendo em YpSs variante IV.
(b) - Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante IV.

O aspecto desta cultura é semelhante ao Standard, com a diferença de que esta cultura apresentou apenas um micélio, significativamente menos denso do que o do controle. O reverso da placa de Petri não evidenciou a coloração rosada típica deste microrganismo. Provavelmente o crescimento está associado a fontes de reserva do microrganismo ou até mesmo componentes presentes no extrato de levedura que serviriam como fonte de carbono para o fungo (Figura 31).

4.2.1.6 Meios de cultura YpSs variantes V, VI, VII, VIII e IX (sem extrato de levedura adicionado) (Figura 32).



Figura 32. *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variantes V, VI, VII, VIII e IX.

Em nenhum dos exemplos acima citados, verificou-se crescimento do microrganismo, evidenciando a dependência deste fungo ao extrato de levedura e seus componentes (Figura 32).

4.2.1.7 Meio de cultura YpSs variante X (fonte de carbono = 1,6-Hexanodiol) (Figura 33).

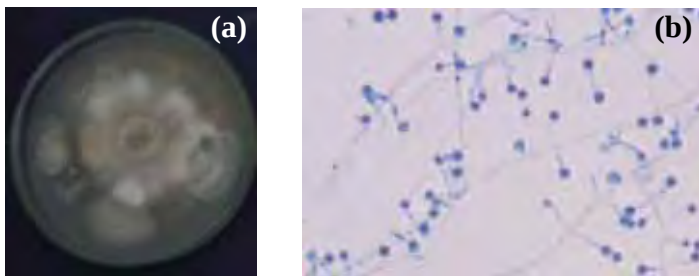


Figura 33. *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante X (aumento 400x).

- (a) – Aspecto da cultura de *Thermomyces lanuginosus* crescendo em YpSs variante X.
 (b) - Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante X.

O aspecto desta cultura é semelhante ao Standard, com micélio rente ao meio, bordas irregulares e setores brancos e cinza claros. Como diferença, esta cultura apresentou apenas um micélio um pouco menos denso do que o controle (Figura 33). O reverso da placa de Petri evidenciou a coloração rosada típica deste microrganismo.

4.2.1.8 Meio de cultura YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol) (Figura 34).

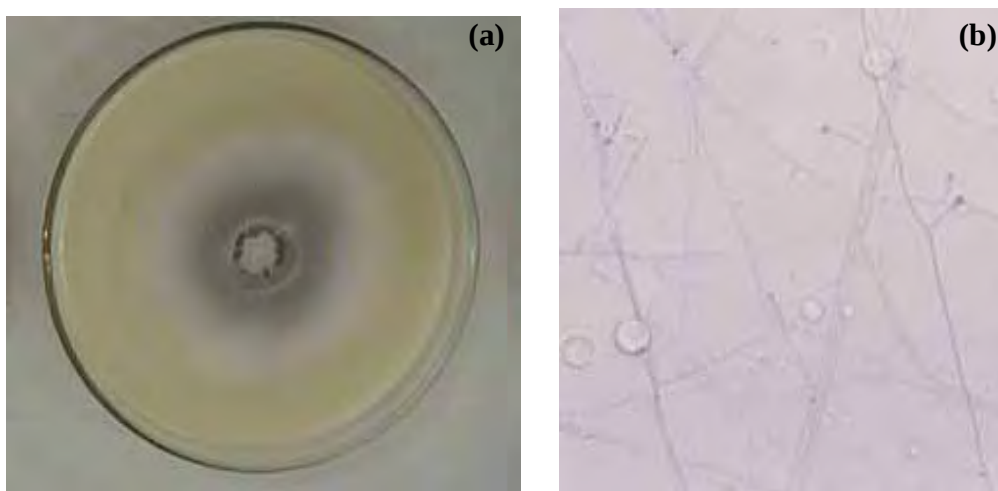


Figura 34. *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante XI (aumento 400x).

(a) – Aspecto da cultura de *Thermomyces lanuginosus* crescendo em YpSs variante XI.

(b) - Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante XI.

Este meio de cultura apresenta uma fonte de carbono insolúvel em água (Dioleato de 1,6-Hexanodiol) e portanto, uma emulsão foi produzida onde o éster sintetizado, dioleato de 1,6-Hexanodiol, foi disponibilizado ao fungo na forma de uma micela estabilizada por agentes tensoativos (Triton X-100 e Tween 40) (Figura 34).

O crescimento de *Thermomyces lanuginosus* nestes dois meios em que as fontes de carbono são miscíveis entre si (Ácido Oleico e 1,6-Hexanodiol), mostrou resultados muito semelhantes aos obtidos anteriormente. A tabela 6 mostra os resultados do crescimento em milímetros (mm) das colônias, após 6 dias a 50 °C.

Tabela 6. Crescimento (mm) das culturas de *Thermomyces lanuginosus*.

Meio	1. dia (mm)	2. dia (mm)	3. dia (mm)	4. dia (mm)	5. dia (mm)	6. dia (mm)
YpSs v.X	4	9	17	21	29	35
YpSs v. XI	2	7	9	9,5	14	17

Através da tabela 7, também pode-se evidenciar que o microrganismo não sofreu mudanças morfológicas significativas.

Tabela 7. Características morfológicas de *Thermomyces lanuginosus*.

Meio	Hifas	Conidióforos	Conídios	Diâmetro Conídios (µm)	Conídios Isolados
YpSs (v. X)	Septadas Ramificadas	Curtos Não ramificados ou raramente ramificados	Esféricos & Hialinos Paredes finas (quando jovens) Simples (1 a cada conidióforo)	5 a 7	Sim
YpSs (v. XI)	Septadas Ramificadas	Curtos Não ramificados ou raramente ramificados	Esféricos & Hialinos Paredes finas (quando jovens) Simples (1 a cada conidióforo)	5 a 7	Sim

Na tabela 8, apresenta-se a evolução do pH destes meios encontrados para leituras feitas em triplicata, imediatamente após a esterilização dos mesmos, diluição 1:1 e diluição 1:1 ao término da incubação de *Thermomyces lanuginosus*.

Tabela 8. Valores de pH antes e depois do crescimento de *Thermomyces lanuginosus*.

Meio	pH inicial (50 °C)	pH inicial (1:1 H ₂ O) (50 °C)	pH final (1:1 H ₂ O) (50 °C)
YpSs variante X	7,30	7,39	7,86
YpSs variante XI	7,21	7,29	7,49

Os resultados obtidos indicam que a alteração de pH nos meios de cultura contendo microrganismos pode estar relacionada com rotas de degradação de aminoácidos contidos neste meio.

4.2.2 Produção de Pigmento Róseo

A produção de pigmentos fúngicos é uma área nova em expansão e apresenta um potencial biotecnológico muito atraente. Os maiores obstáculos à exploração de fontes novas de pigmentos naturais são a legislação atual de alimentos e os custos de manufatura. A potencialidade da produção de pigmentos no Brasil é grande considerando a nossa vasta biodiversidade. *Thermomyces lanuginosus* evidenciou esta capacidade de produção de pigmentos, todavia pouco se sabe especificamente sobre os mesmos. Pigmentos característicos são produzidos por uma grande variedade de fungos. Espécies de *Drechslera* produzem hidroxiantraquinonas (marrons e vermelhos). *Aspergillus glaucus* podem produzir eritroglaucina (vermelho), auroglaucina (laranja) e flavoglaucina (amarelo). Os mais importantes pigmentos, as antraquinonas foram por muito tempo de crucial importância na indústria de corantes. Esses metabólitos seguramente são secundários (isto vale para *Thermomyces lanuginosus*) e não possuem função clara no crescimento celular. (Hobson & Wales, 1998).

Eles são sintetizados por um período finito por células que não são mais de crescimento balanceado. Ao contrário, o metabolismo primário inclui todos os processos anabólicos e catabólicos que estão finamente equilibrados para manter o organismo vivo (Hobson & Wales, 1998). A indústria de corantes está sofrendo com o aumento de custos das matérias-primas e da energia para a síntese, bem como a pressão para minimizar os danos ao ambiente causados pelo processo de produção, o qual gera efluentes. Por meio de técnicas biotecnológicas, antraquinonas têm sido isoladas de inúmeros fungos (por exemplo: *Trichoderma*, *Drechslera*, *Aspergillus* e *Curvularia*) (Hobson & Wales, 1998).

Excelentes revisões dos metabólitos naftoquinônicos de fungos foram recentemente publicadas (Medentsev & Akimenko, 1998). Na figura 35, estão apresentados alguns dos principais grupos de pigmentos fúngicos de tonalidade vermelha já isolados (derivados de naftoantraquinonas).

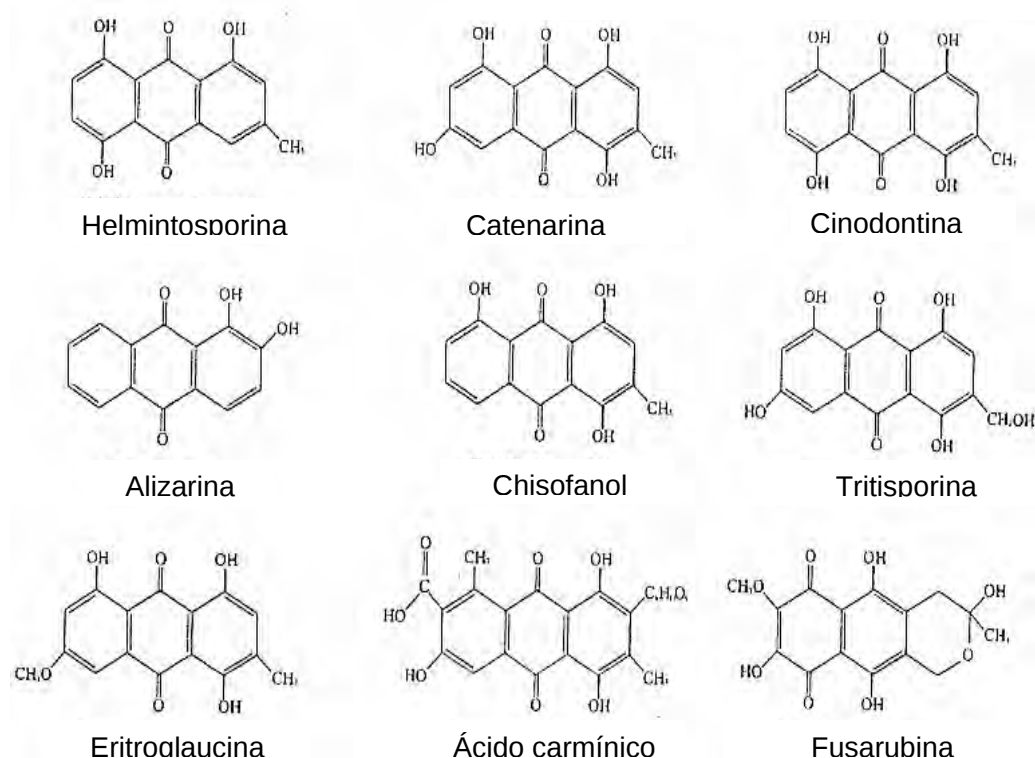


Figura 35 – Pigmentos fúngicos (adaptado de Espósito & Azevedo, 2004).

Uma característica marcante de *Thermomyces lanuginosus* é a difusão de um pigmento róseo ou vinho que se espalha rapidamente no ágar durante o crescimento do microrganismo. Essa capacidade de expressão do pigmento continuou presente no fungo nos meios YpSs variantes variantes I, II, III e IV, todavia na variante II (fonte de carbono = Ácido Oleico) mostrou-se mais evidente, como mostra o reverso da placa de Petri de YpSs (Figura 36).

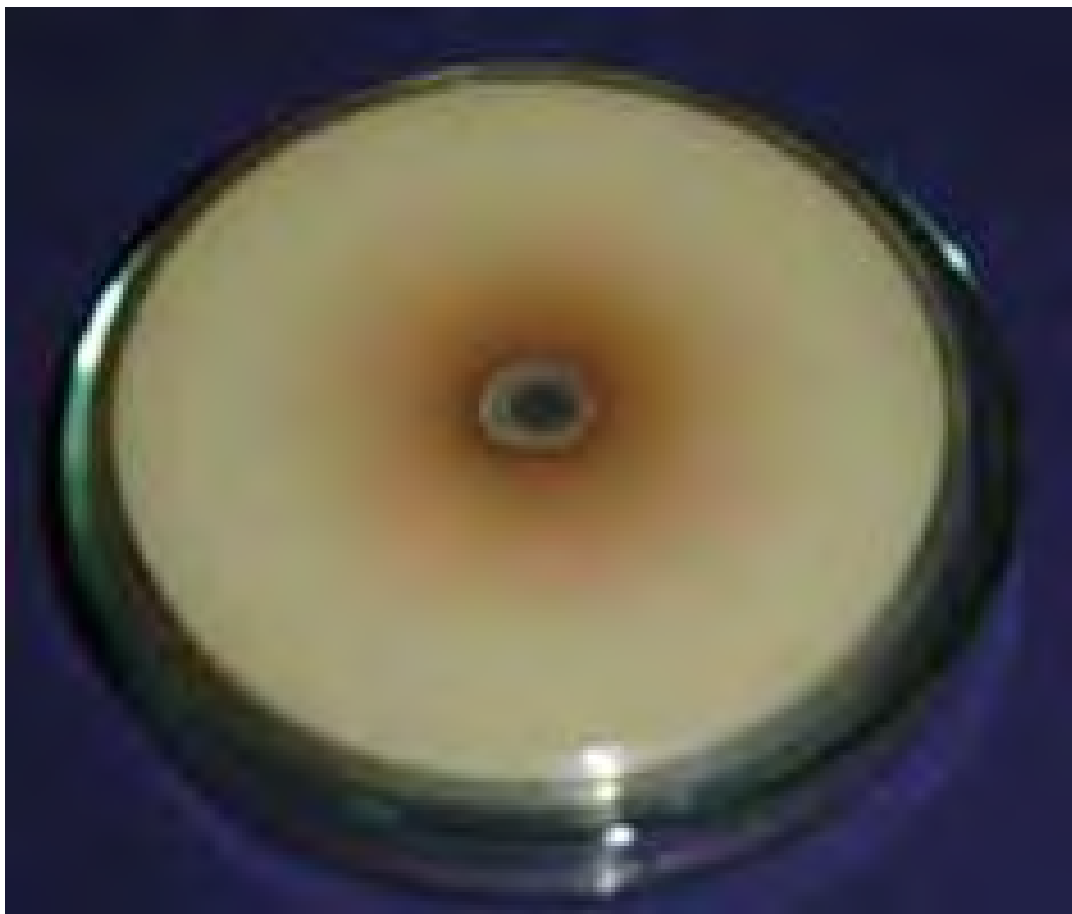


Figura 36. Reverso da placa de Petri de YpSs variante II.

A produção do pigmento (reverso das placas) nos meios é mostrada na figura 37.

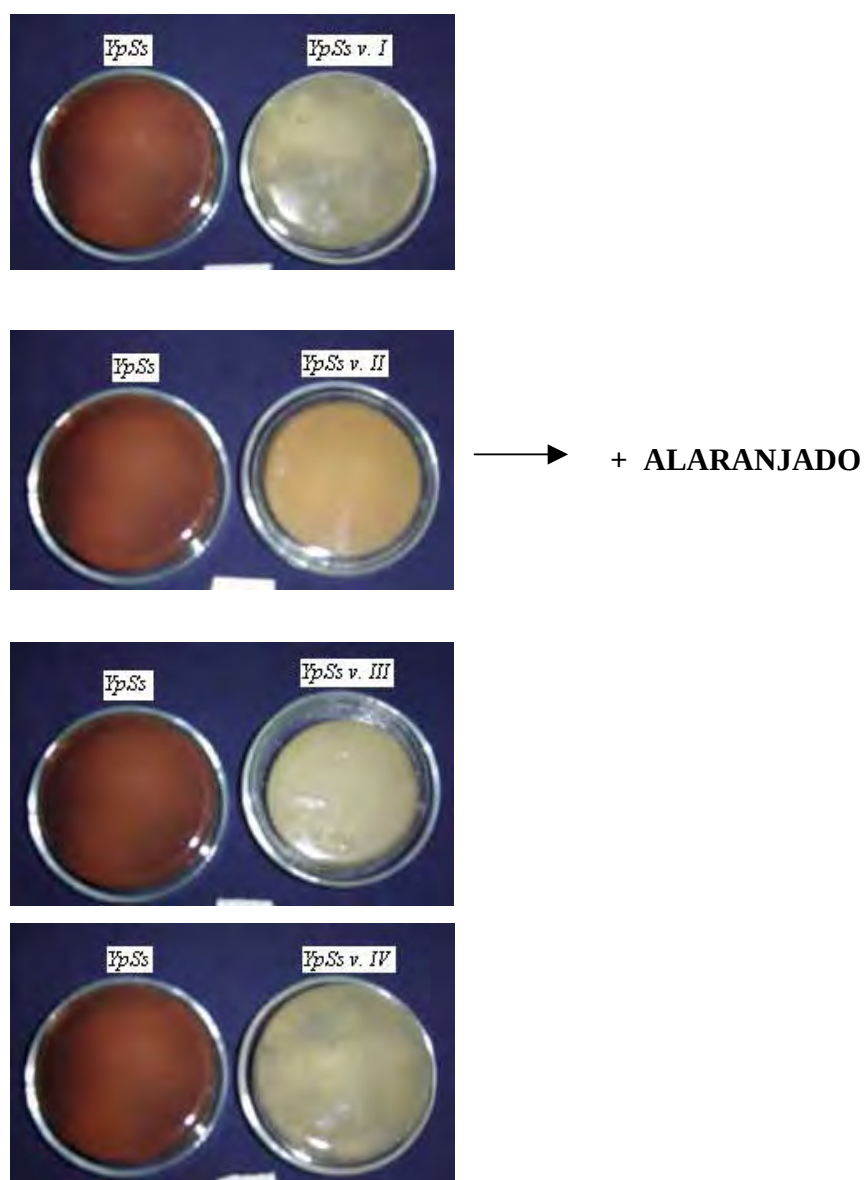


Figura 37. Comparação entre reversos de YpSs Standard e variantes I,II,III e IV.

Novamente, pode-se evidenciar a maior produção e difusão de pigmentos no meio YpSs variante II (fonte de carbono = ácido oleico).

Todavia, o meio YpSs variante XII (fonte de carbono = amido, sem a adição de K_2HPO_4), permite a observação de um resultado bastante significativo. A figura 38 mostra uma placa de Petri inoculada com *Thermomyces lanuginosus* em meio YpSs variante XII por 7 dias a 50 °C e a respectiva fotografia das hifas (micro-cultivo) obtida por microscopia ótica.

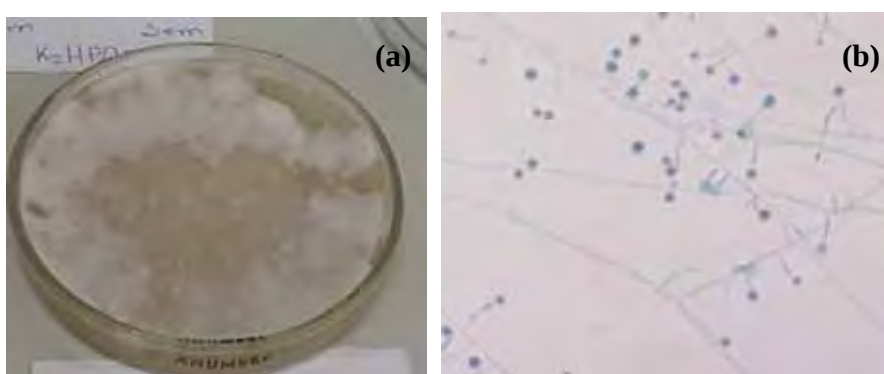


Figura 38. *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante XII (aumento 400x).

(a) – Aspecto da cultura de *Thermomyces lanuginosus* crescendo em YpSs variante XII.

(b) - Estruturas de reprodução de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante XII.

Observa-se claramente a ausência de pigmentação rósea, condicionando-se seu aparecimento à presença de K_2HPO_4 no meio de cultura.

Adicionalmente, mais duas variantes de YpSs foram estudadas (variantes XIII e XIV), onde foi possível estabelecer dependência da produção deste pigmento colorido com a presença de fosfatos no meio.

Na figura 39 apresenta-se o reverso de três placas de Petri inoculadas com *Thermomyces lanuginosus*, e incubadas por 7 dias a 50 °C nos meios YpSs Standard, YpSs variante XIII (onde K_2HPO_4 foi substituído por Na_2HPO_4) e YpSs variante XIV (onde K_2HPO_4 foi substituído por KNO_3).



Figura 39. Reverso de placas de Petri com YpSs Standard, YpSs v.XIII e YpSs v.XIV.

Da esquerda para a direita é possível observar a coloração rósea presente no meio Standard, ao mesmo tempo que manifesta-se de forma menos intensa em YpSs variante XIII (extrato de levedura + Na_2HPO_4) mas está completamente ausente em YpSs variante XIV, que não possui HPO_4^{--} (extrato de levedura + KNO_3). Em todos estes exemplos citados, o crescimento de *Thermomyces lanuginosus* foi bastante regular e significativo, não evidenciando qualquer efeito inibitório.

4.2.3 Medidas do crescimento de *Thermomyces lanuginosus*

Embora *Thermomyces lanuginosus* tenha sido capaz de esporular e mostrar capacidade de crescimento em extrato de levedura (YpSs) e suas variantes (desde que os meios sejam enriquecidos com extrato de levedura), algumas diferenças macroscópicas foram efetivamente observadas quando do crescimento em placas de Petri.

A medição do crescimento das colônias em placas de Petri seguiu o esquema proposto na figura 40, (preparado conforme item 3.2.2), após 6 dias a 50 °C.

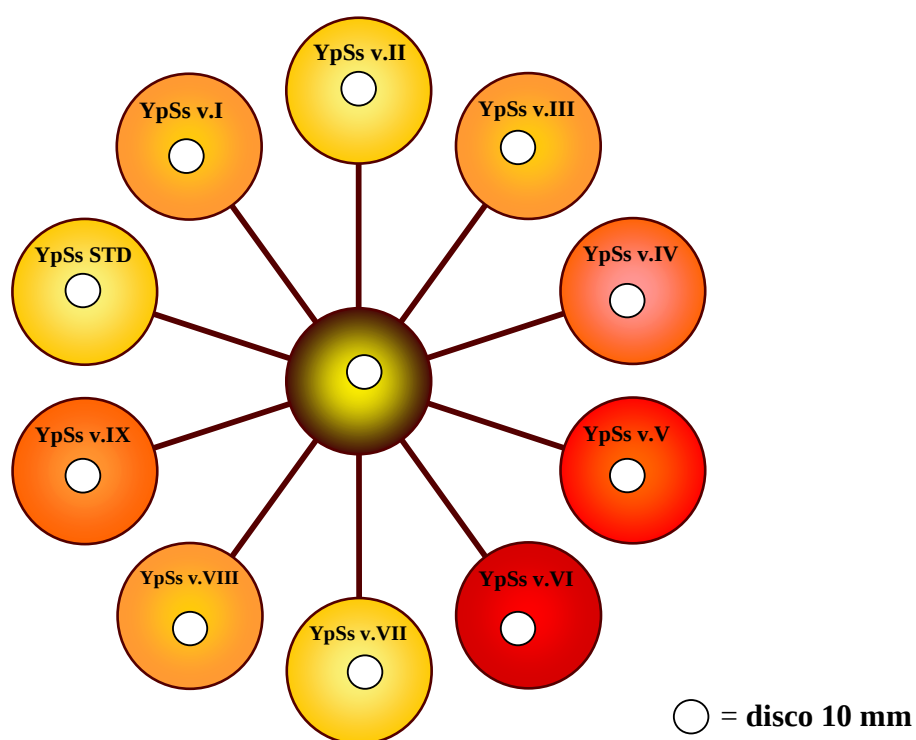


Figura 40. Monitoramento do crescimento de *Thermomyces lanuginosus*.

As medidas, em milímetros, foram feitas utilizando-se uma régua milimetrada (escalímetro) (Tabela 9).

Tabela 9. Crescimento (mm) das culturas de *Thermomyces lanuginosus*.

Meio	1. dia (mm)	2. dia (mm)	3. dia (mm)	4. dia (mm)	5. dia (mm)	6. dia (mm)
YpSs Standard	5	11,5	24,5	35	>35	>35
YpSs v.I	5	10	19,5	23,5	29,5	35
YpSs v.II	1,5	4	6,5	8	12	16,5
YpSs v.III	2	6	15,5	21	27	30
YpSs v.IV	4	9	19	22	28,5	35
YpSs v.V	0	0	0	0	0	0
YpSs v.VI	0	0	0	0	0	0
YpSs v.VII	0	0	0	0	0	0
YpSs v.VIII	0	0	0	0	0	0
YpSs v. IX	0	0	0	0	0	0

Após o sexto dia, todas as culturas foram observadas mediante microscopia ótica. Em todos os meios de cultura as hifas apresentaram-se ramificadas e septadas, com conidióforos curtos não ramificados ou raramente ramificados. Os conídios são esféricos e hialinos, mostrando paredes finas quando jovens. Observaram-se sempre conídios simples (1 a cada conidióforo). O diâmetro encontrado para os conídios variou de 5 a 7 μm e apenas nas variantes III (fonte de carbono = ácido oleico) e III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol), foram notados conídios isolados.

Os resultados de crescimento tiveram que ser interrompidos no sexto dia, uma vez que os meios de cultura YpSs começam a expressar uma forte desidratação a partir do sétimo dia a 50 °C, dificultando a interpretação correta dos diâmetros das culturas.

As medidas de pH (triplicata) foram realizadas para mostrar a variação dos valores de pH ao término da incubação do microrganismo (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de pH antes e depois do crescimento de *Thermomyces lanuginosus*.

Meio	pH inicial (50 °C)	pH inicial (1:1 H ₂ O) (50 °C)	pH final (1:1 H ₂ O) (50 °C)
YpSs Standard	7,16	7,31	7,87
YpSs variante I	7,27	7,34	7,85
YpSs variante II	6,11	6,21	7,04
YpSs variante III	7,17	7,28	7,47
YpSs variante IV	7,21	7,33	7,71

O pH ótimo de crescimento é definido para cada espécie. Para um crescimento sustentável é importante que *Thermomyces lanuginosus* consiga manter um pH intracelular em torno de 7,5, não importando assim o pH do meio externo (Rosenberg, 1975).

Células vivas têm a habilidade dentro seus próprios limites, de manter o pH constante pela expulsão ou absorção de íons hidrogênio. Assim o pH do meio externo poderá mudar drasticamente antes que o pH da célula seja afetado. De modo geral, a alteração de pH em meios de cultura contendo microrganismos está relacionada com rotas de degradação de aminoácidos contidos no meio (Goes *et al.*, 2007).

Quando *Thermomyces lanuginosus* é cultivado em meio de cultura, o pH do meio sofre alteração à medida que compostos alcalinos são produzidos. Esta mudança de pH poderia ser tão intensa que prejudicaria eventualmente o crescimento posterior, mas esta observação não foi feita uma vez, que o experimento foi interrompido no sexto dia.

É interessante notar que para YpSs variante II (fonte de carbono = Ácido Oleico), as condições de pH iniciais não são favoráveis ao crescimento ótimo do fungo, devido a presença de um ácido graxo, que embora caracterizado como um ácido fraco, mostrou a capacidade de abaixamento do pH do meio para aproximadamente 6,2 a 50 °C.

Considerando-se que ácido oleico tem um valor de pK_a de 5,02 (Riddick, 1986) este ácido graxo estará 99% dissociado em pH 7, todavia *Thermomyces lanuginosus* mostrou a capacidade de ajustar a concentração de H^+ conveniente ao seu crescimento (Cooney & Emerson, 1964).

Liu e colaboradores mostraram que diversos tipos de microrganismos (fungos basicamente) têm uma tendência a alcalinização dos meios de cultura onde são inoculados (Liu *et al.*, 1973).

Adicionalmente, a menor produção de conídios que *Thermomyces lanuginosus* expressou no meio YpSs variante II (fonte de carbono = Ácido Oleico), pode estar associada ao valor inicial de pH do meio. O crescimento vegetativo do fungo, geralmente é possível sob uma amplitude de condições maior do que a que permite a esporulação, embora os efeitos cumulativos de variações sejam complexos.

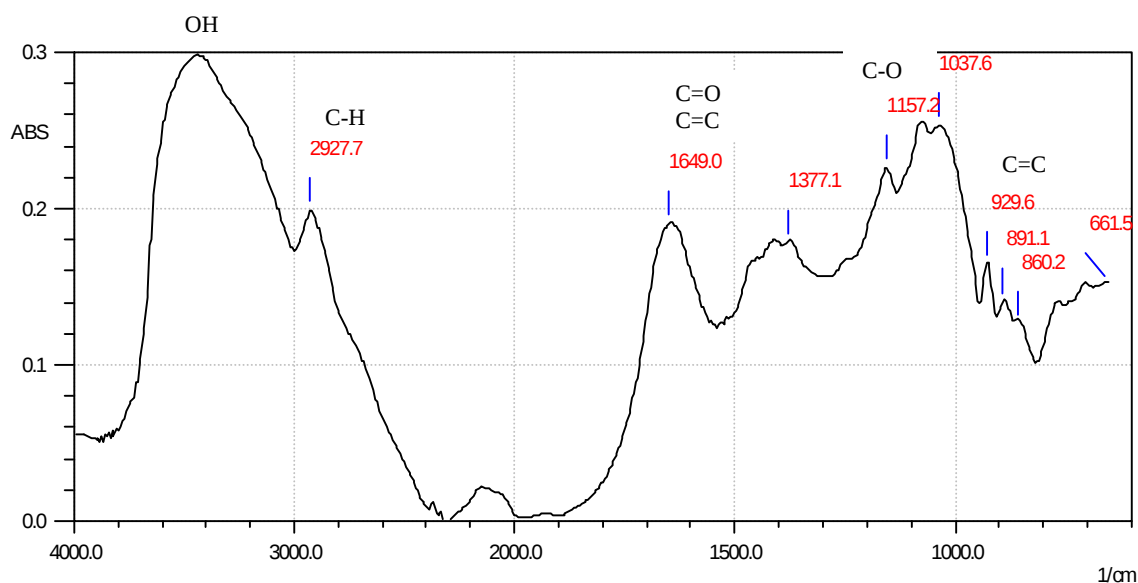
Porém de forma análoga, se as condições são suficientemente favoráveis para permitir o início da produção de conídios, uma mudança para condições desfavoráveis possibilitam ainda o término da formação dos conídios.

4.2.4 Caracterização dos Pigmentos de *Thermomyces lanuginosus* utilizando FTIR

Espectroscopia Raman e NIR Raman são os métodos mais utilizados para a caracterização de corantes naturais (Schrader *et al.*, 1999). Entretanto neste estudo apenas uma correlação com pigmentos vermelhos produzidos por fungos será estabelecida mediante a interpretação de alguns espectros de FTIR.

Estruturas e propriedades físico químicas de cem metabólitos de naftoquinonas produzidos por fungos (a maioria vermelhos ou de tonalidades derivadas de vermelho) foram revisados (Medentsev & Akimenko, 1998).

Na figura 41 apresenta-se o espectro obtido de um meio com extrato de levedura (YpSs Standard) que foi preparado e desidratado após um período de 21 dias em estufa de cultura a 50 °C.



O extrato de levedura desidratado mostra a predominância de bandas relativas aos aminoácidos componentes do mesmo.

Figura 41. FTIR de meio YpSs Standard desidratado.

A figura 42 mostra um espectro de FTIR obtido de um meio YpSs Standard onde *Thermomyces lanuginosus* foi inoculado e incubado por 7 dias a 50 °C, e imediatamente após o descarte das hifas por raspagem, o meio YpSs Standard (fortemente colorido de vermelho), foi mantido por mais 14 dias a 50 °C para desidratação do mesmo. O meio com o pigmento apresenta um espectro FTIR semelhante ao do meio apenas (Figura 41).

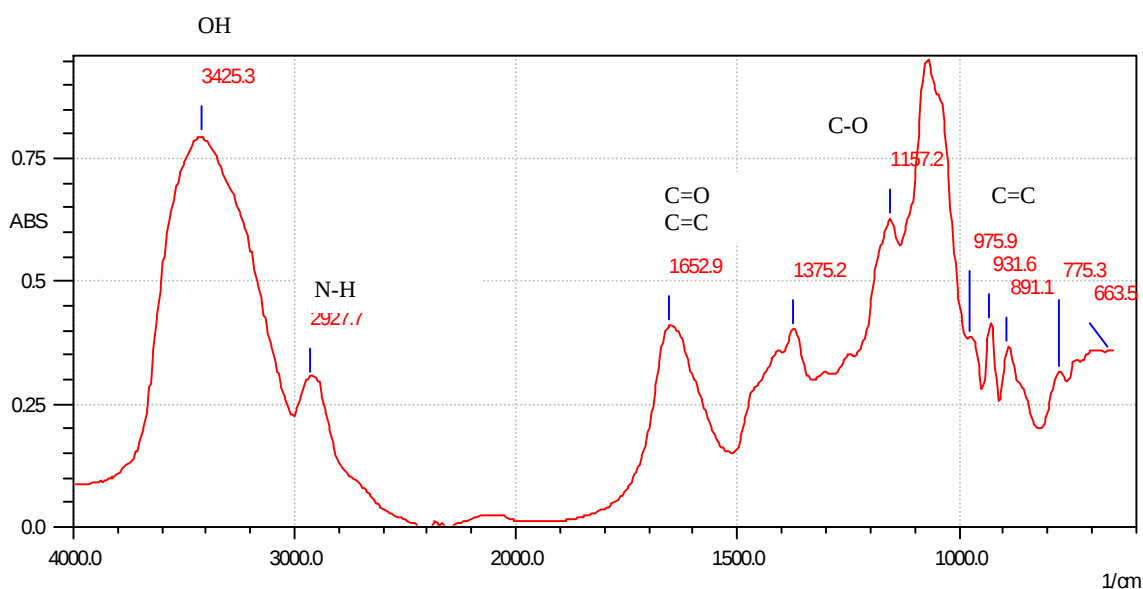


Figura 42. FTIR do meio YpSs inoculado com *Thermomyces lanuginosus* e desidratado.

Por definição, as quinonas são dicetonas α , β insaturadas e que apresentam carbonilas com bandas de absorção nas seguintes regiões:

- i) p-Benzoquinonas: 1.670 cm^{-1}
- ii) o-Benzoquinonas: 1.680, 1.645 cm^{-1}
- iii) 1,4-Naftoquinonas: 1.675 cm^{-1}
- iv) 1,2-Naftoquinonas: 1.700, 1.680 cm^{-1}
- v) 9,10-Antraquinonas: 1.678 cm^{-1}

Nas naftoquinonas e antraquinonas hidroxiladas, quando o grupo OH está localizado nas posições α ou β , apresentam-se três bandas (uma para o grupo OH e duas para os grupos quinônicos):

- i) Banda forte para OH: 3.500 cm^{-1}
- ii) Grupo quinônico livre: 1.670 cm^{-1}
- iii) Grupo quinônico associado: 1.630 cm^{-1}

Se as naftoquinonas e antraquinonas contiverem grupos α -OH, este grupo estará fortemente associado à carbonila quinônica e por conseguinte a banda de absorção do grupo quinônico se deslocará para menores números de ondas (baixa frequência). Essas bandas, no entanto, estão presentes também no controle YpSs Standard, não sendo possível uma distinção entre o pigmento e o meio através do FTIR.

Os resultados obtidos portanto não são por si só, suficientes para afirmar que o pigmento produzido por *Thermomyces lanuginosus* em meio YpSs Standard pertença a família das naftoantraquinonas, mas indicam esta possibilidade.

4.2.4.1 Hifas de *Thermomyces lanuginosus*

A constituição da parede celular dos fungos é uma das características que levou à sua separação num reino separado entre os seres vivos - ela é composta por fibras de quitina (polissacarídeo, insolúvel e córneo formado por unidades de N-acetilglicosamina). A quitina é um polímero linear que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica β -1,4 N-acetilglucosamina (Figura 43).

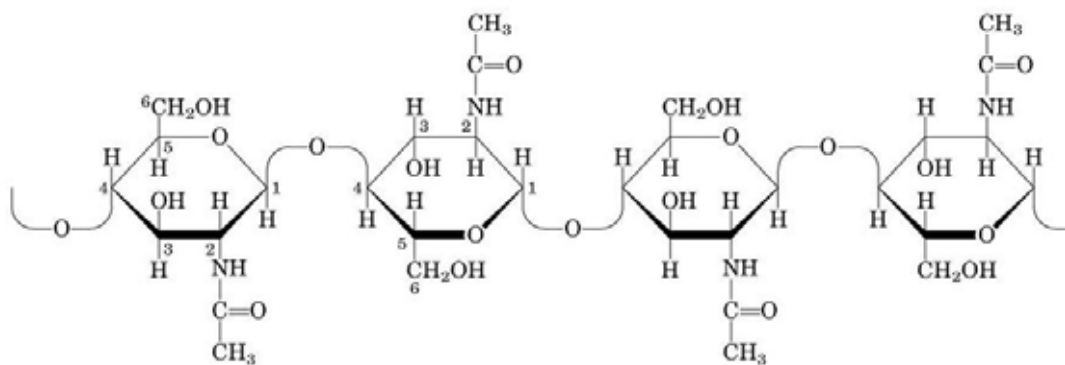


Figura 43. Estrutura da quitina.

A quitina encontrada em fungos possui basicamente a mesma estrutura daquela que é encontrada em outros organismos, porém uma diferença significativa resulta do fato de que a quitina fúngica está associada a outros polissacarídeos os quais não ocorrem no exoesqueleto de outros artrópodos. Adicionalmente a este fato, a quitosana (derivada da N-desacetilação da quitina) aparentemente está restrita somente aos fungos.

A quitina extraída da massa micelial de *Cunninghamella elegans* submetida à espectroscopia de infravermelho em pastilhas de KBr foi evidenciada por Franco e comparada com a quitina padrão de laboratório (SIGMA).

As faixas mais significativas dos espectros, destas quitinas, são aquelas que revelam bandas dos grupamentos amida em 1665 , 1555 e 1313cm^{-1} as quais mostram dicroísmo perpendicular atribuído, respectivamente, à interação de acoplamento com $\text{C}=\text{O}$, à deformação de N-H no plano CONH e a ligações C-N com deslocamento de CH_2 (Franco *et al.*, 2005).

Os resultados de espectroscopia de infravermelho obtidos das hifas de *Thermomyces lanuginosus* em pastilhas de KBr estão representados nas figuras 44 a 48.

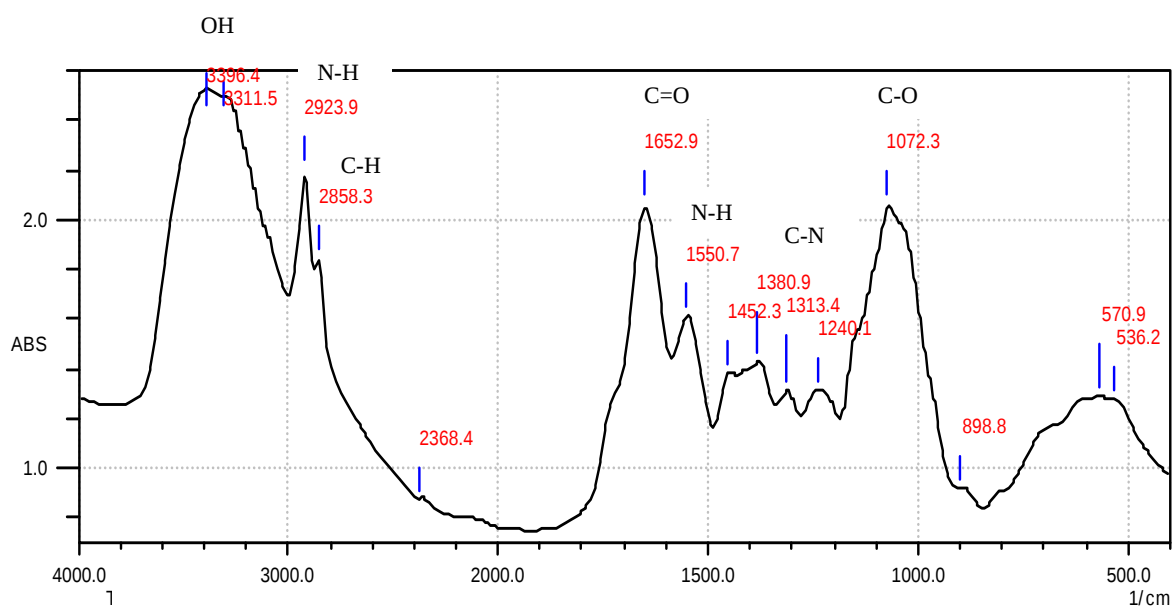


Figura 44. FTIR de hifas de *Thermomyces lanuginosus* inoculadas em meio com extrato de levedura (YpSs Standard).

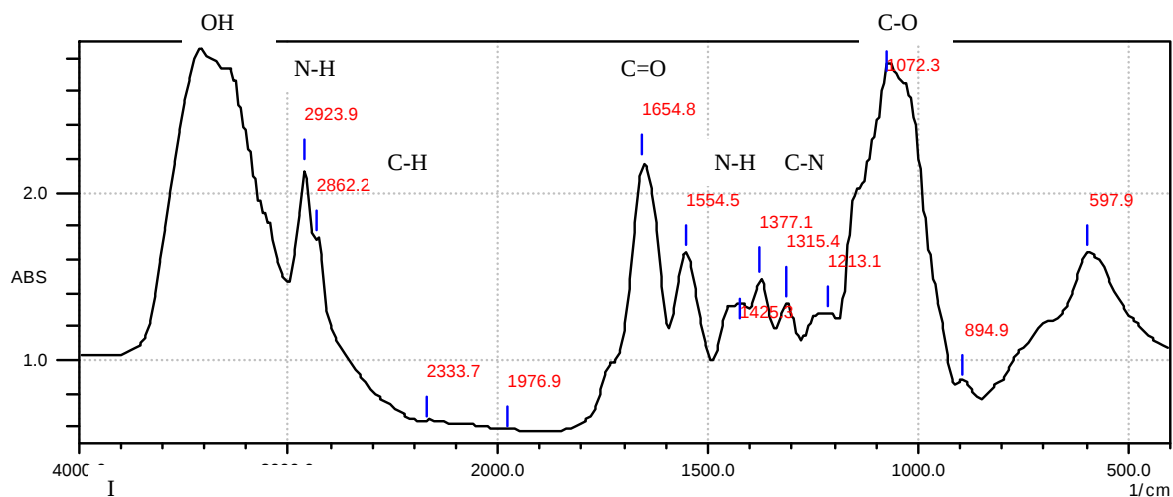


Figura 45. FTIR de hifas de *Thermomyces lanuginosus* inoculadas em meio YpSs variante I (fonte de carbono = Pentaeritritol).

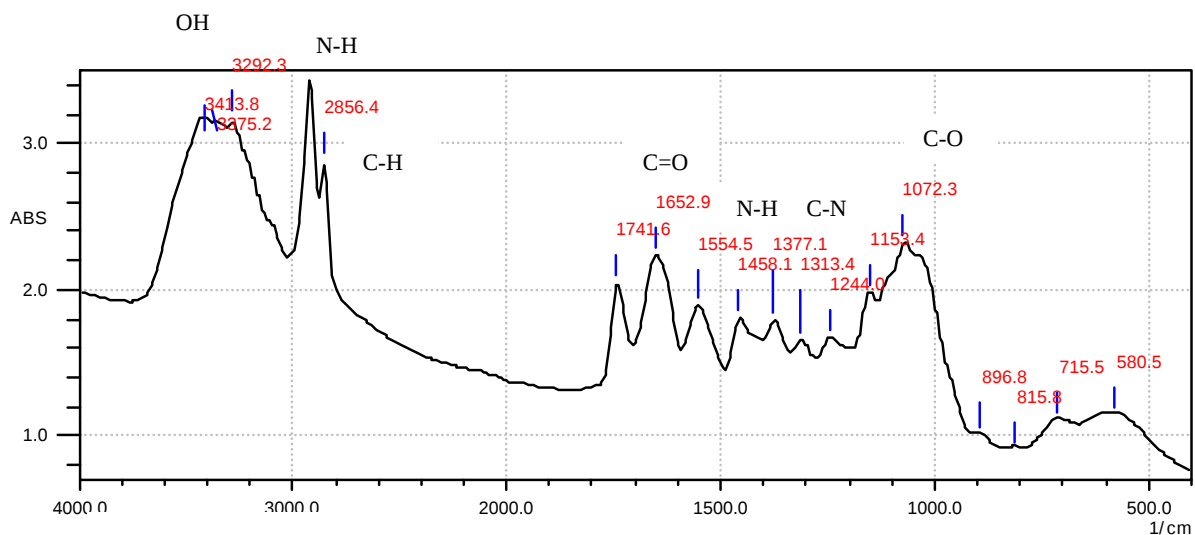


Figura 46. FTIR de hifas de *Thermomyces lanuginosus* inoculadas em meio YpSs variante II (fonte de carbono = Ácido Oleico).

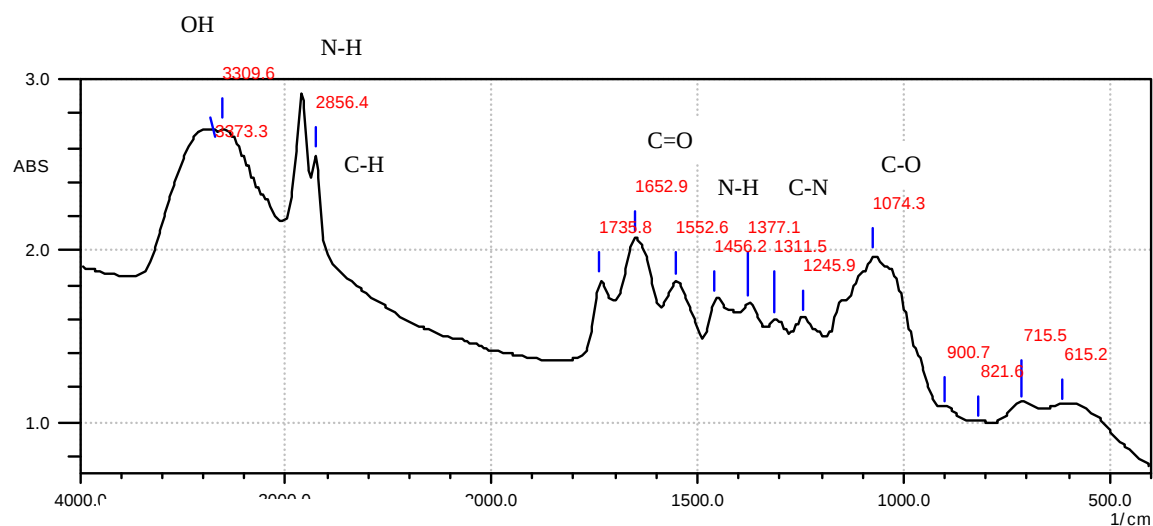


Figura 47. FTIR de hifas de *Thermomyces lanuginosus* inoculadas em meio YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol).

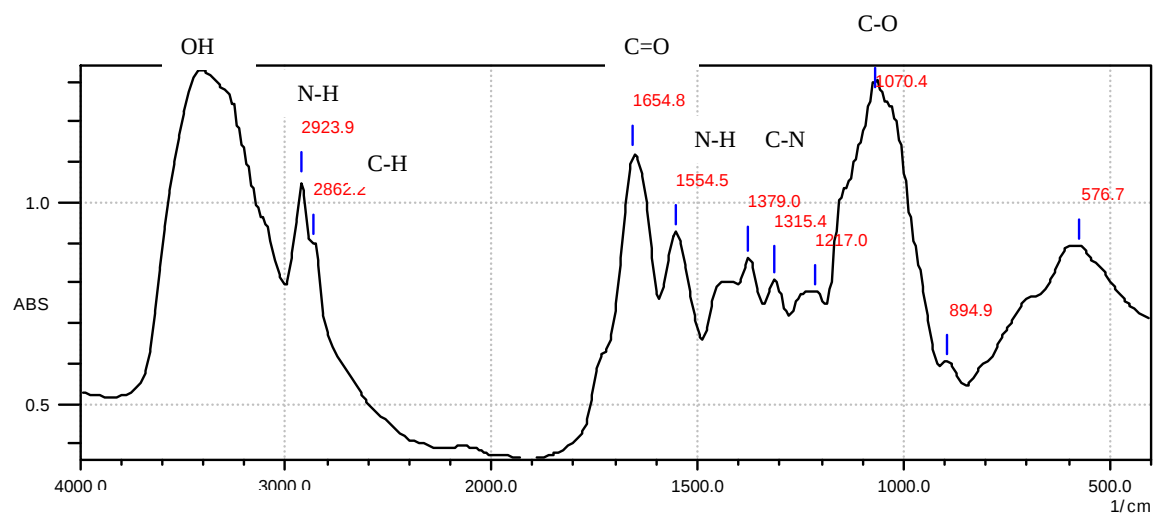


Figura 48. FTIR de hifas de *Thermomyces lanuginosus* inoculadas em meio YpSs variante IV (sem adição de fontes de carbono).

Embora as hifas não tenham sido submetidas a um processo de extração e purificação da quitina, o que poderia levar a um pequeno deslocamento das bandas pela presença de outros compostos secundários, os espectros mostram claramente a presença de grupamentos hidroxila livres, que absorvem fortemente na faixa de 3.650 a 3.584 cm^{-1} .

A frequência de absorção da carbonila de amidas terciárias ocorre na faixa de 1.680 a 1.630 cm^{-1} (Figuras 44 a 48).

A presença de ácido oleico ou dioleato de pentaeritritol (Figuras 46 e 47), alargam a banda entre 3.600 e 3.200 cm^{-1} , relativa à ligação de hidrogênios de grupos COOH.

Ésteres e lactonas possuem duas bandas de absorção bastante intensas provenientes de deformações axiais de C=O e C-O. A vibração de deformação axial de C=O ocorre a frequências mais altas (menores comprimentos de onda) do que a das cetonas normais. A constante de força da ligação carbonila é aumentada pela tendência do átomo de oxigênio adjacente de atrair elétrons (efeito indutivo). A banda de absorção do C=O de ésteres alifáticos ocorre na faixa de 1.750 a 1.735 cm^{-1} . As bandas de absorção em formiatos, ésteres α,β -insaturados e arílicos ocorrem na faixa de 1.730 – 1.715 cm^{-1} . A conjugação adicional pouco afeta a frequência de absorção da carbonila (Bassler & Merrill, 1979).

As amidas secundárias acíclicas mostram uma banda que aparece na faixa de 1.570 a 1.515 cm^{-1} . Esta banda resulta da interação entre a deformação angular do N-H e a deformação axial C-N do grupo C-N-H. Uma segunda banda mais fraca e próxima a 1.250 cm^{-1} resulta igualmente da interação entre a deformação angular do grupamento N-H e a deformação axial de C-N, semelhante à dados da literatura (Bassler & Merrill, 1979).

Portanto, os espectros aqui obtidos, são semelhantes aos da quitina de um outro fungo e comparável aos da SIGMA. Então, mesmo com as diferentes fontes de carbono, as quitinas que compõem as paredes celulares do fungo, não sofrem variações significativas.

Finalmente, nas figuras 49 e 50 são apresentados os resultados de espectroscopia de infravermelho obtidos das hifas em pastilhas de KBr, onde observam-se basicamente as mesmas bandas observadas para as outras variantes de YpSs, mesmo quando pentaeritritol foi substituído por 1,6-Hexanodiol, e quando Dioleato de pentaeritritol foi substituído por Dioleato de 1,6-Hexanodiol.

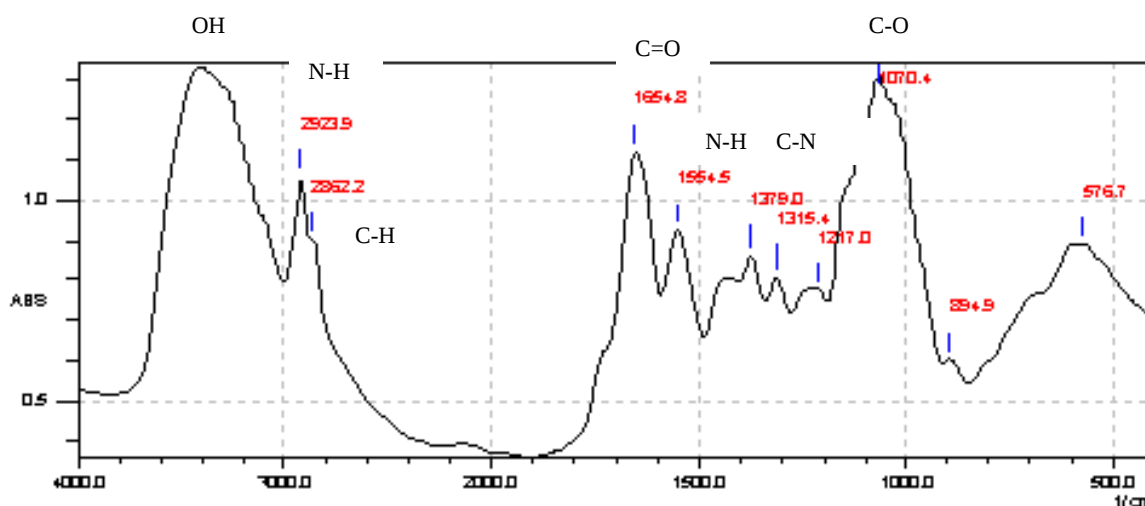


Figura 49. FTIR de hifas de *Thermomyces lanuginosus* inoculadas em meio YpSs variante X (fonte de carbono = 1,6-Hexanodiol).

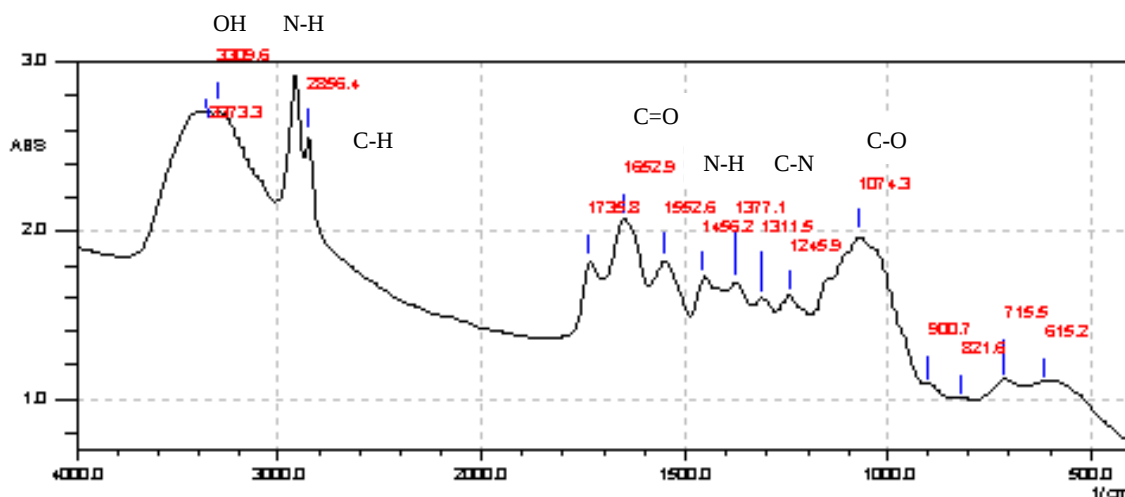


Figura 50. FTIR de hifas de *Thermomyces lanuginosus* inoculadas em meio YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol).

Mesmo para estas duas novas variantes de meios propostas (YpSs v. X e YpSs v. XI), a atribuição de bandas é semelhante a todos os casos anteriores (Figura 44 a 48).

Os resultados de FTIR mostraram que não ocorrem mudanças significativas na parede celular de *Thermomyces lanuginosus*, quando inoculado em meios de cultura YpSs onde o amido (fonte de carbono) foi substituído por matérias primas industriais, tais como utilizadas aqui, como intermediários clássicos, na síntese de ésteres.

4.3 Imobilização de *Thermomyces lanuginosus* em Gel de Alginato

A imobilização das hifas de *Thermomyces lanuginosus* em gel de alginato, possibilita a concentração de células microbianas no local específico, preservando suas atividades catalíticas (Walsh & Malone, 1995).

4.3.1 Pellets

O fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* foi inoculado e incubado por 7 dias a 50 °C nos seguintes meios líquidos (sem ágar):

- i) YpSs Standard
- ii) YpSs variante III
- iii) YpSs variante XI

A obtenção dos *pellets* (item 3.2.3) levou a um rendimento de 10 a 15 % em termos de *pellets* preenchidos com micélio de *Thermomyces lanuginosus*. Não foi observado micélio livre na solução da CaCl_2 .

4.3.2 Pellet Único

Adicionalmente, foi produzido um único *pellet* contendo grande quantidade de micélio (item 3.2.3.1) (Figura 51).

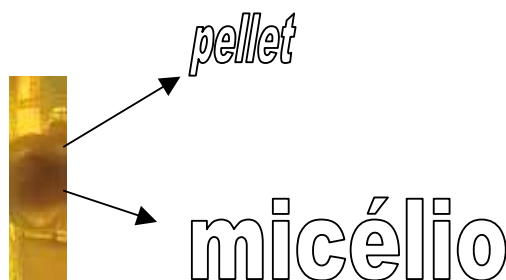


Figura 51. Tubo de cultura contendo *pellet* único.

Após o processo de agitação em sentidos inversos (item 3.2.3), comparou-se 2 pellets aleatórios:

- Sobre uma lâmina de vidro, a esquerda um *pellet* preenchido com micélio triturado de *Thermomyces lanuginosus*, e a direita um *pellet* vazio (Figura 52).



Figura 52. *Pellet* preenchido com micélio (a esquerda) e *pellet* vazio (a direita).

Isto mostrou que a forma ovalada regular do *pellet* deixa de existir, quando o mesmo é ocupado pelo micélio do fungo. É possível se obter o micélio encapsulado, mas com forma irregular, talvez devido à tensão superficial modificada pela presença do micélio. Isto pode influenciar na ação enzimática.

4.4 Índice de Acidez dos Meios Reacionais

Após a obtenção de quantidade suficiente de hifas de *Thermomyces lanuginosus* nos meios YpSs Standard, YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol) e YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol), as mesmas foram encapsuladas em *pellets* de alginato de cálcio e acondicionadas nos meios reacionais A, B, C e D (item 3.1.1).

O índice de acidez é importante para detectar uma possível esterificação.

Uma queda neste índice, significa que o ácido está sendo consumido pela reação de esterificação.

Todos os meios reacionais tiveram sua acidez averiguada por titulação ácido-base imediatamente após o preparo e também após sua esterilização. Após um período de 90 dias em estufa a 50 °C, todos os controles (meios sem *pellets*) não mostraram variações no Índice de Acidez uma vez esterilizados.

4.4.1 Índice de Acidez do Meio A (Ácido Oleico/Pentaeritritol)

i) Cálculo da Acidez obtida para *pellets* com hifas oriundas de YpSs Standard

$$\text{I.Ac (mgKOH/g)} = \frac{\text{Vgasto KOH} \times 0,1 \times 56,11 \times F}{\text{massa de amostra}}$$

Índice de Acidez encontrado antes imediatamente após o preparo do meio:

Vgasto KOH = 10,45 mL
F = 0,9919
massa da amostra (Meio A) = 0,3489 g

Logo, o I.Ac. é igual a:

Índice de Acidez = 166,69 mg KOH/g

Considerando-se que a acidez para este meio seria expressa basicamente pela presença de ácido oleico livre, teríamos teoricamente um índice de acidez esperado de 166,63 mgKOH/g, o que está perfeitamente coerente com o resultado encontrado.

Após a esterilização (15 minutos a 121 °C), o Índice de Acidez foi:

Vgasto KOH = 9,70 mL
F = 0,9919
massa da amostra (Meio A) = 0,3551 g

Logo, o I.Ac. é igual a:

Índice de Acidez = 152,03 mg KOH/g

Este resultado indica uma pequena esterificação durante o processo de autoclavagem.

Após 15 dias em estufa a 50 °C contendo micélio encapsulado, o Índice de Acidez encontrado foi de:

Vgasto KOH = 8,45 mL
F = 0,9919
massa da amostra (Meio A) = 0,3933 g

Logo, o I.Ac. é igual a:

Índice de Acidez = 119,57 mg KOH/g

Este resultado evidencia a presença de esterificação durante a incubação dos *pellets*. Todavia, no meio A observa-se também que durante todo o experimento, pentaeritritol fica precipitado no fundo do recipiente por não ser miscível com o ácido oleico. A figura 53 mostra a esquerda o meio A imediatamente após a esterilização (mais claro) e a direita (mais escuro) após 15 dias em estufa a 50 °C contendo *pellets* com hifas encapsuladas.



Figura 53. Acompanhamento do Índice de Acidez no Meio Reacional A.

No meio reacional A, também foi inoculado o *pellet* único com grande quantidade de micélio e o resultado obtido para o Índice de Acidez:

Vgasto KOH = 8,45 mL
F = 0,9919
massa da amostra (Meio A) = 0,3866 g

Logo, o I.Ac. é igual a:

Índice de Acidez = 118,77 mg KOH/g

Este resultado também evidencia a presença de esterificação durante a incubação do *pellet* gigante.

ii) Cálculo da Acidez obtida para pellets com hifas oriundas de YpSs variante III

A tabela 11 mostra os resultados de índice de acidez, decorridos 15 dias a 50 °C da inoculação de *pellets* contendo micélio obtido após a inoculação de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol), no meio reacional A (Ácido Oleico + Pentaeritritol) imediatamente após o preparo do meio.

Tabela 11. Comparação entre valores de Índice de Acidez obtidos após inoculação com micélio encapsulado oriundo de YpSs Standard e YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol).

MEIO REACIONAL A Valores de Índice de Acidez (mgKOH/g)	Micélio encapsulado (YpSs Standard)	Micélio encapsulado (YpSs variante III)
I.Ac. Inicial	166,69	165,91
I.Ac. após esterilização	152,03	154,07
I.Ac. com pellets	119,57	115,44
I.Ac. com pellet único (gigante)	118,77	109,78

Estes resultados evidenciam a presença de esterificação durante a incubação dos *pellets* (ou *pellet*), e o valor ligeiramente inferior de I.Ac. obtido com hifas de *Thermomyces lanuginosus* obtidas em YpSs variante III em relação ao experimento com YpSs Standard, sugere uma melhor produção de lipases, uma vez que o fungo fora previamente adaptado à Dioleato de Pentaeritritol. Observou-se contudo uma diferença pequena a ser considerada entre o resultado obtido com diversos *pellets* e o *pellet* gigante.

4.4.2 Índice de Acidez do Meio B (Dioleato de Pentaeritritol)

A tabela 12 mostra os resultados de índice de acidez, decorridos 15 dias a 50 °C da inoculação de micélio encapsulado de *Thermomyces lanuginosus* previamente inoculado em YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol), no meio reacional B (Dioleato de Pentaeritritol) imediatamente após o preparo do meio.

Tabela 12. Comparação entre valores de Índice de Acidez obtidos após inoculação com pellets contendo micélio encapsulado oriundo YpSs variante III (fonte de carbono = Dioleato de Pentaeritritol) e *pellet* único oriundo de YpSs variante III.

MEIO REACIONAL B	
Valores de Índice de Acidez (mgKOH/g)	Micélio encapsulado (YpSs variante III)
I.Ac. Inicial	6,52
I.Ac. após esterilização	6,60
I.Ac. com <i>pellets</i>	2,12
I.Ac. com <i>pellet</i> único (gigante)	2,01

Estes resultados evidenciam a presença de esterificação durante a incubação dos *pellets* (ou *pellet*), e o valor ligeiramente inferior de I.Ac. obtido com hifas de *Thermomyces lanuginosus* obtidas em YpSs variante III. Observou-se adicionalmente a capacidade de esterificação mesmo em condições de impedimentos estéricos já presentes quando da própria síntese química do éster.

Considerando-se que a acidez para este meio seria expressa basicamente pelo ácido oleico livre, teríamos teoricamente um índice de acidez esperado apenas pela presença de ácido oleico que não reagiu durante a síntese do éster.

Concluído o ciclo da auto-clavagem, o resultado do índice de acidez indica a ausência de esterificação durante este processo, o que se demonstra bastante coerente devido a impedimentos estéricos das hidroxilas restantes, uma vez que, nas condições de esterilização (1 atm, 121 °C, 15 minutos) temos uma menor energia quando comparamos às condições nas quais o éster foi sintetizado (230 a 240 °C).

Após a inoculação de *Thermomyces laniginosus*, os resultados evidenciam a presença de esterificação adicional durante a incubação dos *pellets*, além de efeito catalítico suficiente para superar as dificuldades de esterificação, isto é, a barreira de energia de ativação, relacionada a esta reação. O resultado obtido para o índice de acidez com a inoculação de um *pellet* único contendo grande quantidade de micélio também ratifica esta condição.

Observou-se contudo uma diferença pequena a ser considerada entre o resultado obtido com diversos *pellets* e o *pellet* gigante.

4.4.3 Índice de Acidez do Meio Reacional C (Ácido Oleico/1,6-Hexanodiol)

Na tabela 13 estão representados as variações dos índices de acidez, decorridos 15 dias a 50 °C da inoculação de *pellets* contendo micélio obtido após a inoculação de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs Standard e YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol), no meio reacional C (Ácido Oleico + 1,6-Hexanodiol) imediatamente após o preparo do meio.

Tabela 13. Comparação entre valores de Índice de Acidez obtidos após inoculação com micélio encapsulado oriundo de YpSs Standard e YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol).

MEIO REACIONAL C Valores de Índice de Acidez (mgKOH/g)	Micélio encapsulado (YpSs Standard)	Micélio encapsulado (YpSs variante XI)
I.Ac. Inicial	159,32	160,76
I.Ac. após esterilização	80,40	76,07
I.Ac. com <i>pellets</i>	24,98	20,33
I.Ac. com <i>pellet</i> único (gigante)	20,93	17,89

Estes resultados evidenciam a presença de esterificação durante a incubação dos *pellets* (ou *pellet*), e o valor ligeiramente inferior de I.Ac. obtido com hifas de *Thermomyces lanuginosus* obtidas em YpSs variante XI em relação ao experimento com YpSs Standard, sugere talvez uma melhor produção de lipases, uma vez que o fungo fora previamente adaptado à Dioleato de 1,6-Hexanodiol. Observou-se contudo uma diferença pequena a ser considerada entre o resultado obtido com diversos *pellets* e o *pellet* gigante.

A queda do índice de acidez durante o processo de esterilização, pode também favorecer a ação dos *pellets* (ou *pellet*) devido a formação adicional de éster durante a auto-clavagem. No meio reacional C observa-se claramente uma fase única durante todo o experimento, visto que 1,6-Hexanodiol é solúvel em ácido oleico. Através da figura 54 pode-se observar a formação de gotículas de água dispersas no meio de cultura após a incubação dos *pellets*. Acredita-se que esta água possa ser oriunda tanto da desidratação dos *pellets*, mas também, possa ser originária de reações de esterificação.



Figura 54. Acompanhamento do Índice de Acidez do Meio Reacional C.

A figura 55 ilustra um desses *pellets* gigantes obtidos e incubados no meio reacional C. Por sua vez, o meio reacional C apresenta uma fase homogênea de 1,6-Hexanodiol e Ácido Oleico, como pode ser observado abaixo.



Figura 55. Acompanhamento do Índice de Acidez no Meio Reacional C com *pellet* gigante.

4.4.4 Índice de Acidez do Meio Reacional D (Dioleato de 1,6-Hexanodiol)

A tabela 14 mostra os resultados de índice de acidez decorridos 15 dias a 50 °C após inoculação de micélio encapsulado de *Thermomyces lanuginosus* previamente inoculado em YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol), no meio reacional D (Dioleato de 1,6-Hexanodiol) imediatamente após o preparo do meio.

Tabela 14. Comparação entre valores de Índice de Acidez obtidos após inoculação com pellets contendo micélio encapsulado oriundo YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol) e *pellet* único oriundo de YpSs variante XI.

MEIO REACIONAL D	
Valores de Índice de Acidez (mgKOH/g)	Micélio encapsulado (YpSs variante XI)
I.Ac. Inicial	4,24
I.Ac. após esterilização	4,29
I.Ac. com <i>pellets</i>	2,13
I.Ac. com <i>pellet</i> único (gigante)	2,06

Estes resultados evidenciam a presença de esterificação durante a incubação dos *pellets* (ou *pellet*), e o valor ligeiramente inferior de I.Ac. obtido com hifas de *Thermomyces lanuginosus* obtidas em YpSs variante XI. Observou-se adicionalmente a capacidade de esterificação mesmo em condições de impedimentos estéricos já presentes quando da própria síntese química do éster.

4.5 Cromatografia Gasosa

Com o objetivo de corroborar os resultados obtidos da titulação ácido-base a técnica adicional da cromatografia gasosa foi utilizada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho.

A cromatografia é um método físico químico de separação, identificação e quantificação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases (estacionária e fluído insolúvel). No experimento em questão, passa a ser de grande utilidade para a determinação da presença eventual de compostos éster de composição indefinida, que teriam sua síntese catalisada pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*. Aqui a cromatografia baseia-se, na partição ou adsorção da amostra entre uma fase móvel (FM) líquida e uma fase estacionária (FE). Neste estudo a técnica da cromatografia foi utilizada somente com a finalidade de qualificar a presença (ou não) dos compostos avaliados.

A técnica empregada não permitiu a análise ou separação perfeita dos compostos formados, mas pôde caracterizar-se como uma grande evidência de aumento na participação de certos compostos formados por biocatálise, nos meios de cultura. O meio utilizado para análise foi YpSs meio C (1,6-Hexanodiol + Ácido Oleico) por ser homogêneo nas condições de ensaio. A temperatura de ensaio nas colunas foi fixada em 200 °C (temperatura máxima do aparelho), visando a máxima separação possível.

O cromatograma obtido com uma solução preparada com concentração 0,01 % de 1,6-Hexanodiol (1 mol) e Ácido Oleico (1,73 mol) em acetona (Figura 56), mostra que dois picos são bastante evidentes. O primeiro (“pico estourado”) representa a acetona PA, ao passo que o segundo pico com tempo de retenção 6,106 minutos caracteriza o 1,6-Hexanodiol. O ácido oleico não foi detectado neste ensaio, após 40 minutos (tempo de ensaio) neste tipo de coluna.

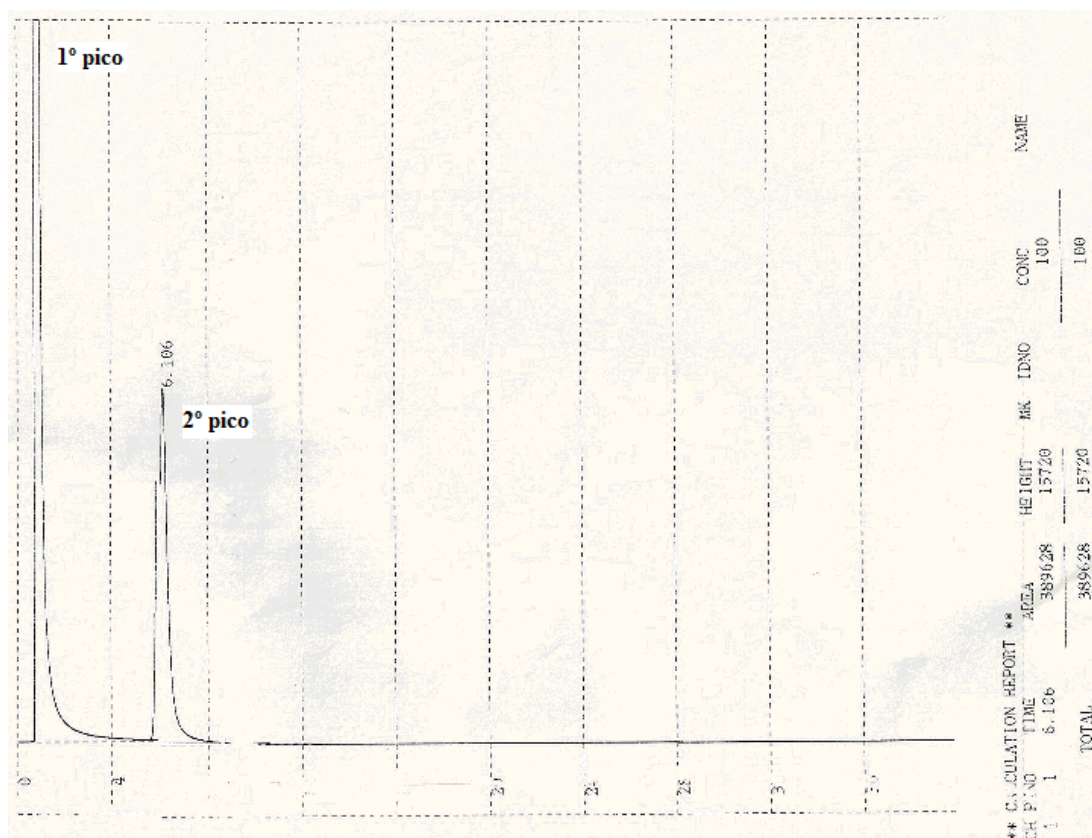


Figura 56. Cromatograma de uma solução 0,01% m/m de 1,6-Hexanodiol.

O cromatograma obtido com uma solução preparada com concentração 0,01 % de Dioleato de 1,6-Hexanodiol preparado por síntese química em laboratório, com Índice de Acidez residual de 4,24 mg KOH/g em acetona apresenta três picos. (Figura 57).

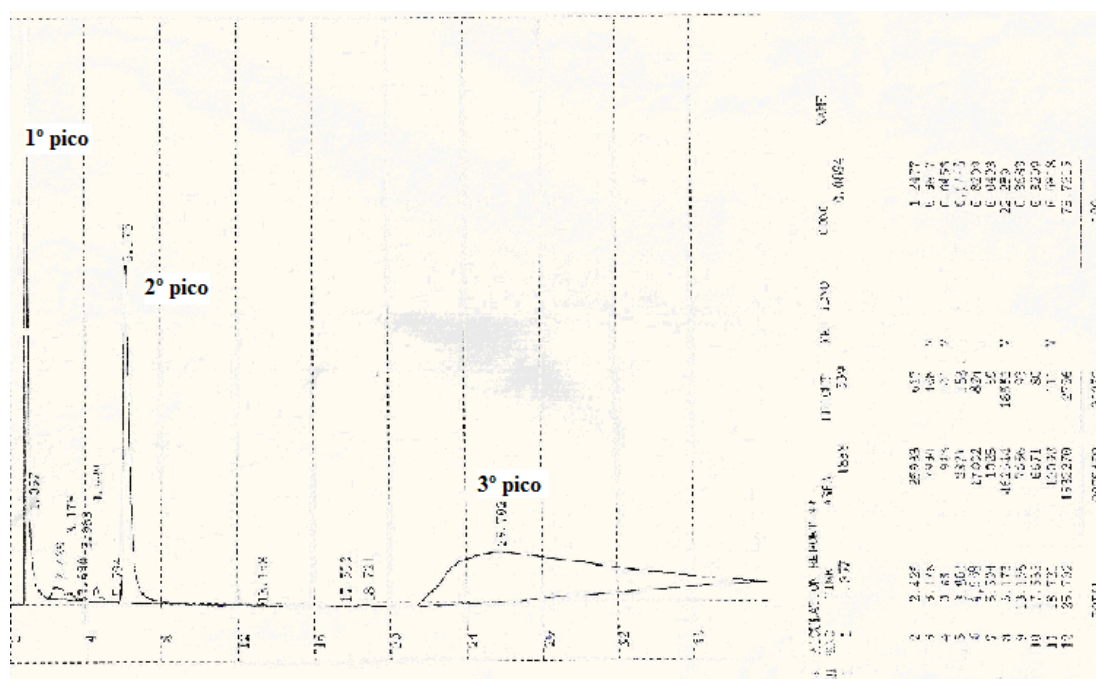


Figura 57. Cromatograma de uma solução 0,01 % m/m de Dioleato de 1,6-Hexanodiol.

Neste resultado, observa-se o primeiro pico da acetona (1° pico), e o pico com tempo de retenção 6,175 minutos que caracteriza o 1,6-Hexanodiol livre (2° pico). Adicionalmente, encontramos algumas substâncias que demonstram baixo tempo de retenção, e um composto que representa 73,7215 % da área total do cromatograma, com tempo de retenção de aproximadamente 25,702 minutos (Dioleato de 1,6-Hexanodiol) (3° pico). Desta forma, caracteriza-se o Dioleato de 1,6-Hexanodiol por um pico achatado e com tempo de retenção de aproximadamente 26 minutos nas condições de ensaio.

O cromatograma obtido com uma solução preparada com concentração 0,01 % m/m de meio reacional C (1,6-Hexanodiol + Ácido Oleico) após esterilização em acetona PA (Figura 58), com índice de acidez residual de 80,40 mgKOH/g mostra que três picos são bastante evidentes.

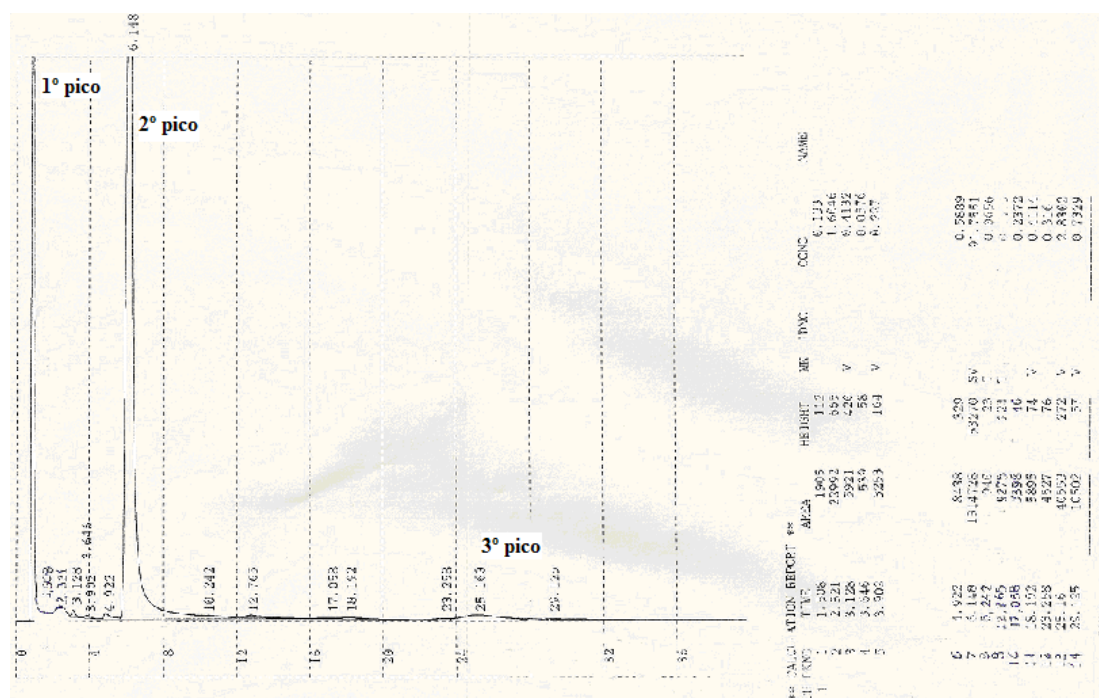


Figura 58. Cromatograma de uma solução 0,01 % m/m de Meio Reacional C após esterilização.

Neste resultado, evidencia-se o primeiro pico da acetona PA (1º pico), e o pico (“estourado”) com tempo de retenção 6,148 minutos que caracteriza o 1,6-Hexanodiol (2º pico). Adicionalmente, encontramos algumas substâncias que demonstram baixo tempo de retenção, e um composto que representa 2,8302 % da área total do cromatograma, com tempo de retenção de aproximadamente 25,16 minutos (provavelmente Dioleato de 1,6-Hexanodiol obtido no processo de esterilização). Este experimento será considerado como controle.

O cromatograma obtido com uma solução preparada com concentração 0,01 % m/m de meio reacional C (1,6-Hexanodiol + Ácido Oleico) após esterilização em acetona (Figura 59), com Índice de Acidez residual de 80,40 mg KOH/g, e *pellets* contendo micélio encapsulado de *Thermomyces lanuginosus* inoculados em YpSs Standard, mostra três picos.

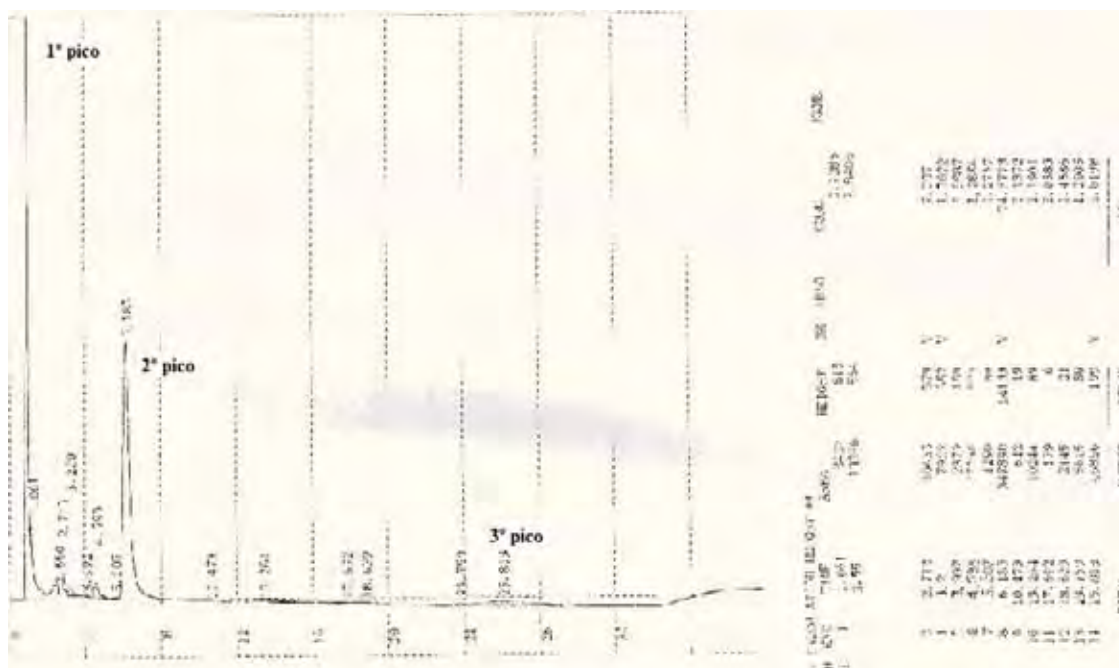


Figura 59. Cromatograma de uma solução 0,01 % m/m de Meio Reacional C contendo *pellets* oriundos de YpSs Standard.

O primeiro pico da acetona (“estourado”) e o pico com tempo de retenção 6,185 minutos (2º pico) que caracteriza o 1,6- Hexanodiol. Adicionalmente, encontramos algumas substâncias que demonstram baixo tempo de retenção, e um composto que representa aproximadamente 10,0198 % da área total do cromatograma, com tempo de retenção de aproximadamente 25,813 minutos (3º pico) (provavelmente Dioleato de 1,6-Hexanodiol). Nota-se, portanto, aumento deste componente em relação ao controle (Figura 58).

O cromatograma obtido com uma solução preparada com concentração 0,01 % de meio reacional C (1,6-Hexanodiol + Ácido Oleico) após esterilização em acetona (Figura 60), com Índice de Acidez residual de 80,40 mg KOH/g, e *pellet* único contendo micélio encapsulado de *Thermomyces lanuginosus* inoculados em YpSs Standard, mostra três picos.

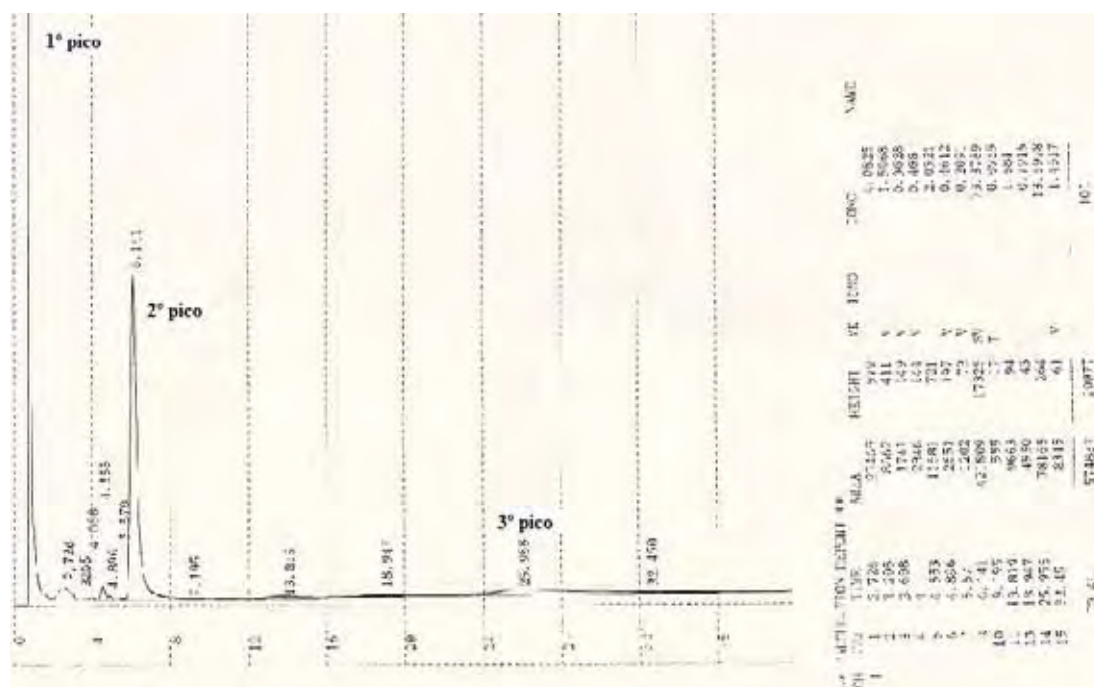


Figura 60. Cromatograma de uma solução 0,01 % m/m de Meio Reacional C contendo *pellet* único oriundo de YpSs Standard.

Neste resultado, evidencia-se o primeiro pico da acetona (“estourado”), e o pico com tempo de retenção 6,141 minutos (2º pico) que caracteriza o 1,6-Hexanodiol. Adicionalmente, encontramos algumas substâncias que demonstram baixo tempo de retenção, e um composto que representa 13,3978 % da área total do cromatograma, com tempo de retenção de aproximadamente 26,0 minutos (provavelmente Dioléato de 1,6-Hexanodiol). Nota-se, portanto, aumento deste componente em relação ao controle (Figura 58).

O cromatograma obtido com uma solução preparada com concentração 0,01 % de meio reacional C (1,6-Hexanodiol + Ácido Oleico) após esterilização em acetona (Figura 61), com Índice de Acidez residual de 80,40 mg KOH/g, e *pellets* contendo micélio encapsulado de *Thermomyces lanuginosus* inoculados em YpSs variante XI, mostra três picos.

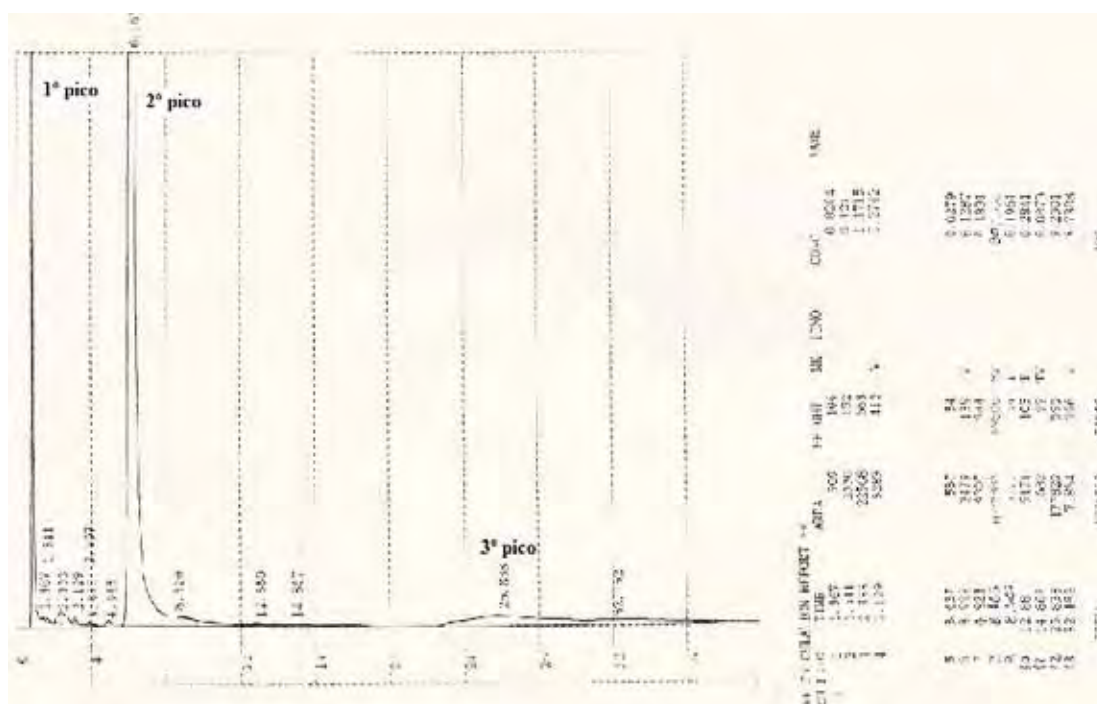


Figura 61. Cromatograma de uma solução 0,01 % m/m de Meio Reacional C contendo *pellets* oriundos de YpSs variante XI.

O primeiro pico da acetona (“estourado”) e o pico (também “estourado”) são observados com tempo de retenção 6,165 minutos (2º pico), que caracteriza o 1,6-Hexanodiol. Adicionalmente, encontramos algumas substâncias que demonstram baixo tempo de retenção, e um composto que representa 9,2301 % da área total do cromatograma, com tempo de retenção de aproximadamente 25,80 minutos (provavelmente Dioleato de 1,6-Hexanodiol). Nota-se, portanto, aumento deste componente em relação ao controle (Figura 58).

O cromatograma obtido com uma solução preparada com concentração 0,01 % de meio reacional C (1,6-Hexanodiol + Ácido Oleico) após esterilização em acetona (Figura 62), com Índice de Acidez residual de 80,40 mg KOH/g, e *pellet* único contendo micélio encapsulado de *Thermomyces lanuginosus* inoculados em YpSs variante XI, mostra quatro picos.

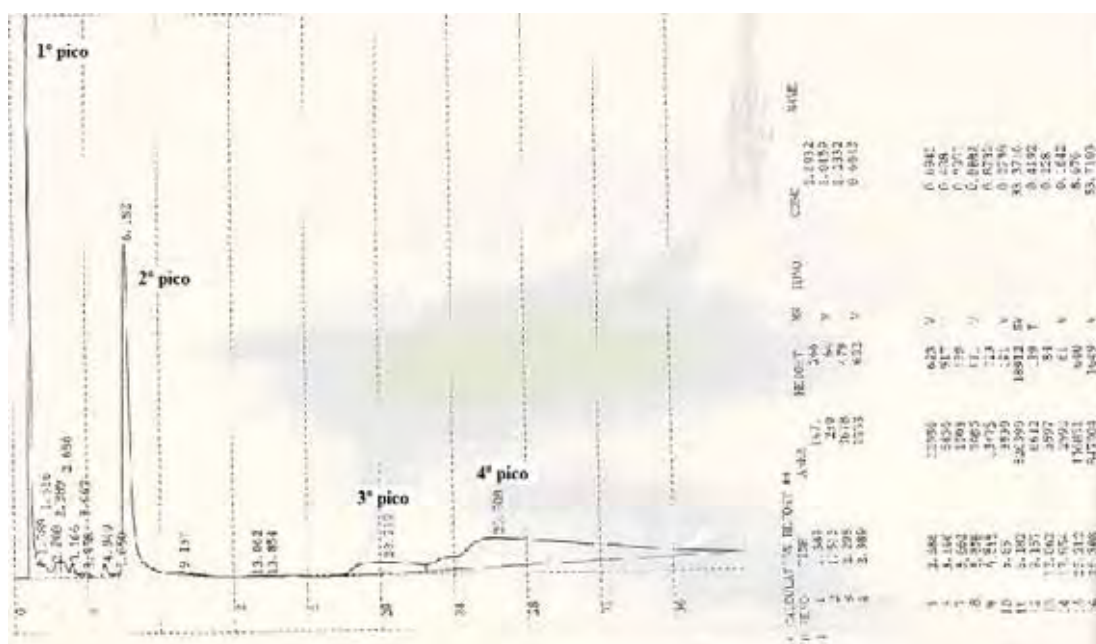


Figura 62. Cromatograma de uma solução 0,01 % m/mMeio Reacional C contendo *pellet* único oriundo de YpSs variante XI.

Neste resultado, evidencia-se o primeiro pico da acetona (“estourado”) e o pico (também “estourado”) com tempo de retenção 6,182 minutos (2º pico) que caracteriza o 1,6- Hexanodiol. Adicionalmente, encontramos algumas substâncias que demonstram baixo tempo de retenção, e um composto que representa 8,686 % da área total do cromatograma (4º pico), com tempo de retenção de aproximadamente 20,20 minutos (provavelmente Dioleato de 1,6-Hexanodiol). Nota-se, portanto, aumento significativo deste componente em relação ao controle (Figura 58).

Neste experimento tivemos o aparecimento de uma segunda substância não identificada (3º pico), mas com tempo de retenção próximo ao Dioleato de 1,6-Hexanodiol, indicando possivelmente tratar-se de um intermediário de esterificação.

Na tabela 15 representa-se um resumo dos resultados encontrados nos experimentos de cromatografia gasosa. Considerou-se que o tempo de retenção para o dioleato de 1,6-Hexanodiol é de aproximadamente 25,7 minutos (conforme demonstrado na figura 57).

Tabela 15. Resumo dos parâmetros dos experimentos de Cromatografia Gasosa.

Meio Reacional C (1,6 Hexanodiol + Ácido Oleico) <i>1 : 1,73</i>	Tempo de Retenção 1,6-Hexanodiol (% Área)	Tempo de Retenção Dioleato de 1,6-Hexanodiol (% Área)
Controle	6,106 minutos (100 %) *	-
<i>Pellets</i> YpSs Standard	6,185 minutos (74,3773 %)	25,813 minutos (10,0198 %)
<i>Pellet</i> único YpSs Standard	6,141 minutos (73,3789 %)	25,955 minutos (13,3978 %)
<i>Pellets</i> YpSs variante XI	6,165 minutos (80,7334 %)	25,839 minutos (9,2301 %)
<i>Pellet</i> único YpSs variante XI	6,182 minutos (33,3716 %)	26,308 minutos (53,7103 %)

* - O valor de 100 % deve-se ao fato de não ter sido possível detectar a presença de ácido oleico no método proposto.

Os valores obtidos nos ensaios de cromatografia devem ser interpretados à luz do caráter qualitativo. A grande capacidade de separação do componente mais polar (1,6-Hexanodiol - um glicol alifático de seis carbonos e duas hidroxilas primárias nos carbonos 1 e 6), gera valores distorcidos na área calculada deste componente no cromatograma, entretanto é perfeitamente factível a identificação deste componente.

Quanto ao éster de ácido graxo formado (Dioleato de 1,6-Hexanodiol), embora a separação não seja eficaz uma vez que, neste caso a macromolécula é consideravelmente mais apolar, podemos observar claramente o aparecimento deste componente, assim como o seu aumento é facilmente identificável quando introduz-se a biocatálise pelo fungo.

Uma outra observação que se faz pertinente é o fato de que para os *pellets* obtidos da inoculação de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs Standard foi gerada uma quantidade um pouco maior de Dioleato de 1,6-Hexanodiol que aquela quando utilizou-se *pellets* oriundos do mesmo fungo inoculado em YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol), o que não foi observado para o caso do *pellet* único (neste caso, uma quantidade muito maior de Dioleato de 1,6-Hexanodiol foi obtido para o *pellet* único de YpSs variante XI).

Este resultado pode ser associado a obtenção irregular do número de *pellets* que são preenchidos com hifas que são obtidas pelo processo de encapsulamento do fungo termofílico proposto.

Assim, a associação dos valores de Índice de Acidez com os cromatogramas obtidos permitem verificar a capacidade de *Thermomyces lanuginosus* em promover a biocatálise viva necessária para as reações de esterificação dos componentes de um meio contendo pelo menos um glicol e um ácido graxo, uma vez que já comprovou-se também que não existem mudanças nas características morfológicas do fungo quando o mesmo cresce em meios contendo esses componentes.

4.6 Interação Fungo/Poliéster (Poliácido lático - PLLA).

Com os resultados de esterificação obtidos com *Thermomyces lanuginosus* encapsulado em gel de alginato de cálcio, um experimento adicional foi conduzido com o fungo termofílico, com a inoculação de *Thermomyces lanuginosus* em meios de cultura contendo poliácido lático, como fonte de grupamentos éster. Este procedimento permitiu observar se a presença de uma grande concentração de ésteres poderia levar a uma maior produção de lipases.

Após o crescimento de *Thermomyces lanuginosus* em meio de cultura YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol), o mesmo teve um esfregaço de hifas inoculadas em outro meio YpSs variante XI esterilizado, contendo um disco de filme de poliácido lático previamente preparado de aproximadamente 10 cm de diâmetro e 100 µm de espessura. O filme de PLLA foi obtido pela evaporação de soluções diluídas de dicloroetano a 60 °C, secado em dessecador à vácuo durante 48 horas e em seguida incubado no meio sugerido (Campos & Martins-Franchetti, 2005).

O poliácido lático (um polímero contendo uma altíssima densidade de grupamentos éster) foi introduzido no meio com o objetivo de funcionar como um indutor à produção de enzimas (Figura 63).

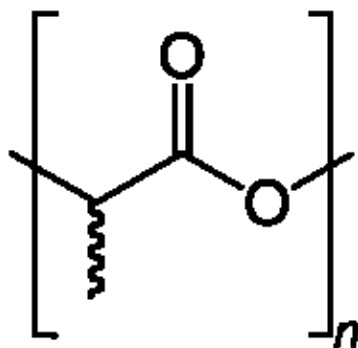


Figura 63. Estrutura de um Poliácido lático.

No meio YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol) a inoculação de *Thermomyces lanuginosus* apresentou grande formação de biofilme, conforme ilustra a figura 64.



Figura 64. Biofilme obtido após a inoculação de *Thermomyces lanuginosus* em meio YpSs variante XI (fonte de carbono = Dioleato de 1,6-Hexanodiol), contendo disco de PLLA.

Por sua vez, o disco de PLLA ficou completamente destruído após o período de incubação proposto (Figura 65).



Figura 65. Pedacos do disco de PLLA.

Após a lavagem do biofilme formado com acetona e secagem do mesmo em estufa microbiológica a 50 °C, os resultados FTIR mostraram o seguinte espectro obtido em pastilhas de KBr (Figura 66).

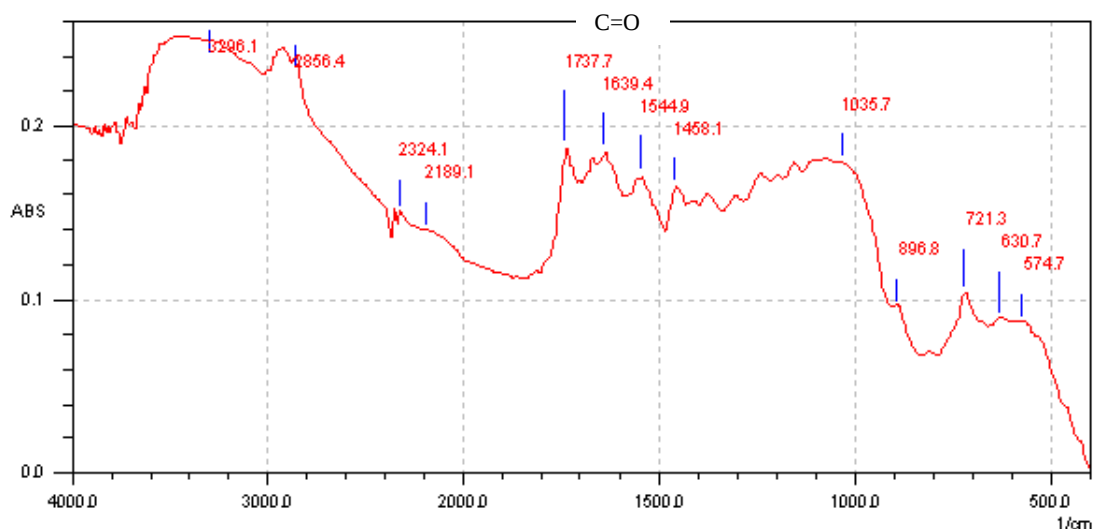


Figura 66. FTIR de biofilme obtido após a inoculação de *Thermomyces lanuginosus* em YpSs variante XI contendo disco de PLLA.

Neste espectro nota-se de maneira bastante evidente a presença de uma banda em $1.737,7 \text{ cm}^{-1}$.

Os grupamentos ésteres possuem duas bandas de absorção bastante intensas provenientes de deformações axiais de C=O e C-O. A banda de absorção de ésteres alifáticos saturados ocorre na região de $1.750 \text{ a } 1.735 \text{ cm}^{-1}$. Os ésteres e lactonas possuem duas bandas de absorção bastante intensas provenientes de deformações axiais de C=O e C-O.

No caso do biofilme formado, que é uma mistura complexa e de composição variada em polímeros, água, enzimas e microrganismos, não é portanto possível a afirmação de que o material formado trata-se de um polímero natural contendo grupamentos éster, mas as evidências encontradas indicam claramente esta possibilidade.

Os resultados obtidos com o encapsulamento das hifas de *Thermomyces lanuginosus* que foram incubados em meios contendo discos de poliácido láctico, apenas confirmaram uma vez mais a tendência a queda do Índice de Acidez do meio, mas não mostraram valores significativamente diferentes dos já discutidos anteriormente.

Nenhuma modificação nas características morfológicas do fungo termofílico também foi observada quando o mesmo cresce na presença de PLLA.

Entretanto, em todos os meios avaliados neste trabalho, apenas observou-se a presença de um biofilme, quando *Thermomyces lanuginosus* foi inoculado e incubado a 50 °C, com um polímero que apresenta repetidos grupamentos éster em sua macromolécula.

5. CONCLUSÕES

Diante do reduzido conhecimento da imensa diversidade micológica existente e disponível no meio ambiente, este estudo permitiu evidenciar o grande potencial a ser explorado em estudos de biocatálise com microrganismos vivos, em particular fungos termofílicos.

Não foram notadas alterações nas características morfológicas do fungo quando submetido a crescimento nas fontes de carbono escolhidas, o que ratificou a grande capacidade adaptativa de *Thermomyces lanuginosus*. Não restaram dúvidas sobre a capacidade deste fungo termofílico quando devidamente acondicionado, em promover e catalisar algumas reações de esterificação de compostos orgânicos utilizados na indústria química em geral (resultados de índice de acidez e cromatografia).

Efetivamente também foi comprovado pelos valores de índice de Acidez obtidos, que a eficácia da lipase produzida por *Thermomyces lanuginosus* em reações de esterificação está diretamente ligada a presença de água no meio reacional, sendo que condições anidras provavelmente favoreceriam o deslocamento da reação no sentido desejado (esterificação), mas exigiriam também a purificação da enzima (processo oneroso) numa primeira etapa.

Houve tendência à queda do Índice de Acidez e os cromatogramas evidenciaram o aparecimento de Dioleato de 1,6-Hexanodiol, porém a reação atinge um estado de equilíbrio (hidrólise) mesmo existindo ainda hidroxilas e ácidos carboxílicos para serem esterificados. A causa foi atribuída como sendo inativação do efeito reverso da esterificação, pela presença de água (Figura 67).

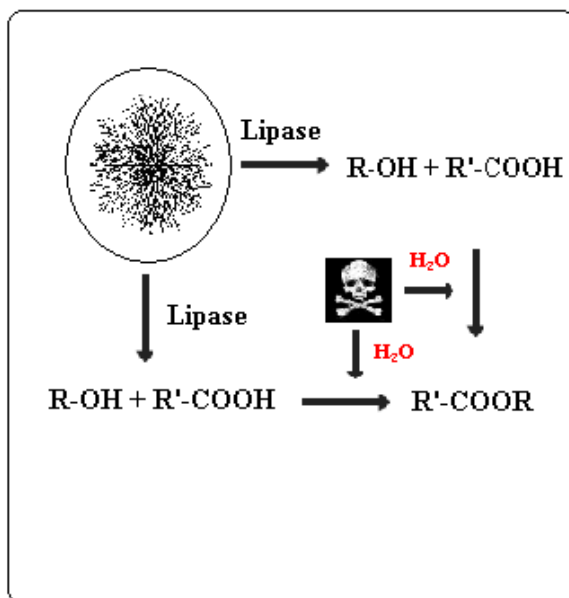


Figura 67. Efeito inibidor da água sobre a atividade catalítica (esterificação) da lipase produzida por *Thermomyces lanuginosus* encapsulado.

Em diferentes meios e na presença de fosfatos, *Thermomyces lanuginosus* é capaz de produzir um pigmento potencialmente importante para futuras aplicações tecnológicas, como por exemplo, fontes alternativas de materiais para corar alimentos, na indústria de cosméticos, na indústria têxtil e na indústria de tintas.

As matérias-primas que foram avaliadas como eventuais fontes de carbono disponíveis ao microrganismo são comumente encontradas na indústria química como intermediários clássicos na síntese de diversos ésteres com as mais variadas aplicações. Muitos fungos termofílicos são conhecidos como sendo produtores de lipases e o potencial destas nas reações de esterificação (reação inversa à hidrólise), há muito tem sido reconhecido. Estes estudos sugerem que *Thermomyces lanuginosus* é capaz de utilizar matérias-primas usadas na indústria química de síntese de macromoléculas, produzir pigmentos e interagir com macromoléculas biodegradáveis (PLLA). Desse modo, concluiu-se que este fungo é altamente promissor para futuros trabalhos de biocatálise, com microrganismos vivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M. W.W. 1993. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 °C. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.47, p.627-658.

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*, 4th edn., John Wiley & Sons, New York.

Allen, P.J.; Emerson, R. 1949. Guayule rubber, microbiological improvement by shrub retting. *Ind. Eng. Chem.*, v.41, p.346-365.

Arima, K.; Liu, W.-H.; Beppu, T. 1972. Studies on the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. *Agric. Biol. Chem.*, v.36, p.893-895.

Bassler, G.C.; Merrill, T.C. 1979. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Editora Guanabara, Rio de Janeiro.

Bhatnagar, S.; Jhori, B.N. 1988. Lipases of thermophilic moulds, in J. Holo and D. Torley (eds.), *Biotech. and Food Ind.*, Budapest, Hungary, p. 195-210.

Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. & Lewandowski, Z. 1994. *Biotech. and Bioeng.* v.43, 1994.

Bhat, K.M.; Bhat, S. 1998. *Clostridium thermocellum* cellulosome: dissociation, isolation and characterization of subunits and the potential biotechnological implications. *Recent Res. Dev. Biotechnol. Bioeng.*, v.1, p.59-84.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol., v.3, p.286-290.

Billmeyer, F.W.J. 1984. Textbook of Polymer Science, 3rd edn., John Wiley & Sons, New York.

Blöchl, E.; Rachel, R.; Burggraf, D.; Hafenbradl, H.; Jannasch, H.W.; Stetter, K.O. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 °C. Extremophiles, v.1, p.14-21.

Boel, E.; Bech, A.-M.; Randrup, K.; Draeger, B.; Fill, N.P.; Foltmann, B. 1986. Primary structure of a precursor to the aspartic proteinase from *Rhizomucor miehei* shows that the enzyme is synthesized as a zymogen. Proteins Struct. Funct. Genet., v.1, p.363-369.

Bononi, V.L.R.; Grandi, R.A.P. 1998. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

Campos, A.; Martins-Franchetti, S.M. 2005. Biotreatment effects in films and blends of PVC/PCL previously treated with heat. Brazilian Arch. of Biol. and Tech., v. 48 (2), p. 235-243.

Carey, F.A.; Sundberg, R.J. 1990. Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms. 3th ed. Plenum Press, New York.

Castellani, A. 1967. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further researches, J. Trop. Med. Hyg., v.42, p.181-184.

Chang, Y. 1967. The fungi of wheat straw compost. II Biochemical and physiological studies. Trans. Br. Mycol. Soc., v.50, p.667-677.

Chaplin, M. 2004. Alginate. London South Bank University. v.1, p.103-110.

Chandra, R., Rustgi, R. 1998. Biodegradable Polymers. Progr. Polym. Sci., v. 23, p. 1273-1335.

Chefetz, B.; Chen, Y.; Hadar, Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. Appl. Environ. Microbiol., v.64, p.3175-3179.

Cooney, D.G.; Emerson, R. 1964. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. W. H. Freeman & Co., San Francisco, California.

De Hoog, G.S.; Guarro, J., Gene, J.; Figueras, M.J. 2002. Atlas of Clinical Fungi, 2nd edn, The Netherlands and Facultat de Medicina, Netherland.

Deploey, J.J. 1995. Some factors affecting the germination of *Thermoascus aurantiacus*. Mycol., v.87, p.362-265.

Derewenda, U.; Swenson, L; Green, R.; Wei, Y.; Dodson, G.G.; Yamaguchi, S.; Hass, M.J.; Derewenda, Z.S. 1994. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. Nat. Struct. Biol., v.1, p.36-47.

Derikx, P.J.L.; Op den Camp, H.J.M.; Wagner, A.M.; Straatsma. G.; Van Griensven, L.J.L.D.; Vogels, G.D. 1990. Respiratory pathways in *Agaricus bisporus* and *Scytalidium thermophilum*. FEMS Microbiol. Lett., v.66, p.307-312.

Emerson, R. 1941. An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. Lloydia, v. 4, p.77-144.

Esposito, E.; Azevedo, J.L. 2004. Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. EDUCS – Editora da Universidade de Caxias do Sul, Brasil.

Fergus, C.L. 1969. The production of amylase by some thermophilic fungi. *Mycologia*, v.61, p.1171-1175.

Forchiassin, F. 1989. Estudios fotobiológicos en *Saccobolus platensis*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas e Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Franco, L.; Stamford, T. C.M.; Stamford, N. P.; Campos, T.; Galba, M. 2005. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica*, December-January, v.4, p. 40-44.

Góes, K.; Andrade, D.S.; Amaral, H.; Rigonato, J. 2007. Caracterização fenotípica de isolados de *Frankia sp* de Casuarinaceas. *Rev. Bras. de Agroecol.*, v.2, p.1287-1290.

Gupta, S.D.; Maheshwari, R. 1985. Is organic acid required for nutrition of thermophilic fungi?. *Arch. Microbiol.*, v.141, p.164-169.

Hansen, C.M. 1967. The Three Dimensional Solubility Parameter Key to Paint Component Affinities: 1. Solvents Plasticizers, Polymers and Resins. *J. of Paint Technol.*, v.39, n. 505.

Hartmeier, W. 1988. Immobilized Biocatalysts – An Introduction. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Hedger, J.N.; Hudson, H.J. 1974. Nutritional studies of *Thermomyces lanuginosus* from wheat straw compost. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v.62, p.129-143.

Henssen, A. 1957. Über die Bedeutung der thermophilen Mikroorganismen für die Zersetzung des Stallmistes. *Arch. Mikrobiol.*, v.27, p.63-81

- Hill, A.C.** 1898. Reversible Zymohydrolysis. J. Chem. Soc., v.73, p.634-658.
- Hobson, D.K.; Wales, D.S.** 1998. Green dyes. J. Soc. Dyers Colourist., v.144, p.42-44.
- Jaeger, K.-E.; Reetz, M.T.** 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol., v.16, p.396-403.
- Jain, R. A.** 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. Biomaterials, v.21, p. 2475-2490.
- Johri, B.N.; Alurralde, J.D.; Klein, J.** 1990. Lipase production by free and immobilized protoplasts of *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile* Apinis, Appl. Microbiol. Biotechnol., v.33, p.367-371.
- Johri, B.N.; Satyanarayana, T.; Olsen, J.** 1999. Thermophilic Moulds in Biotechnology, 1st edn., Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Kawaguchi, Y.; Honda, H.; Taniguchi-Morimura, J.; Iwasaki, S.** 1989. The códon CUG is read as serine in na asporogenic Yeast *Candida cylindracea*, Nature, v.341, p.164-166.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; David, J.C.; Stalpers, J.A.** 2001. Dictionary of the Fungi, 9th edn., CAB International, Oxon.
- Kobayashi, S.; Uyama, H.** 2001. Enzymatic Polymerization to Polyesters. Angewandte Chemie, International Edition, v.37, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Larsson, P.-O.; Mosbach, K.; Ohlson, S. 1976. Immobilization of steroid-transforming microorganisms in polyacrylamide. In: Methods in Enzymology, K. Mosbach, 1st ed., vol.44, p.183-190. Academic Press, New York.

Lindt, W. 1886. Mitteilungen über einige neue pathogene Schimmelpilze. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., v.21, p.269-298.

Liu, W.H., Beppu, T. & Arima, K. 1973. Purification and properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. Agricultural & Biological Chemistry, v. 37, p.157-163.

Loo, S. C. J., Ooi, C. P., Boey, Y. C. F. 2004. Radiation effects on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA). Polym. Degrad. Stabil., v.83, p. 259-265.

Lunt, J. 1998. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. Polym. Degrad. Stab., v.59, p.145-152.

Maheshwari, R.; Balasubramanyam, P.V. 1988. Simultaneous utilization of glucose and sucrose by thermophilic fungi. J. Bacteriol., v.170, p.3274-3280.

Maheshwari, R.; Bharadwaj, G.; Mahalingeshwara, K.B. 2000. Microbiol. and Mol. Biol. Reviews, v.64, p.461-488.

Medentsev, A.G.; Akimenko, V.K. 1998. Naphthoquinone metabolites of the fungi. Phytochemistry, v.47, p.935-959.

Miehe, H. 1930. Die Wärmebildung von Reinkulturen im Hinblick auf die Ätiologie der Selbsterhitzung pflanzlicher Stoffe. Arch. Mikrobiol., v.1, p.78-118.

Miller, H.M.; Sullivan, P.A.; Shepherd, M.G. 1974. Intracellular protein breakdown in thermophilic and mesophilic fungi. *Biochem. J.*, v.144, p.209-214.

Mishra, R.S.; Maheshwari, R. 1996. Amylases of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: their purification, properties, action on starch and response to heat. *J. Biosci.*, v.21, p.653-672.

Morrison, R.T.; Boyd, R.N. 1996. Organic Chemistry, 13th edn., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Motta, A. C., Duek, E. A. R. 2006. Síntese, caracterização e degradação in “vitro” do poli(ácido láctico). *Polím.: Ciência e Tecnol.*, v.16 (1), p. 26-32.

Mouchacca, J. 1997. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. *Cryptogamie Mycol.*, v.8, p.19-69.

Noack, K. 1920. Der Betriebstoffwechsel der thermophilen Pilze. *Jahrb. Wiss. Bot.*, v.59, p.593-648.

Oberson, J.; Rawyler, A.; Brändle, R.; Canevascini, G. 1999. Analysis of the heat-shock response displayed by two *Chaetomium* species originating from different thermal environments. *Fungal Genet. Biol.*, v.26, p.178-189.

Ogundero, V.W. 1978. Studies on the nutritional requirements and enzyme activities of thermophilic fungi in Nigeria, Ph.D. Thesis, Univ. of Ibadan, Ibadan, Nigeria, 166p.

Ohlson, S.; Larsson, P.O.; Mosbach, K. 1979 *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 7, p. 103-110.

Okumura, S.; Iwai, M.; Tsujisaka, Y. 1979. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases, *Biochem. Biophys. Acta*, v.575, p.156-165.

Omar, I.C.; Nishio, N.; Nagai, S. 1987. Production of a thermostable lipase by *Hemicella lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. *Agric. Biol. Chem.*, v.51, p.2145-2151.

Packowski, G.I. 1978 In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd edn., vol.3, p.851-869. M. Grayson & D. Eckroth, Wiley, New York.

Palanivelu, P.; Balasubramanyam, P.V.; Maheshwari, R. 1984. Co-introduction of sucrose transport and invertase activities in a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *Arch. Microbiol.*, v.139, p.44-47.

Patterson, J.D.E.; Blain, J.A.; Shaw, C.E.L.; Todd, R.; Bell, G. 1979. Synthesis of glycerides and esters by fungal cell bound enzymes in continuous reactors systems, *Biotechnol. Lett.*, v.1, p.211-216.

Pelczar, M.J.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R. 1996. *Microbiologia Conceitos e Aplicações*, 2nd edn., Makron Books do Brasil, São Paulo.

Poppe, L. Novak, L. 1992. *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*. VCH Publishers, Weinheim.

Prabhu, K.A.; Maheshwari, R. 1999. Biochemical properties of xylanases from a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces*, and their action on plant cell walls. *J. Biosci.*, v.24, p.461-470.

Prasad, A.R.S.; Kurup, C.K.R.; Maheshwari. 1979. Effect on temperature on respiration of a mesophilic and thermophilic fungus. *Plant Physiol.*, v.64, p.347-348.

Rajasekaran, A.K.; Maheshwari, R. 1990. Effect of growth temperature on lipid composition of a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Indian J. Exp. Biol., v.28, p.134-137.

Ramakrishna, S.V.; Prakasham, R.S. 2005. Microbial fermentations with immobilized cells. Biochemical and Environmental Engineering, 1st edn., p.7-500. Hyderabad, India.

Rao, V.B.; Sastri, N.V.S.; Subba Rao, P.V. 1981. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Biochem. J., v.193, p.379-387.

Riddick, J.A. 1986. Organic Solvents, 4th edn., p. 379. Wiley, New York.

Rizzarelli, P.; Puglisi, C.; Montuado, G. 2004. Soil burial and enzymatic degradation of aliphatic co-polyesters. Polym. Degrad. and Stabil., v.85, p. 855-863.

Roberts, S.M., Turner, N.J., Willets, A.J., Turner, M.K. 1995. Introduction to Biocatalysis using Enzymes and Micro-organisms, 1st edn. Cambridge University Press, New York.

Rosenberg, S.L. 1975. Temperature and pH optima for 21 species of thermophilic and thermotolerant fungi. Can. J. Microbiol., v.21, p.1535-1540.

Sarislani, F.S.; Rosazza, J.P.N. 1984. Biocatalysts in natural products chemistry, Enzyme Microb. Technol., v.6, p.242-253.

Schrader, B.; Dippel, B.; Erb, I.; Keller, S.; Lochte, T.; Schulz, H.; Tatsch, E.; Wessel, S. 1999. NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: Results and aspects. *J. Mol. Structure*, v.481, p.21-32.

Scriban, R. 1985. *Biotecnologia*, 1st edn. Editora Manole, São Paulo.

Shepherd, M.G.; Tong, C.C.; Cole, A.L. 1981. Substrate specificity and mode of action of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem. J.*, v.193, p.6-74.

Smith, J.E.; Berry, D.R.; Kristiansen, B. 1980. *Fungal Biotechnology*, 1nd edn., Academic Press Inc, New York.

Soncini, G.J.; Martins-Franchetti, S.M.; Marconato, J.C. 2004. Interação de biofilmes fúngicos com superfícies poliméricas de poliéster-imida (PEI) aplicados sobre fios de cobre. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de São Paulo, Rio Claro, Brasil.

Stevens, M.P. 1990. *Polymer Chemistry – An Introduction*, 2nd edn., Oxford University Press, New York.

Stevenson, K.J.; Gaucher, G.M. 1975. The substrate specificity of thermomycolase, an extracellular serine proteinase from the thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*. *Biochem. J.*, v.151, p.527-542.

Streets, B.W.; Ingle, M.B. 1972. The effect of temperature on spore germination and growth of *Mucor miehei* in submerged culture. *Can. J. Microbiol.*, v.18, p.975-979.

Suckling, C.J. 1990. Enzyme Chemistry: Impact and Applications. 2nd edn. Chapman & Hall, London.

Sykes, P. 1981. A Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry, 5th edn., Longman, London.

Teich, M.; Needham, D.M. 1992. A Documentary History of Biochemistry, p.1770-1940. Leicester University Press, Great Britain.

Tendler, M.D.; Korman, S.; Nishimoto, M. 1967. Effects of temperature and nutrition on macromolecule production by thermophilic *Eumycophyta*. Bull. Torrey Bot. Club, v.94, p.175-181.

Tomaska, M.; Gemeiner P.; Martelin, I.; Handrikova G. 1995. Calcium pectate gel beads for cell entrapment: a study on the stability of *Kluyveromices marxianus* whole-cell lactase entrapped in hardened calcium pectate and alginate gels. Biotechnol. Appl. Biochem, v.21, p. 347-356.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2000. Microbiologia 6th edn. Editora Artmed, Porto Alegre.

Trent, J.D.; Gabrielsen, M.; Jensen, B.; Neuhard, J.; Olsen, J. 1994. Acquired thermotolerance and heat shock proteins in thermophiles from the three phylogenetic domains. J. Bacteriol., v.176, p.6148-6152.

Tsuji, H.; Suzuyoshi, K. 2002. Environmental degradation of biodegradable polyesters 2. Poly(ϵ -caprolactone), poly[(R)-3-hydroxybutyrate], and poly(L-lactide) films in natural dynamic seawater, Polym. Degrad. Stabil., v.75, p. 357-365.

Vulfson, E.N. 1994. In Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application. Cambridge University Press, Great Britain.

Wali, A.S.; Mattoo, A.K.; Modi,V.V. 1978. Stimulation of growth and glucose catabolite enzymes by succinate in some thermophilic fungi. Arch. Microbiol., v.118, p.49-53.

Walsh, P.K.; Malone, D.M. 1995. Cell growth patterns in immobilization matrices. J. Biotechnol. Adv., v.13, p.13-43.

Wright, C.; Kafkewitz, D.; Somberg, E.W. 1983. Eucaryote thermophily: role of lipids in the growth of *Talaromyces thermophilus*. J. Bacteriol., v.156, p.493-497.

Wyss, M.; Brugger, R.; Kronenberger, A.; Rémy, R.; Fimbel, R.; Osterhelt, G.; Lehmann, M.; van Loon, A.P.G.M. 1999. Biochemical characterization of fungal phytases(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): catalytic properties. Appl. Environ. Microbiol., v.65, p.367-373.