

**MIRIAN REGINA DE MORAES**

**CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Fusarium solani*  
PARA APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Krieger

**CURITIBA  
2014**

Dedico este trabalho aos meus pais, Sebastião e Lourdes, e aos meus irmãos, Daniel e Raquel, que se fazem presentes com o todo amor e incentivo, mesmo distantes.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sebastião e Lourdes, por se fazerem presentes mesmo à distância, com cuidado e carinho. Por toda confiança e estímulo depositados sempre em minhas escolhas. Mas, sobretudo, por serem meus exemplos de garra, dedicação e sucesso!

Aos meus irmãos, Raquel e Daniel, por toda a força em mais uma etapa e por serem tão especiais na minha vida. Pelo orgulho de, juntos de nossos pais, formarmos o melhor significado de “família”!

À professora Nadia Krieger, por permitir que eu fizesse parte deste grupo de pesquisa, pela confiança depositada e por todo ensinamento compartilhado.

Aos Professores David Mitchell e Leandro Piovan, pela atenção e valiosas contribuições a este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, professora Maria Luiza Fernandes pelo auxílio no aperfeiçoamento deste trabalho com valiosas contribuições, e professor Marcelo Müller, por contribuir, também, ao longo desta caminhada, compartilhando conhecimentos com solicitude e atenção.

Aos alunos de Iniciação Científica, Thamiris Giacon e Thalita Fraiz, pela oportunidade de ensinar e aprender, e por toda ajuda prestada. Em especial, ao aluno Edmilson Kleinert, pela colaboração direta na realização deste trabalho durante 1 ano, com comprometimento, dedicação e, amizade.

Aos meus amigos do LTEB, Maritza, Aline, Dini, Vanda, Robson, Jonas, Allen, Fernanda, Alessandra, Maura, Wellington, Edgar, Rodrigo, Michele, Glauco, Nicoli, Rafael, Débora, Paulo e Bruno, por tornar esses anos tão especiais. Pela boa-vontade em ajudar e por todas as valiosas discussões que contribuíram muito para este trabalho. Pelas risadas, pela torcida, pelo carinho e cuidado, pelo ombro amigo e por todos os momentos que vocês tornaram únicos. Enfim, pela maravilhosa recordação que tenho ao lembrar de cada um de vocês!

Aos meus amigos de Toledo, Londrina e Curitiba, que não estão por perto, mas se fazem presentes na torcida e nos breves momentos juntos, que valem por muitos! Pela alegria e ânimo compartilhados.

Ao Thiago Estefano Rodrigues, por toda ajuda, confiança e incentivo nesta fase.

À professora Patrícia Dalzoto, que auxiliou nas primeiras tentativas de identificação do fungo, à técnica Carol Kukolj, pela atenção e auxílio na utilização do espectrômetro de massa, e ao pós-doutorando Marco Aurélio pela ajuda em ensaios de purificação.

À Universidade Estadual de Londrina, de onde a cepa utilizada neste trabalho foi isolada, especialmente, à professora Suely Mayumi Obara-Doi, por permitir a continuidade do trabalho com esse fungo no meu mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica, pela oportunidade. Em especial, à professora Sílvia e D. Irene, pela atenção nas solicitações.

Por fim, agradeço a todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e a Deus por possibilitar o encontro com pessoas incríveis nessa caminhada!

*“Temos que continuamente pular de  
penhascos e desenvolver nossas asas  
na queda.”*

*Kurt Vonnegut*

## RESUMO

O isolado fúngico de abacate em decomposição, identificado neste trabalho como *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02, se destacou pelo seu potencial lipolítico em relação a outros fungos isolados desse fruto. No entanto, as propriedades da lipase produzida por fungos do gênero *Fusarium* especialmente em meio orgânico, são pouco conhecidas. Além disso, estudos voltados à imobilização destas lipases praticamente inexistentes. Neste contexto, este trabalho visou caracterizar a lipase livre e imobilizada de *F. solani*, com vistas à aplicação em biocatálise. O extrato bruto enzimático, obtido por fermentação submersa, apresentou a máxima atividade ( $84 \text{ U mL}^{-1}$ ) contra tricaprilina (C8), após 3 dias de incubação no meio com 2% (m/v) de óleo de soja. A análise do extrato bruto por eletroforese SDS-PAGE (12% poliacrilamida), revelou duas bandas proteicas com massas de 33,4 e 63,2 kDa. Em análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF), a banda de 33,4 kDa foi identificada como sendo a lipase de *N. haematococca* (forma sexuada de *Fusarium solani*). Ensaio de imobilização, realizados na razão proteína/suporte de  $10 \text{ mg g}^{-1}$ , resultaram em maior eficiência de imobilização e atividade de hidrólise com o suporte Immobead-150 ( $E_i=86\%$  e  $330 \text{ U g}^{-1}$ ), em relação ao suporte Accurel MP-1000 ( $E_i=15\%$  e  $75 \text{ U g}^{-1}$ ). Em seguida, as propriedades da lipase imobilizada em Immobead-150 (LFS-Imm) foram avaliadas e comparadas com as da lipase livre (LFS). LFS apresentou máxima atividade na faixa entre pH 7,0 a 8,5, o que para LFS-Imm ocorreu em pH 10,0. Enquanto LFS teve sua atividade máxima em  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e perdeu atividade em temperaturas mais elevadas, LFS-Imm mostrou-se mais termotolerante, atingindo atividade máxima entre 40 e  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tanto LFS quanto LFS-Imm apresentaram estabilidade em ampla faixa de pH (4,0 a 9,0), mantendo entre 80 a 100% de atividade, quando incubadas por 2 h. Em pH 10,0, LFS livre perdeu atividade, já LFS-imm apresentou uma ativação de 20%. LFS-Imm apresentou 35% de atividade residual após incubação por 48 h a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , enquanto LFS livre perdeu 50% de atividade após 3 h de incubação na mesma temperatura. LFS-Imm demonstrou ser estável quando incubada por 8 h a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 200 rpm em acetona e DMSO, com 100% e 85% de atividade residual, respectivamente; para os solventes tolueno e *n*-hexano, LFS-Imm apresentou atividades residuais de 157% e 142% respectivamente, nas mesmas condições de incubação. Ensaio para determinação da regioesletividade feitos com LFS e LFS-Imm revelaram que a lipase de *F. solani* CPQBA 515-12 DRM 02 é 1,3 regioespecífica. Na resolução racêmica de *R,S* 1-fenil-1-etanol por transesterificação, LFS-Imm apresentou preferência para o enantiômero *R*, com  $c=14\%$ ,  $ee_p=80\%$  e  $E=10$ , após 24 h. Esta é a primeira vez que uma lipase de *F. solani* é imobilizada e caracterizada com vistas à aplicação em biocatálise. As propriedades de LFS livre e LFS-Imm mostram que esta lipase tem potencial de aplicação em reações de hidrólise e na síntese de ésteres, respectivamente.

**Palavras-chave:** lipases, *Fusarium solani*, *Nectria haematococca*, imobilização, regioespecificidade, enantiosletividade

## ABSTRACT

The fungus isolated from decayed avocado fruit, identified in this work as *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02, showed previously the best lipolytic potential among others isolated fungi from this fruit. However, the properties of the lipases produced by fungi of genus *Fusarium* were unknown, especially in organic media. Moreover, studies concerned to immobilization of these lipases were inexistent. With this background, this work characterized the free (FSL) and immobilized lipase from *F. solani* (FSL-Imm) aiming its application in biocatalysis. The crude enzymatic extract obtained by submerged fermentation showed the highest activity ( $84 \text{ U mL}^{-1}$ ) to tricaprylin (C8), after 3 days of incubation in a culture medium with 2% (m/V) of soybean oil. The analysis of the crude extract by electrophoresis SDS-PAGE (12% polyacrylamide), displayed two protein bands with molecular masses of 33.4 and 63.2 kDa. In the analysis by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF), the band of 33.4 kDa was identified as the lipase of *Nectria haematococca* (sexual form of *F. solani*). Assays of immobilization done at ratio protein/support of  $10 \text{ mg g}^{-1}$  resulted in higher efficiency of immobilization and hydrolytic activity using the support Immobead, compared to Accurel MP-1000 ( $E_i=86\%$  and  $330 \text{ U g}^{-1}$  and  $E_i=15\%$ ,  $75 \text{ U g}^{-1}$ , respectively). The properties of immobilized lipase on Immobead-150 (LFS-Imm) were evaluated and compared to those of the free lipase (FSL). Free FSL presented the highest activity in the pH range between 7.0 and 8.5, whereas FSL-Imm showed its highest activity at pH 10.0. FSL-Imm was thermotolerant, reaching maximum activity between 40 and 50 °C, while free FSL had its maximum activity at 35 °C. Both free FSL and FSL-Imm showed stability in a wide pH range (4.0 – 9.0), keeping their activity between 80 and 100% after 2 h. At pH 10.0, free FSL lost its activity, but FSL-Imm showed an increase of activity by 20%. FSL-Imm kept about 35% of its activity at 40 °C, after 48 h, whereas free FSL remained with only 50% of its initial activity in only 3 h of incubation. In organic solvents, FSL-Imm proved to be stable even in hydrophilic solvents, where it kept 100 and 85% of its activity in acetone and DMSO, respectively, after incubation by 8 h, at 30 °C and 200 rpm. In hydrophobic solvents, the FSL-Imm activity increased to 157 and 142% in toluene and *n*-hexane, respectively, when incubated in the same conditions. Essays to determine the regioselectivity, performed with both FSL and FSL-Imm, revealed that the lipase from *F. solani* CPQBA 515-12 DRM 02 is 1,3 regiospecific. In the racemic resolution of *R,S* 1-phenyl-1-ethanol by transesterification, LFS-Imm showed preference for the *R*-isomer with  $c=14\%$ ,  $ee_p=80\%$  and  $E=10$ , after 24 h. This is the first time that a lipase of *F. solani* is immobilized and characterized focusing on its application in biocatalysis. The properties of free FSL and FSL-Imm showed this lipase can potentially be used in hydrolysis reactions and ester synthesis, respectively.

**Keywords:** lipases, *Fusarium solani*, *Nectria haematococca*, immobilization, regiospecificity, enantioselectivity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGRICEROL CATALISADA POR LIPASES. ....	17
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA LIPASE DE <i>Pseudomonas cepacia</i> (PCL), REPRESENTANDO A ESTRUTURA DE $\alpha/\beta$ HIDROLASES....	18
FIGURA 3 - ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DE <i>Fusarium spp.</i> OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	33
FIGURA 4 - TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÁLCOOL 1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150 .....	51
FIGURA 5 - EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	53
FIGURA 6 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO FUNGO ISOLADO DE ABACATE E IDENTIFICADO COMO <i>Fusarium solani</i> . ....	55
FIGURA 7 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	56
FIGURA 8 - EFEITO DO COMPRIMENTO DA CADEIA DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> .....	58
FIGURA 9 - ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO DE <i>Fusarium solani</i> AO ARMAZENAMENTO.. ....	59
FIGURA 10 - ELETROFORESE SDS-PAGE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO DE <i>Fusarium solani</i> PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	60
FIGURA 11 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA LIPASE DE <i>Nectria Haematococca</i> (FORMA SEXUADA DA ESPÉCIE <i>Fusarium solani</i> ). ....	62
FIGURA 12 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> EM TERMOS DE (A) ATIVIDADE RESIDUAL (%) E (B) CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NO SOBRENADANTE DA SOLUÇÃO OFERECIDA PARA IMOBILIZAÇÃO. ....	64
FIGURA 13 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> LIVRE E IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150.....	67
FIGURA 14 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> LIVRE E IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150. ....	69



FIGURA 15 - ESTABILIDADE ÀO pH DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> LIVRE E IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150 .....	71
FIGURA16 – ESTABILIDADE À TEMPERATURA DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> LIVRE E IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150 ..	74
FIGURA17 – ESTABILIDADE EM SOLVENTES ORGÂNICOS DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> , IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150.....	75
FIGURA 18 - DETERMINAÇÃO DA REGIOESPECIFICIDADE DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> LIVRE E IMOBILIZADA .....	77
FIGURA 19 - DETERMINAÇÃO DA ENANTIOSSELETIVIDADE DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150 .....	79

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DAS CARBOXIL-ÉSTER HIDROLASES: LIPASES, ESTERASES E CUTINASES .....	20
TABELA 2 - APLICAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS NA OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE INTERESSE INDUSTRIAL.....	29
TABELA 3 - ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Fusarium sp.</i> PRODUTORAS DE CARBOXIL-ÉSTER HIDROLASES .....	35
TABELA 4 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS SUPORTES UTILIZADOS PARA ESTUDO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> .....	45
TABELA 5 - PARÂMETROS AVALIADOS NOS ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> .....	65
TABELA 6 - RESOLUÇÃO DE (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO A LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150. .....	80

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- Atf* - Atividade enzimática final
- Ati* - Atividade enzimática inicial
- BDA - Ágar Batata Dextrose
- c - Conversão
- CALB - Lipase B de *Candida antarctica*
- CCD - Cromatografia em camada delgada
- CG - Cromatografia gasosa
- CMC - Concentração Micelar Crítica
- CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (Unicamp, Campinas, SP)
- Ei - Eficiência de imobilização
- E* - Razão enantiomérica
- ee - Excesso enantiomérico
- FES - Fermentação em Estado Sólido
- LFS - Lipase livre de *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02
- LFS-Imm - Lipase de *Fusarium solani* imobilizada em Immobead-150
- LFS-Acc - Lipase de *Fusarium solani* imobilizada em Accurel MP-1000
- log P - Logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água
- R - Retenção de atividade
- RMN - Ressonância Magnética Nuclear
- TAG - Triacilglicerol
- U - Unidades totais de atividade enzimática

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1 LIPASES .....	17
2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DE LIPASES .....	20
2.2.1 Efeito da Temperatura.....	21
2.2.2 Efeito do pH.....	21
2.2.3 Efeito de Solventes Orgânicos .....	23
2.2.4 Efeito da Imobilização .....	24
2.3 APLICAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS .....	27
2.4 <i>Fusarium solani</i> : ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO E DA ESPÉCIE .....	31
2.4.1 Aspectos Gerais .....	31
2.4.2 Aspectos Morfológicos e Taxonômicos.....	32
2.4.3 Fungos <i>Fusarium</i> sp. Isolados de Fontes Naturais Produtores de Carboxil-Éster Hidrolases.....	34
2.4.4 Lipase de <i>Fusarium solani</i> .....	36
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	39
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	40
4.2 MICRO-ORGANISMO .....	40
4.3 PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	41
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Fusarium solani</i> .....	42
4.4.1 Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma.....	42
4.4.2 Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF) .....	43
4.5 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> .....	44
4.5.1 Imobilização por Adsorção em Accurel MP-1000.....	45
4.5.2 Imobilização por Ligação Covalente em Immobead-150.....	46
4.5.3 Cinética de Imobilização.....	46
4.6 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> livre e imobilizada .	47
4.6.1 Efeito do pH na Atividade Enzimática.....	48
4.6.2 Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.....	48

4.6.3 Estabilidade ao pH .....	48
4.6.4 Estabilidade à Temperatura .....	49
4.6.5 Estabilidade em Solventes Orgânicos .....	49
4.6.6 Determinação da Regioespecificidade .....	50
4.6.7 Determinação da Enantiosseletividade .....	50
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	52
4.7.1 Determinação de Proteínas .....	52
4.7.2 Método Titulométrico .....	52
4.7.3 Atividade da esterificação .....	53
4.7.4 Método de Lowry-Tinsley .....	54
4.7.5 Cromatografia em Fase Gasosa em Coluna Quiral .....	54
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
5.1 IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO .....	55
5.2 PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	56
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO de <i>Fusarium solani</i> .....	57
5.3.1 Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma.....	59
5.3.2 Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF) .....	61
5.4 Imobilização dA lipase de <i>Fusarium solani</i> .....	63
5.4.1 Cinética de Imobilização.....	63
5.5 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Fusarium solani</i> LIVRE E IMOBILIZADA.....	67
5.5.1 Efeito do pH na Atividade Enzimática .....	67
5.5.2 Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática .....	68
5.5.3 Estabilidade ao pH.....	70
5.5.4 Estabilidade à Temperatura.....	72
5.5.5 Estabilidade em Solventes Orgânicos .....	74
5.5.6 Determinação da Regioespecificidade.....	77
5.5.7 Determinação da Entantiosseletividade.....	78
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>101</b>
ANEXO 1 – IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO ISOLADO DE ABACATE .....	101

ANEXO 2 – ESPECTROS DE MASSA DAS PROTEÍNAS DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO.....	105
--	-----

## 1. INTRODUÇÃO

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas versáteis, não apenas em relação a sua especificidade e seletividade, mas também, ao meio em que atuam e às reações que catalisam. Como função biológica natural, as lipases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, produzindo ácidos graxos livres, mono- e diglicerídeos, e glicerol. Em meio orgânico, essas enzimas podem catalisar diversas reações importantes como a esterificação, transesterificação e interesterificação.

Do ponto de vista biotecnológico, lipases têm posição de destaque entre as enzimas mais utilizadas em biocatálise, com papel importante na indústria de alimentos, de detergentes, de couro, de papel, na indústria farmacêutica e cosmética. Cerca de 75% de todas as enzimas industrializadas são hidrolases e destas, 90% são produzidas através de processos fermentativos por micro-organismos (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Porém, a baixa estabilidade das enzimas na sua forma livre frente à temperatura, ao pH e a solventes orgânicos restringem sua aplicação (SHARMA; KANWAR, 2014). Por isso, estratégias vêm sendo utilizadas a fim de melhorar as propriedades catalíticas de lipases e viabilizar seu uso na indústria. Nesse aspecto, a imobilização de enzimas além de, em geral, ser uma técnica simples, possibilita o reuso do biocatalisador e pode tornar as enzimas mais estáveis à temperatura e em meio de solventes orgânicos.

Lipases de origem microbiana são abundantes na natureza e as mais utilizadas industrialmente. Porém, apenas 2% dos micro-organismos do mundo são alvos de pesquisas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Na prospecção de novos fungos produtores de lipases, diversas cepas foram isoladas de abacate (*Persea americana Mill.*) em decomposição, tendo uma delas se destacado pelo potencial lipolítico exibido (MORAES, 2012), identificada no presente trabalho como *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02. Espécies do gênero *Fusarium*, especialmente a espécie *F. solani*, são conhecidas pela produção de cutinases, enzimas relacionadas à patogenicidade desses fungos. Devido ao prejuízo causado a diversas culturas de plantas, as cutinases de *F. solani*

foram alvo de intenso estudo, em detrimento da exploração de outras enzimas com potencial de aplicação biotecnológica, como as lipases.

Estudos envolvendo o potencial de lipases do gênero *Fusarium*, tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico são limitados à produção e breve caracterização da enzima, sendo praticamente inexistentes relatos de imobilização de lipases deste gênero. Por isso, o potencial demonstrado pela lipase de *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02 somado à escassez de informações de lipases deste gênero, motivaram o estudo desta enzima. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a lipase de *Fusarium solani* na sua forma livre e imobilizada, dada a possibilidade de se revelar uma lipase com propriedades diferenciadas, para aplicação em biocatálise.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LIPASES

Lipases (E.C. 3.1.1.3) têm como função natural catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER *et al.*, 1994) (FIGURA 1). Em meios orgânicos ou aquo-restritos, as lipases podem catalisar diversas reações, sendo as principais as reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (BORNSCHEUER *et al.*, 2002).

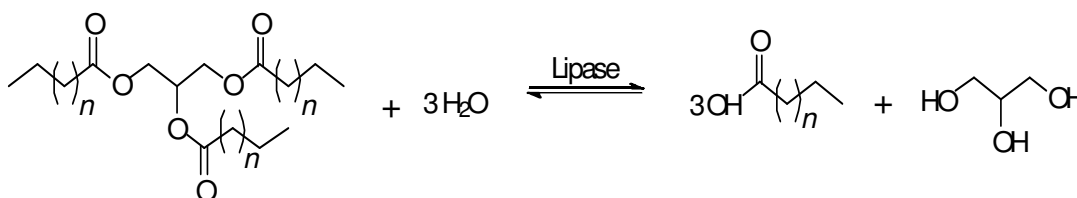


FIGURA 1 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGRICEROL CATALISADA POR LIPASES.

Em relação à estrutura tridimensional, lipases possuem dobramento característico na conformação  $\alpha/\beta$  hidrolase (FIGURA 2) e seu sítio catalítico é comumente composto pela tríade catalítica Ser, His, Asp/Glu. (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Como já descrito por diversos autores, a massa molecular das lipases situa-se na faixa de 30 a 40 kDa (ROMDHANE *et al.*, 2012; SHANGGUAN *et al.*, 2012; JALLOULI *et al.*, 2012; MARINI *et al.*, 2011; DHEEMAN; HENEHAN; FRÍAS, 2011; HIOL *et al.*, 2000; NAGAO *et al.*, 1996). Mas há exceções, como as três isoformas das lipases de *Candida albicans*, com massas de 60, 62 e 64 kDa (BENJAMIN; PANDEY, 2001).

Para as lipases, a presença da interface lipídio/água favorece fortemente a atividade enzimática, uma vez que elas agem na interface de emulsões e não hidrolisam substratos abaixo da concentração micelar crítica (CMC). Este fenômeno, conhecido como “ativação interfacial”, é explicado, em alguma lipases, devido à existência de uma tampa hidrofóbica (*lid*) na estrutura

que cobre o sítio catalítico. A interação dos resíduos hidrofóbicos com o substrato lipídico promove um rearranjo, que se traduz na abertura da *lid*, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999). Essa hipótese é sustentada pelas lipases já cristalizadas em sua forma aberta ou fechada (ADLECREUTZ, 2013). Porém, também se observou que a presença da *lid* não está necessariamente relacionada com a ativação interfacial de lipases. Algumas lipases, como as de *Burkholderia glumae*, *Candida antarctica* B e *Pseudomonas aeruginosa*, não apresentam o efeito da ativação interfacial, apesar de conterem a *lid*, enquanto que outras lipases, como a de *Staphylococcus hyicus*, mostram ativação interfacial somente com alguns substratos (JAEGER; REETZ, 1998; VERGER, 1997).



FIGURA 2 - ESTRUTURA DA LIPASE DE *Pseudomonas cepacia* (PCL), REPRESENTANDO A ESTRUTURA DE  $\alpha/\beta$  HIDROLASES.

A sequência N e C terminal e a tríade catalítica estão rotuladas. O íon  $\text{Ca}^{2+}$  está representado pela esfera azul escuro. PCL é composta por seis folhas- $\beta$  e seis  $\alpha$ -hélices. FONTE: KIM *et al.* (1996).

Assim, embora o fenômeno de ativação interfacial seja unicamente notado em lipases, e não em esterases, essa característica, juntamente à presença da *lid*, não são, isoladamente, critérios adequados para se classificar uma enzima como lipase. A definição mais aceita se baseia no tamanho da

cadeia graxa do triacilglicerol: as “lipases verdadeiras” atuam, principalmente, em triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia longa, enquanto as esterases (E.C. 3.1.1.1) catalisam a hidrólise de triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia curta (menor do que C6), liberando ácidos graxos de baixa massa (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Outras enzimas com função semelhante a das lipases produzidas pelo gênero *Fusarium* são as esterases e as cutinases (TABELA 1). Cutinases (E.C. 3.1.1.74) atuam na hidrólise de cutina, um componente estrutural de cutícula de plantas, composto de polímero de hidróxi-ácidos graxos, geralmente com C16 ou C18 e até três grupos hidroxil, de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB). Cutinases são as menores representantes das  $\alpha/\beta$ -hidrolases, apresentando apenas 197 resíduos de aminoácidos, um único domínio e massa molecular de aproximadamente 22 kDa (LONGHI; CAMBILLAU, 1999; SOLIDAY *et al.*, 1984). Já as esterases foram descritas com massa de 34 kDa a 52 kDa (LIU *et al.*, 2013; RANJITHA; KARTHY; MOHANKUMAR, 2009; KAISER *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 1986).

Tanto lipases quanto cutinases e esterases possuem a característica de regioespecificidade e enantiosseletividade (KÖLLER; KOLATTUKUDY, 1982; LONGHI; CAMBILLAU, 1999). Por outro lado, as cutinases são altamente específicas para a hidrólise de triacilgliceróis com cadeia em torno de 5 carbonos, diferentemente das lipases que atuam em triacilgliceróis de cadeia longa (CARVALHO; AIRES-BARROS; CABRAL, 1998).

A ausência de uma *lid*, tanto para cutinases quanto para esterases, explica, provavelmente, porque estas enzimas não são ativadas pela presença de interface, podendo, assim, atuar abaixo da concentração micelar crítica do substrato (CARVALHO *et al.*, 1998; LONGHI; CAMBILLAU, 1999). Para facilitar a distinção entre estas carboxil-éster hidrolases, suas principais características foram resumidas na TABELA 1.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DAS CARBOXIL-ÉSTER HIDROLASES: LIPASES, ESTERASES E CUTINASES

Lipases	Esterases	Cutinases
---------	-----------	-----------

<i>Enzyme Commission (E.C)</i>	3.1.1.3	3.1.1.1	3.1.1.74
Estrutura $\alpha/\beta$	Presente	Presente	Presente
Tríade catalítica: Ser, Asp e His	Sim	Sim	Sim
Função catalítica <sup>1</sup>	hidrólise de ligações éster em triacilgliceróis	hidrólise de ligações éster em ésteres carboxílicos	hidrólise de ligações éster em hidroxí-ácidos graxos (cutina)
Massa molecular	~30-40 kDa	~34-52 kDa	~22 kDa
Ativação interfacial	Geralmente presente	Ausente	Ausente
Comprimento da cadeia do substrato	Longa (>10 C)	Pequena (<6 C)	Pequena (<6 C)
Regio e enantio-seletividade	Sim	Sim	Sim

<sup>1</sup> Segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB).

## 2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DE LIPASES

Embora versáteis e tolerantes a diferentes condições reacionais, enzimas, e assim também as lipases, são sensíveis ao efeito da temperatura, do pH e de solventes orgânicos, assim como ao efeito da imobilização, fatores que podem alterar o seu desempenho positiva ou negativamente. Estes parâmetros são importantes para o direcionamento de lipases em reações de biocatálise, uma vez que influenciam diretamente a atividade e estabilidade mostrada por estas enzimas.

### 2.2.1 Efeito da Temperatura

A temperatura afeta consideravelmente a velocidade de reação catalisada por enzimas. Pelo mecanismo químico, o aumento da temperatura gera um aumento da energia cinética dos reagentes (substratos) e, assim, maior transferência de massa. Porém, a desnaturação da enzima também é decorrente do efeito da temperatura, cujo aumento eleva a velocidade de desnaturação térmica (AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996).

Desta forma, é importante determinar a temperatura que favoreça a velocidade da reação, porém, sem acarretar grande desnaturação da enzima. A temperatura ideal para a atividade de uma enzima depende das características de atividade e estabilidade de cada enzima, do tempo de reação, do meio (aquoso ou orgânico) e da sua forma (livre ou imobilizada). Alguns estudos indicam que a estabilidade térmica de lipases imobilizadas é maior do que de lipases livres porque a ligação com o suporte evita a alteração da conformação ativa da enzima em altas temperaturas (KIM *et al.*, 2006). Yigitoglu e Temoçin (2010) verificaram o efeito da temperatura na atividade da lipase de *Candida rugosa* na forma livre e imobilizada em fibras de polietileno e verificaram que, após 180 min a 50 °C, a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade (54% de atividade residual) do que a enzima livre (30% da atividade residual). O efeito da temperatura na estabilidade térmica de lipases imobilizadas foi relatado como uma das vantagens do processo de imobilização por diversos autores (MADALOZZO *et al.*, 2013; KARRA-CHAABOUNI *et al.*, 2008, GHAMGUI *et al.*, 2007).

### 2.2.2 Efeito do pH

O estado de protonação ou ionização de uma enzima é vital para sua atividade catalítica, não apenas em meios aquosos, mas também em solventes orgânicos. Em meio aquoso, o pH deve ser controlado de forma a manter a lipase na condição de maior atividade e estabilidade. No entanto, em sistema não-aquoso, o pH do meio e o da camada essencial de água em torno das moléculas de enzima (chamada de “camada de solvatação”) não podem ser medidos. Embora o controle direto desse parâmetro em meios não-aquosos durante a reação não seja possível, enzimas, ainda assim, apresentam efeitos relacionados ao seu estado inicial de ionização, ou seja, aquele que adquiriram antes de ser adicionadas ao meio de solventes orgânicos (ADLERCREUTZ, 2013).

Zaks e Klibanov (1985) introduziram pela primeira vez o conceito de "memória do pH" em solventes orgânicos. Esses autores dissolveram lipases de várias origens (animal, fúngica e de levedura) em tampões com diferentes valores de pH e liofilizaram esta solução. Eles notaram uma correlação entre a atividade das lipases, utilizadas para catalisar a hidrólise de tributirina em solventes orgânicos, e os valores de pH dos tampões onde as enzimas haviam sido diluídas. Mais recentemente, pesquisadores também relatam que o valor do pH da solução aquosa utilizada para a preparação de enzima (imobilização, por exemplo) é suficiente para mantê-la em um estado de protonação ativo quando adicionado em meio orgânico (ADLERCREUTZ, 2013; REN *et al.*, 2008; MANOHAR; DIVAKAR, 2005).

Há também que se considerar que os tampões utilizados em meios aquosos são insolúveis na maioria dos solventes orgânicos, havendo a necessidade de outros métodos para controlar o estado de ionização da enzima nestes meios de reação. Quando os íons não podem circular livremente no meio, os contra-íons têm influência sobre a protonação dos grupos ionizáveis da enzima. Equilíbrios importantes ocorrem (1) pela troca de íons de hidrogênio e cátions, como o íon de sódio, com grupos ácidos da enzima e (2) pela transferência de ambos os íons de hidrogênio e ânions, como cloreto, para grupos de base de enzima (ADLERCREUTZ, 2013).

O ácido trifenilacético e o seu sal de sódio é um exemplo típico de par que controla a troca de íons de hidrogênio e cátions. Este tampão é principalmente solúvel em solventes orgânicos relativamente polares, como

pentanona e acetonitrila. Além disso, uma grande variedade de tampões de uso em bioquímica, tais como MOPS, TES, HEPES, HEPPSO, TAPS e AMPSO têm sido utilizados em combinação com os seus sais de sódio ou de potássio. A desvantagem do uso de tampões solúveis em meio orgânico para o controle do estado de ionização da enzima é a etapa de purificação, onde o tampão precisa ser removido (ADLERCREUTZ, 2008).

### 2.2.3 Efeito de Solventes Orgânicos

A importância do uso de solventes orgânicos no meio de reação está relacionada à maior solubilidade dos substratos hidrofóbicos e, no caso de reações de hidrólise, ao deslocamento do equilíbrio no sentido da síntese. Além disso, as reações realizadas em solventes orgânicos apresentam como vantagens a diminuição do número de reações indesejáveis como, por exemplo, a hidrólise dos produtos, a simplificação dos procedimentos de recuperação do produto e do biocatalisador, a diminuição do risco de contaminação microbiana e, dependendo do solvente e da enzima, o aumento da estabilidade da enzima (KRIEGER *et al.*, 2004).

Contudo, a atividade exibida pelas enzimas livres (não imobilizadas) em nesses meios é significativamente menor do que em água, principalmente devido à agregação e desnaturação da enzima (ADLERCREUTZ, 2013; KLIBANOV, 1997). Solventes hidrofílicos ( $-2,5 < \log P < 0$ ) podem desnaturar enzimas pois, devido à maior interação com a camada de água em torno da enzima, provocam uma drástica distorção na conformação da molécula, levando a sua inativação. Por isso, lipases em geral apresentam menor estabilidade em solventes como éter e acetona, do que em solventes hidrofóbicos ( $2 < \log P < 4$ ), como os alcanos ou haloalcanos (KRIEGER *et al.*, 2004; LAANE *et al.*, 1987; ZAKS; KLIBANOV, 1985). É importante salientar, que a água participa direta ou indiretamente de todas as interações não-covalentes da enzima, mantendo sua conformação nativa ou cataliticamente ativa. Se removida, a conformação pode sofrer uma distorção drástica e inativar a enzima. No entanto, enquanto esta água está localizada sobre

moléculas de enzima, o restante de água pode provavelmente ser substituído por um solvente orgânico, sem afetar adversamente a atividade da enzima (ZAKS; KLIBANOV, 1985).

Outra hipótese para a perda de atividade de lipases gerada pelo contato com alguns solventes como o metanol e o etanol fundamenta-se na atuação do solvente como inibidor competitivo da reação catalisada pela lipase, o que poderia levar a mudanças na cinética de reação e na especificidade ao substrato (ADLERCREUTZ, 2013; OGINO; ISHIKAWA, 2001).

A baixa estabilidade de enzimas na sua forma livre frente à temperatura, ao pH e a solventes orgânicos restringe seu uso (SHARMA; KANWAR, 2014). Por isso, diversas estratégias vêm sendo usadas para melhorar o desempenho de lipases e abrangem tanto a modificação estrutural da enzima, com técnicas de engenharia de proteínas e evolução dirigida, por exemplo, quanto a estabilização física através da imobilização (KNEZEVIC *et al.*, 2006; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

#### 2.2.4 Efeito da Imobilização

Enzimas Imobilizadas são aquelas que estão confinadas ou localizadas sobre um suporte apropriado, tornando-as insolúveis em qualquer meio, mas permitindo que a enzima entre em contato com o substrato, catalisando reações. Enzimas imobilizadas podem ser reutilizadas minimizando custos e tornando sua aplicação mais viável (GIRELLI; MATTEI, 2005; PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000). Além disso, a imobilização confere outras vantagens às enzimas como, por exemplo, o impedimento da formação de agregados em meio orgânico, maior facilidade de recuperação dos produtos e do biocatalisador, melhorando a dispersão das moléculas no meio reacional, bem como seu armazenamento, transporte e manuseio e propiciando a utilização da enzima imobilizada em processos contínuos (KNEZEVIC *et al.*, 2006; GUISÁN *et al.*, 2001; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Essa técnica vem sendo utilizada para melhorar o desempenho de lipases frente ao efeito dos fatores já citados (temperatura, pH e solventes orgânicos). No entanto, também pode causar a



desativação da enzima ou, como em muitos casos de catálise heterogênea, a diminuição na sua atividade específica, reflexo da limitação na transferência de massa (ADLERCREUTZ, 2013).

As propriedades das enzimas imobilizadas são regidas pelas características da enzima e do suporte. A interação específica entre molécula e o suporte gera uma enzima com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas distintas daquelas apresentadas pela enzima livre (TISCHER; WEDEKIND, 1999). Há várias técnicas empregadas na imobilização, mas a maioria dos estudos ainda utiliza métodos tradicionais, como a imobilização por adsorção, por ligação covalente e ligação cruzada, por entrelaçamento entre polímeros e por encapsulação (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002). Outras técnicas de imobilização de lipases também vêm sendo empregadas, como a imobilização em nanopartículas e em suportes ativados, cuja função é promover a ligação covalente com a enzima (GE *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2003; ANDREESCU; BUCUR; MARTY, 2006).

O método de adsorção por interação hidrofóbica é um dos mais utilizados para imobilização de lipases, pois é simples, de baixo custo e não gera alteração química na enzima (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002). No caso específico de lipases, a adsorção envolve áreas hidrofóbicas em torno do sítio ativo da enzima, particularmente a *lid*, estabilizando a enzima com a sua conformação aberta. Isto permite obter preparações imobilizadas altamente ativas, principalmente contra substratos hidrofóbicos (MATEO *et al.*, 2007). Algumas lipases não apresentam *lid*, mas contêm um número razoável de aminoácidos hidrofóbicos nas proximidades do sítio ativo (ALMEIDA *et al.*, 2006), que podem interagir com o suporte, permitindo a formação de um ambiente que envolve a superfície do sítio ativo e o substrato, melhorando a atividade catalítica da enzima. A desvantagem deste método está relacionada principalmente à lixiviação da enzima ligada ao suporte em ambientes aquosos (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002). Uma ampla variedade de suportes hidrofóbicos tem sido utilizada para imobilização, entre eles os polipropilenos altamente porosos, como Accurel EP-100 e Accurel MP-1000 (MADALOZZO *et al.*, 2013; BARON *et al.*, 2011; SABBANI *et al.*; 2006). O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte dependem de vários parâmetros, como o tamanho da proteína

a ser adsorvida, a área superficial do adsorvente e, principalmente, a porosidade e tamanho dos poros (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Suportes porosos são vantajosos porque a enzima é adsorvida no interior dos poros, desde que seus diâmetros possam acomodar a enzima. A eficiência de imobilização, isto é, a quantidade de proteína adsorvida no suporte, depende da concentração inicial da solução de enzima oferecida à imobilização, sendo atingido um limite de saturação, que depende da área superficial do suporte, do tamanho da proteína e dos contaminantes do extrato (SOARES *et al.* 2012).

Já a imobilização de enzimas por ligação covalente ocorre entre grupos reativos do suporte e alguns grupos funcionais de resíduos de aminoácidos na superfície da enzima (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002). Esse método leva à formação de uma ligação forte entre enzima-suporte, o que evita a lixiviação da enzima em meios aquosos, podendo ser utilizada tanto em meios de reação aquosos, como em orgânicos. Além disso, a ligação covalente confere maior estabilidade térmica à lipase (KNEZEVIC *et al.*, 2006; OGINO; ISHIKAWA, 2001; MATEO *et al.*, 2000). Porém, além do custo mais elevado suporte, a ligação covalente pode afetar a conformação e a atividade da enzima, gerando derivados imobilizados com baixa atividade (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; MATEO *et al.*, 2007; FORESTI; FERREIRA, 2005).

Uma variedade de suportes tem sido utilizada para imobilização por ligação covalente, e inclui materiais inorgânicos (MORENO; SINISTERRA, 1995), naturais (CHIOU; WU, 2004) e sintéticos (IVANOV; SCHNEIDER, 1997; BRAUN; KLEIN, 1996; CARTA; GAINER; BENTON, 1991). O suporte sintético Immobead-150, anteriormente vendido como Eupergit®, é utilizado para a imobilização de enzimas em escala industrial, devido a sua disponibilidade no mercado mundial, resistência a tensões mecânicas e químicas, e adaptação a uma variedade de processos em reatores enzimáticos (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000).

O pH da solução enzimática pode interferir diferentemente na imobilização tanto por adsorção e quanto por ligação covalente. Em suportes hidrofóbicos, pH da solução que propicia valores máximos de adsorção está próximo ao ponto isoelétrico da proteína. Isto ocorre pelo fato de que, no valor

de pH correspondente ao ponto isoelétrico, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada (VINU; MIYAHARA; ARIGA, 2005; GONÇALVES, 1999).

Já no caso do Immobead-150, o pH da solução enzimática é um dos fatores que determinam o nível de interação entre a enzima e o suporte, podendo esta ligação ocorrer em apenas um ponto da enzima, ou ser, multipontual. A imobilização em Immobead-150 ocorre por ligação covalente, os grupos oxiranos do suporte sofrem ataque nucleofílico de diferentes grupos da superfície da enzima, como amida, tiol e hidroxila, levando a interações entre a enzima e o suporte. Os resíduos de lisina, por exemplo, apresentam um pKa de 10,5 e dificilmente serão reativos em pH neutro, o que impedindo a ligação da enzima em vários pontos, ou seja, a “imobilização multipontual” Meios neutros e ácidos propiciam a ligação da enzima ao suporte em apenas um ponto, enquanto que, meios alcalinos favorecem a ligação multipontual. Imobilização multipontual apresenta a vantagem de aumentar a estabilidade da enzima, porém, pode levar a uma diminuição da atividade (MATEO *et al.*, 2007).

### 2.3 APLICAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS

Hidrolases são os biocatalisadores mais empregados na indústria, dentre as quais as lipases são conhecidas por serem versáteis e bem adaptadas às condições utilizadas na indústria (TUFVESSON *et al.*, 2011). Embora lipases possam ser obtidas de diversas fontes (microbiana, animal ou vegetal), aquelas que apresentam maior vantagem são as lipases microbianas, sendo estas também as mais usadas para fins biotecnológicos (LIN; WANG; SUNG, 2006; TREICHEL *et al.*, 2010). As espécies mais utilizadas pertencem aos gêneros *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.* (SOARES *et al.* 2012).

Lipases fúngicas são bastante apreciadas devido a sua maior estabilidade, especificidade ao substrato e aos custos de produção serem mais baixos quando comparados com outras fontes, já que fungos, geralmente,

produzem lipases extracelulares, o que facilita o seu isolamento dos meios de cultivo. Além das aplicações apresentadas na TABELA 2, lipases são utilizadas em formulações de detergentes, devido ao seu potencial em hidrolisar gorduras de várias composições, a sua tolerância em relação às condições de lavagem severas (pH 10-11 e temperatura 30-60 °C) e à resistência a surfactantes e a proteases, que são ingredientes importantes na formulação de detergentes (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Na indústria de panificação, a adição de lipases pode produzir pequenas quantidades de ácidos graxos livres de cadeia curta, que influenciam o aroma do pão (GALAL; JOHNSON; VARRIANO-MARSTON, 1978). A produção de papel também utiliza lipases no seu processo de produção. Nestas indústrias, lipases são utilizadas para remoção do “*pitch*”, como são chamados os componentes hidrofóbicos da madeira, principalmente triglicerídeos e ceras, que causam problemas na fabricação do papel (VERMA; THAKUR; BHATT, 2012).

Um campo novo e promissor é o uso de lipases microbianas em biossensores. Esses instrumentos são capazes de aliar a especificidade de um biocatalisador para um analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor capaz de converter o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito (MELO, 2012). Nesta área sensores contendo lipases têm sido aplicados no diagnóstico preciso de pacientes com problemas cardiovasculares. A lipase de *Candida rugosa*, por apresentar alta atividade específica e ser regioespecífica, já foi utilizada com essa finalidade (VERMA, THAKUR, BHATT, 2012).

TABELA 2 - APLICAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS NA OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Indústria	Produto	Reação para obtenção	Micro-organismo produtor	Forma aplicada	Referência
Alimentícia	Aromas	Esterificação	<i>Candida antarctica B</i>	Imobilizada	Rodrigues <i>et al.</i> (2008)
		Transesterificação	<i>Rhizopus oryzae</i>	Imobilizada	Garlapati e Banerjee (2013)
		Transesterificação	<i>Rhizomucor miehei</i>	Livre	Sun <i>et al.</i> (2012)
	Éster de vitamina C (anti-oxidante)	Transesterificação	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Imobilizada	Watanabe <i>et al.</i> (2003)
Cosmética Alimentícia e Farmacêutica	Surfactantes	Esterificação de álcoois de açúcar	<i>Candida antarctica B</i>	Imobilizada	Cao, Bornscheuer e Schmid (1999)
			<i>Mucor miehei</i>	Imobilizada	Ward, Fang e Li (1997)
			<i>Candida antarctica</i>	Imobilizada	
Biodiesel	Ácidos graxos livres (óleo de soja)	Hidrólise	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Livre	Cavalcanti-Oliveira <i>et al.</i> (2010)
	Ácidos graxos livres (óleo de fritura)		<i>Candida rugosa</i>	Livre	Talukder <i>et al.</i> (2010)
	Biodiesel	Transesterificação	<i>Rhizopus oryzae</i>	Livre	Kawakami <i>et al.</i> (2009)
			<i>Rhizopus oryzae</i>	Imobilizada (célula)	Hama <i>et al.</i> (2007)

TABELA 2 - APLICAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS NA OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE INTERESSE INDUSTRIAL  
(continuação)

Indústria	Produto	Reação para obtenção	Micro-organismo produtor	Forma aplicada	Referência
Biodiesel	Biodiesel	Transesterificação	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Sólido fermentado	Salum <i>et al.</i> (2010)
		Esterificação		Imobilizada	Baron <i>et al.</i> (2014)
Farmacêutica e Química	Compostos enantiomericamente puros	Trasesterificação enantiosseletiva	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Imobilizada	Soares <i>et al.</i> (2013)
			<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Imobilizada	Brem <i>et al.</i> (2012)
			<i>Candida antarctica B</i>	Imobilizada	Moure <i>et al.</i> (2013) Andrade e Barcellos (2009)
Nutracêutica	Modificação química de manteiga	Interesterificação	<i>Mucor javanicus</i>	Imobilizada	Balcão <i>et al.</i> (1998)
	Margarina	Interesterificação	<i>Rhizopus oryzae</i>	Sólido Fermentado	Rasera <i>et al.</i> (2012)
	Ácidos graxos livres (óleo de babassu)	Hidrólise	<i>Mucor miehei</i>	Imobilizada	Merçon <i>et al.</i> (1997)
	Ácidos graxos livres (óleo de girassol)		<i>Rhizopus sp.</i>	Imobilizada	Rucka e Turkiewicz (1989)
Ácidos graxos livres (óleo de palma e de oliva)	<i>Mucor miehei</i>		Imobilizada	Shamel <i>et al.</i> (2007)	

Lipases também se destacam no tratamento de efluentes, podendo ser aplicadas tanto *ex situ* quanto *in situ* (SILVA *et al.* 2013, VERMA, THAKUR, BHATT, 2012; MENDES; PEREIRA; CASTRO, 2006). Alberton *et al.* (2010) aplicaram a lipase de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM presente no sólido fermentado (sólido resultante do processo de FES) no tratamento de efluente com alta concentração de gordura ( $1300 \text{ mg L}^{-1}$ ), tendo relatado a redução deste teor para  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , após 72 h. Esse mesmo sólido fermentado foi empregado com sucesso para tratamento de efluente de indústria de processamento de carne em biorreator de leito contínuo por ZAWADZKI *et al.* (2013).

## 2.4 *Fusarium solani*: ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO E DA ESPÉCIE

### 2.4.1 Aspectos Gerais

O fungo *Fusarium solani* é membro de um grupo de mais de 40 espécies conhecido como Complexo *Fusarium solani* (FSSC - *Fusarium solani species complex*). Fungos que compõem esse grupo apresentam características biológicas semelhantes, entre elas a capacidade de infecção de plantas e de pacientes imunodeprimidos (ZHANG *et al.*, 2006). Espécies de *Fusarium* podem se desenvolver sobre uma variedade de substratos, tolerando diversas condições ambientais e apresentam níveis elevados de diversidade genética. Porém, as origens desta diversidade e os mecanismos que a mantêm ainda não são bem compreendidos (KERÉNYI *et al.*, 2004).

Na década de 1990, pesquisadores demonstraram que a capacidade de infecção das plantas por fungos estava diretamente relacionada à produção de cutinases (SOLIDAY *et al.*, 1984). Por isso, fungos do gênero *Fusarium*, conhecidos pela produção dessas enzimas, foram primeiramente estudados em relação a sua capacidade fitopatogênica (ZHANG *et al.*, 2006). Porém, além da produção de produção de cutinases, estudos indicam que membros do complexo FSSC podem produzir outras carboxil-éster hidrolases, como

esterases e lipases (TABELA 3). Além disso, estes fungos já foram relatados como sendo capazes de degradar hidrocarbonetos, lignina, cianeto e pesticidas (ABE *et al.*, 2010; SIDDIQUE *et al.*, 2003; DUMESTRE *et al.*, 1997; REGALADO *et al.*, 1997).

#### 2.4.2 Aspectos Morfológicos e Taxonômicos

O gênero *Fusarium* foi primeiramente descrito por Link (1809) como sendo uma espécie com esporos fusiformes crescidos no estroma de plantas. As características morfológicas comuns ao gênero *Fusarium* são a presença de macroconídio multicelular e curvado (com 3 ou 4 septos), microconídio, longos e abundantes clamidósporos, conforme ilustrado na FIGURA 3. Além disso, na natureza, os fitopatógenos podem apresentar variação nas características morfológicas dentro de uma mesma espécie, sendo isto, até recentemente, motivo de investigação (CHANDRAN; KUMAR, 2012).

A tradicional taxonomia de fungos, baseada principalmente nas características morfológicas dos micro-organismos, não foi eficaz na diferenciação de espécies de *Fusarium*, devido à ausência de características morfológicas claras para diferenciar essas espécies, uma vez que fungos do gênero *Fusarium* podem se reproduzir tanto de forma sexuada, quanto assexuada. Fungos cuja reprodução é assexuada são conhecidos pela ausência de estrutura reprodutiva ou “anamórficos”, produzindo apenas mitosporos (esporos assexuais) ou nenhum esporo. Já aqueles que desenvolvem estruturas sexuais, como meiosporos, são denominados “teleomórficos”, porém são raros (TAYLOR; JACOBSON; FISHER, 1999).

Devido à existência de duas fases reprodutivas para uma mesma espécie, fungos com esta características foram inicialmente identificados com nomes científicos distintos, um para a forma anamórfica e outro para teleomórfica. Além do conceito morfológico e biológico de espécie, o conceito filogenético de espécie (relacionado à diferença nucleotídica entre as linhagens monofiléticas) passou a ser determinante na taxonomia de espécies como as do gênero *Fusarium* (CAI *et al.*, 2011). O maior conhecimento do mecanismo



de reprodução desses fungos e o uso de técnicas mais avançadas, como as ferramentas de biologia molecular, também contribuíram na identificação mais precisa desses micro-organismos (QUERALES, 2010).

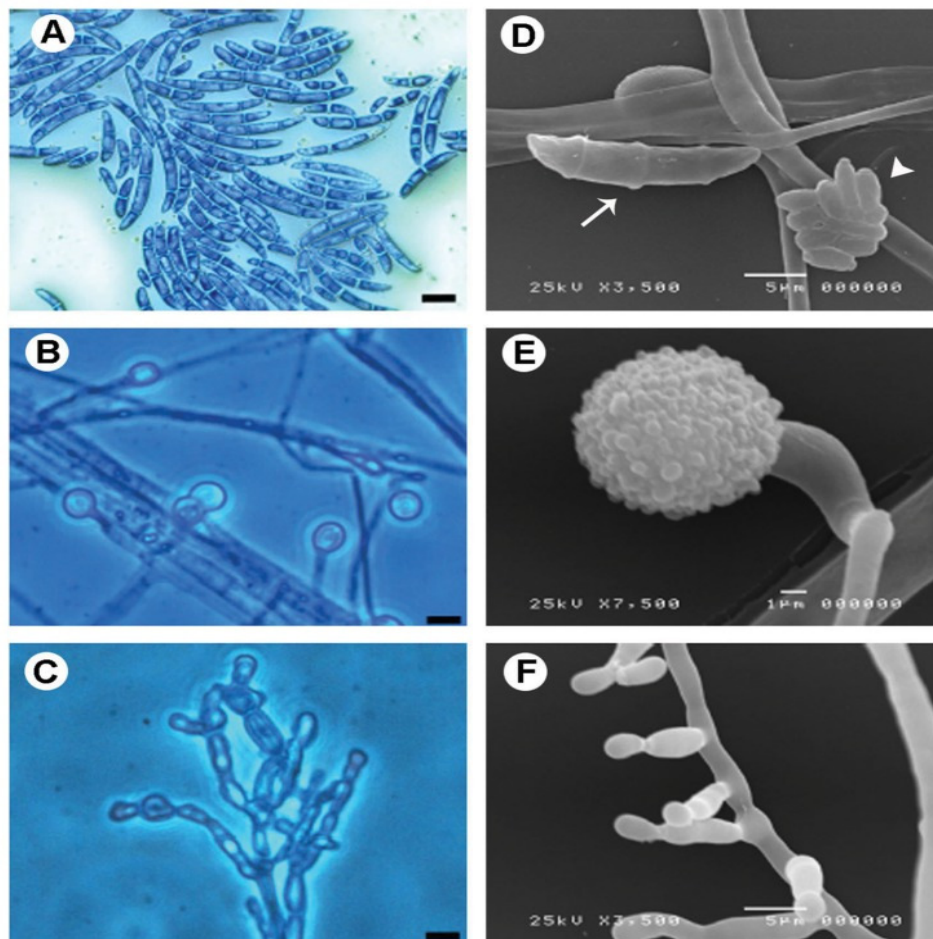


FIGURA 3 - ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DE *Fusarium* spp. OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA.

Estruturas do Complexo de Espécies *F. solani*: clamidósporo (E), fiáides (C), microconídio (D-seta) e macroconídio (D-flexa). Estruturas do Complexo de Espécies *F. oxysporum*: clamidósporo (B), fiáides (F) e macroconídio (A). Escala: 20 μm (A-C), 5 μm (D e F) e 1 μm (E). FONTE: ISHIDA *et al.* (2012).

O Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB) – documento que estabelece as regras de nomenclatura científica de algas, fungos e plantas – previa, antigamente, que todo fungo com morfologia anamórfica e teleomórfica fosse denotado pela sua forma teleomórfica. No entanto, atualização de janeiro de 2013, no artigo 59 do Código, restitui que todos os nomes de fungos legítimos são tratados igualmente, para efeitos de

estabelecimento de prioridade, independentemente da fase do ciclo de vida. Dessa forma, este trabalho poderá conter as denominações *Fusarium solani* (ou *Nectria haematococca*, forma teleomórfica), para se referir a esta espécie.

#### 2.4.3 Fungos *Fusarium* sp. Isolados de Fontes Naturais Produtores de Carboxil-Éster Hidrolases

Fungos *Fusarium* sp. são abundantes na natureza e encontrados em diversos habitats. A espécie *Fusarium solani* é uma delas, comumente isolada de solo e de plantas em decomposição, onde também atua como saprófito (COLEMAN *et al.*, 2009). Fungos desse gênero foram inicialmente explorados em relação à produção de cutinases relacionadas a sua patogenicidade e, conseqüentemente, ao controle desses micro-organismos (HAWTHORNE; REES-GEORGE; CROWHURST, 2001; HARTHORNE; BALL; REES-GEORGE, 1994). Recentemente, pesquisadores têm notado o potencial biotecnológico destas espécies na produção de outras carboxil-éster hidrolases, como as lipases (GULLATI *et al.*, 2005; MACEDO; PIO, 2005; CAMARGO-DE-MORAIS *et al.*, 2003; TOPAKAS *et al.*, 2003; STAMATIS *et al.*, 1998; SHIMADA *et al.*, 1993). Na TABELA 3, estão apresentadas diversas espécies do gênero *Fusarium* produtoras de carboxil-éster hidrolases.

Lipases, esterases e cutinases de *Fusarium* sp. já foram relatadas em fungos isolados de resíduos orgânicos, de solo, de especiarias e até de insetos, onde ocasionalmente são encontrados em associações não-patogênicas. Neste trabalho, Scully *et al.* (2012) realizaram análise das proteínas expressas pelo fungo *F. solani* ATCC MYA 4552, encontrado em intestino de besouro. Embora o maior interesse estivesse ligado a proteínas envolvidas na degradação de celulose e lignina, diversas proteínas com função de esterases, cutinases e lipases foram anotadas.

TABELA 3 - ESPÉCIES DO GÊNERO *Fusarium* sp. PRODUTORAS DE CARBOXIL-ÉSTER HIDROLASES

Espécie	Fonte de isolamento	Carboxil-Ester Hidrolase	Referências
<i>F. globulosum</i>	Efluente de fábrica de óleo	Lipase	Gullati <i>et al.</i> (2005)
<i>F. heterosporum</i>	Solo	Lipase	Shimada <i>et al.</i> (1993)
<i>F. oxysporum</i> (F3)	Cominho	Esterase	Topakas <i>et al.</i> (2003) Stamatis <i>et al.</i> (1998)
<i>F. oxysporum</i> (AM3)	Raízes de batata infectadas	Lipase	Camargo-de-Morais <i>et al.</i> (2003)
<i>F. oxysporum</i>	Plantas, frutas, folhas	Cutinase	Macedo e Pio (2005)
<i>F. oxysporum</i>	Frutas (Nordeste do Brasil)	Lipase	Prazeres <i>et al.</i> (2006)
<i>F. solani</i> (FS1)	Mamão ( <i>C. papaya</i> )	Lipase	Maia <i>et al.</i> (1999) Maia <i>et al.</i> (2001) Knight <i>et al.</i> (2000)
<i>F. solani</i> (N4-2)	Lago alcalino (pH 9,6)	Lipase	Liu <i>et al.</i> (2009)
<i>F. solani</i> (SKWF7)	Água residual de laticínios	Lipase	Kanmani <i>et al.</i> (2012)
<i>F. solani</i>	Madeira de floresta (Norte da Tunísia)	Lipase	Jallouli <i>et al.</i> (2012) Jallouli <i>et al.</i> (2013)
<i>F. solani</i> (ATCC MYA 4552)	Besouro <i>A. glabripennis</i>	Lipase, Cutinase, Esterase	Scully <i>et al.</i> (2012)
<i>F. solani</i> (MBL-24)	Cepa selvagem	Lipase	Iftikar <i>et al.</i> (2012)
<i>F. solani</i>	Abóbora <i>Cucurbita spp.</i>	Cutinase	Harthorne, Ball e Rees-George (1994)
<i>F. solani</i>	Tecido infectado de pacientes	Cutinase	Hawthorne, Rees-George, Crowhurst (2001)
<i>Fusarium sp.</i> (DMT-5-3)	Sedimentos costeiros	Esterase	Luo <i>et al.</i> (2012)

A lipase de *F. solani*, espécie de interesse desse trabalho, foi avaliada principalmente em relação a sua produção, sendo que alguns resultados de caracterização apontam para o potencial biotecnológico desta enzima, ainda que algumas apresentem baixa atividade, especialmente, baixa estabilidade em meio orgânico (JALLOULI *et al.*, 2013; JALLOULI *et al.*, 2012; IFTIKHAR *et al.*, 2012; KANMANI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2001; KNIGHT *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 1999).

#### 2.4.4 Lipase de *Fusarium solani*

A lipase produzida pela espécie *F. solani* tem sido pouco estudada pelo fato de esforços estarem voltados ao controle desta espécie. Porém, alguns estudos foram dirigidos ao conhecimento específico das condições de cultivo e breve de caracterização dessa enzima, mostrando o potencial dessa lipase.

Iftikhar *et al.* (2012) procuraram determinar as melhores condições para a produção de lipases de *F. solani* MBL-24 por fermentação em estado sólido. Através da variação de parâmetros do cultivo, obtiveram a máxima atividade, cerca de 8 U mL<sup>-1</sup>, utilizando farelo de trigo como substrato, óleo de canola (1%) como indutor, fontes de nitrogênio e de carbono inorgânica (NaNO<sub>3</sub> e CaCO<sub>3</sub>), respectivamente. As determinações de atividade foram realizadas pelo método titulométrico, sendo omitido o substrato utilizado.

O foco de Maia *et al.* (1999) foi a produção por fermentação submersa e caracterização da lipase de *F. solani* FS1. A atividade máxima foi conseguida após 72 h de cultivo (10,5 U mL<sup>-1</sup>), utilizando *p*NPP (palmitato de *p*-nitrofenila) como substrato. Em relação ao efeito da temperatura, observou-se máxima atividade a 30 °C e boa estabilidade em temperaturas inferiores a 35 °C, com perda significativa de atividade e estabilidade com a elevação da temperatura. Também se observou aumento de 70% da atividade da lipase quando incubada em *n*-hexano (40%; v/v), o que não ocorreu com solventes polares. Mais tarde, Maia *et al.* (2001) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono e elementos-traço no meio de cultivo. A maior atividade foi obtida com óleo de gergelim e com 0,01% (v/v) de adição de elementos-traço, finalizando 2 U mL<sup>-1</sup>

em 96 h de cultivo. Os valores cinéticos de  $K_m$  e  $V_{max}$ , usando palmitato de *p*-nitrofenila, *p*NPP, como substrato foram de 1,8 mM e 1,7  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>, respectivamente.

No primeiro estudo de Jallouli *et al.*(2012), uma cepa de *F. solani* foi selecionada dentre outros isolados fúngicos de madeiras florestais. A máxima produção de lipase por fermentação submersa ocorreu no quarto dia de cultivo, atingindo 30 U mL<sup>-1</sup>, tendo o óleo de oliva como substrato. Ensaio mais aprofundados de caracterização levaram ao conhecimento da massa molecular da lipase (30 kDa), das condições de máxima atividade (37 °C, pH 8,5), de estabilidade ao pH (faixa ideal entre pH 8,0 a 10,0) e à temperatura (decréscimo da estabilidade quando T > 40 °C, sendo totalmente desativada a 45 °C). Além disso, nesse trabalho foi demonstrada atividade fosfolipídica dessa lipase, utilizando fosfatidilcolina de ovo como substrato e método titulométrico (pHStat). Já em Jallouli *et al.* (2013), foram analisadas reações de esterificação catalisadas pela lipase de *F. solani* FSL utilizando isômeros de dicaprin (C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>), a fim de determinar a regiosseletividade dessa enzima. A lipase foi descrita como 1,3-específica, ou seja, hidrolisa a ligação éster especificamente nas posições *sn*-1 e *sn*-3 de triacilgliceróis.

A lipase de *F. solani* N4-2, isolado de um lago alcalino (pH 9,6), mostrou características interessantes para a sua aplicação como aditivo de detergentes. Produzida por fermentação submersa, a lipase apresentou massa molecular de 31,6 kDa e, após purificação, apresentou máxima atividade lipolítica em pH 9,0 a 30 °C, atingindo 705 U mL<sup>-1</sup>, com óleo de oliva como substrato. Além disso, demonstrou atividade a baixas temperaturas, permanecendo com aproximadamente 83% e 50% da máxima atividade a 10 e 0 °C, respectivamente. A atividade também foi aumentada na presença dos íons Cu<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> e Al<sup>+3</sup>. Em relação à estabilidade a surfactantes, detergentes comerciais, agentes oxidantes e proteases, essa lipase superou a lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus*, Lipolase<sup>®</sup> (Liu *et al.*, 2009).

Outra cepa de *Fusarium* com potencial lipolítico foi isolada de água residual de laticínios, *F. solani* SKWF7. A melhor condição de produção de lipase por fermentação submersa foi obtida a 40 °C, pH 8,0, por 72 h de cultivo. A sacarose demonstrou ser a melhor fonte de carbono e o óleo de palma, o melhor indutor da síntese de lipase. Após a otimização da concentração do

óleo (5% v/v), da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio 5,5 g L<sup>-1</sup>) e do elemento traço (CaCO<sub>3</sub>, 0,1 g L<sup>-1</sup>) no meio de cultivo, a atividade lipolítica atingiu 73 U mL<sup>-1</sup> contra pNPP, a máxima já relatada por lipase de *F. solani* sem purificação (KANMANI *et al.*, 2012).

O único estudo de imobilização da lipase de *F. solani* FS1 é o de Knight *et al.* (2000), onde esferas de poliacrilamida e Dacron magnetizado foram utilizados como suporte. Os autores avaliaram a imobilização por ligação covalente no exterior de esferas de poliacrilamida através de derivatização com glutaraldeído e por encapsulação nesse suporte e, ainda por imobilização em PET magnetizado (Dacron), através de grupos de azida, e obtiveram 7 U g<sup>-1</sup>, 12 U g<sup>-1</sup>, 5 U g<sup>-1</sup>, para cada método de imobilização respectivamente.

Na prospecção por novos fungos capazes de produzir lipases com características diferenciadas, o abacate em decomposição (*Persea americana* Mill.) foi descoberto como um ambiente propício para presença de fungos lipolíticos. Além de apresentar aproximadamente 26% de sua polpa composta de matéria graxa, o óleo extraído de abacate é composto por grandes porcentagens de ácidos graxos de cadeia longa, predominantemente o ácido oleico (SALGADO *et al.*, 2008; TANGO; CARVALHO; LIMONTA, 2004), que é citado na literatura como o principal indutor da produção de lipase (MONTESINO *et al.*, 1996; GORDILHO *et al.*, 1998).

O fungo isolado de abacate em decomposição na Universidade Estadual de Londrina, denominado “10B”, sobressaiu-se na produção de lipase por fermentação submersa dentre os demais isolados fúngicos de abacate. Na avaliação da produção de lipase por fermentação submersa, utilizando óleo de soja (2% v/v) como única fonte de carbono, a atividade atingiu 8897 U mL<sup>-1</sup>, pelo método de pNPP (MORAES, 2012). Este fungo, identificado no presente trabalho como *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02, produz uma lipase com alta atividade lipolítica, que motivou o estudo mais aprofundado das propriedades dessa enzima, foco deste trabalho.

### 3. OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar a lipase de *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02 na sua forma livre e imobilizada, visando futura aplicação em biocatálise.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar o fungo isolado de abacate produtor de lipase.
2. Identificar a lipase presente no extrato enzimático bruto através de eletroforese SDS-PAGE, zimograma e espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF).
3. Produzir por fermentação submersa e caracterizar a lipase livre frente ao substrato, pH, temperatura e estabilidade ao armazenamento.
4. Determinar as condições de imobilização da lipase por adsorção no polipropileno Accurel MP1000 e por ligação covalente na resina acrílica Immobead-150.
5. Caracterizar e comparar a estabilidade da enzima livre e imobilizada em Immobead-150 em relação à temperatura, ao pH e a solventes orgânicos.
6. Determinar a regioespecificidade e enantiosseletividade da lipase livre e imobilizada.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB), do Departamento de Química, e no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), ambos situados na Universidade Federal do Paraná.

### 4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os substratos trioleína (C18:1, 65%), tricaprilina (C8, 99%), tributirina (C4, 98%) e ácido oleico (99%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os solventes orgânicos utilizados foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). O suporte Immobead-150 foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e o Accurel MP-1000, da Akzo Nobel Fase (Oberburg, Germany). Os substratos (*R,S*) 1-fenil-1-etanol e (*R,S*) acetato de 1-feniletila foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Síntese Química e Enzimática (LaSQuE) do Departamento de Química desta Universidade, pela aluna de Iniciação Científica Talita Cadorin Fraiz, sob orientação do Prof. Dr. Leandro Piovan. Os demais reagentes tiveram grau analítico e de pureza requeridos nos experimentos.

### 4.2 MICRO-ORGANISMO

O fungo lipolítico utilizado neste trabalho foi isolado de abacate (*Persea americana Mill*) em decomposição na Universidade Estadual de Londrina (Londrina-PR). Nomeado como “fungo 10 B”, esse micro-organismo foi selecionado por Moraes (2012), dentre vários isolados fúngicos de abacate pelo potencial lipolítico demonstrado.



A identificação do fungo foi realizada através do sequenciamento de fragmentos de genes do *operon* ribossomal (ITS1-5.8S-ITS2) e de análise filogenética pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), na UNICAMP (ANEXO 1).

Ao longo dos experimentos, o fungo foi repicado semanalmente e armazenado em placas de Petri e tubos inclinados (cobertos com óleo mineral) contendo meio BDA, todos armazenados a 4 °C. Além disso, o método de Castellani foi utilizado para conservação dos isolados por períodos maiores de tempo. Este método consiste na preservação, em temperatura ambiente, de pequenos discos (7 mm) do fungo em frascos de vidro contendo água destilada esterilizada (PASSADOR *et al.*, 2010).

#### 4.3 PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Essa etapa teve como objetivo inicial o aumento do volume de extrato bruto enzimático produzido para 200 mL, uma vez que o volume do meio utilizado por Moraes (2012) era de apenas 25 mL. Para isso, foi estabelecida uma etapa adicional à produção de lipase: o preparo de um pré-inóculo. A composição do pré-inóculo e do meio de cultivo foi igual àquela utilizada por Moraes (2012), meio que já havia sido otimizado por Alves (2009) para outro isolado fúngico de abacate. Assim, ambos os meios foram compostos de: extrato de levedura 0,1% (m/v), CaCl<sub>2</sub> 0,1% (m/v), Triton X-100 0,1% (m/v) e meio mínimo de Vogel 2% (v/v). Óleo de soja comercial foi utilizado como fonte de carbono e indutor na produção de lipase. No pré-inóculo, a concentração de óleo foi de 1% (m/v) e no meio de cultivo, de 2% (m/v). O pH de ambos foi ajustado para 8,0 com NaOH para, posteriormente, os frascos serem autoclavados a 121 °C por 15 min.

Ao pré-inóculo (Erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de meio) foram adicionados 2 discos, de 0,5 cm de diâmetro, de micélio fúngico previamente cultivado em BDA por 7 dias a 30 °C. Após 48 h em agitação de 180 rpm a 30 °C, o pré-inóculo foi inteiramente vertido em Erlenmeyer de 1000 mL contendo 190 mL de meio de cultivo, representando, assim, 5% do meio final. Os frascos

de cultivo permaneceram a 30 °C, em agitação de 150 rpm, por tempo variável, ou seja, até que atingisse o mínimo de atividade enzimática estabelecida previamente, com base na máxima atividade atingida durante os cultivos (80 U mL<sup>-1</sup>). A diferença na agitação do pré-inóculo e do meio de cultivo (180 e 150 rpm, respectivamente) se deve à presença do emulsificante Triton X-100 que, quando em Erlenmeyer de maior volume, gerava espuma no meio de cultivo. Então, algumas avaliações visuais foram feitas até se estabelecer 150 rpm como agitação ideal para o cultivo, evitando a presença de espuma no meio.

Após a interrupção do cultivo, o meio foi filtrado em pano tipo Perfex<sup>®</sup>, onde ficou retida a maior quantidade de micélio fúngico para, posteriormente, ser centrifugado a 16500 ×g, a 4 °C, por 20 min. Para inibir qualquer crescimento microbiano e prolongar sua estabilidade, adicionou-se 0,02% (m/v) de azida sódica ao sobrenadante, denominado, no fim dessas etapas, de “extrato enzimático bruto”, com o qual foi realizada a caracterização da lipase de *Fusarium solani* (LFS) livre.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *Fusarium solani*

Nesta etapa, foi determinada a atividade lipolítica no extrato bruto, frente a substratos com diferentes comprimentos cadeia (tributirina, C4; tricaprilina, C8 e trioleína, C18). Além disso, ao longo de 8 meses foi avaliada a estabilidade do extrato bruto enzimático armazenado a 4 °C. Todas as dosagens de atividade foram feitas pelo método titulométrico em titulador automático pH-Stat (item 4.7.2).

##### 4.4.1 Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma

A fim de conhecer o perfil proteico do extrato bruto de *F. solani*, obtido nas condições de cultivo apresentadas, amostras foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE, conforme descrito por Laemmli (1970). O extrato bruto

foi concentrado através de centrifugação tangencial com membrana Millipore Vivaspin 20 e aplicado no gel, para melhor visualização das bandas. As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8, contendo 10% (m/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol e 0,02% (m/v) de azul de bromofenol. A concentração de poliacrilamida utilizada foi de 5% e 12% (m/v) para o gel de empilhamento e de separação, respectivamente. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as seguintes proteínas: fosforilase (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactolbumina (14,4 kDa). Após a corrida, o gel foi corado com Azul Brilhante de Coomassie R-250.

A detecção de atividade lipolítica nas bandas do gel de SDS-PAGE foi realizada através de zimograma, conforme protocolo descrito na literatura (OH *et al.*, 1999). Metade do gel foi utilizada para o zimograma, enquanto que a outra metade foi corada com Azul Brilhante de Coomassie e utilizada para localização da banda da enzima. Assim, extrato bruto, sem fervura prévia, foi aplicado em vários poços do gel de eletroforese. Após a corrida, o SDS foi removido com agitação suave do gel por 10 min em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) contendo 1% de Triton X-100 e duas vezes em tampão Tris-HCl isento de detergente. Posteriormente, o gel foi colocado sobre uma emulsão de ágar com trioleína para detecção da atividade lipolítica e incubado a 30 °C, até o aparecimento de halos de hidrólise, observados sob luz UV. A emulsão de ágar com o substrato foi preparada com 1,3% (m/v) de ágar, 1% (v/v) de trioleína, 25 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM CaCl<sub>2</sub> e 0,002% de Rhodamina B.

#### 4.4.2 Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF)

Para conhecer as proteínas presentes no gel de SDS-PAGE, as bandas foram recortadas em pequenos fragmentos (1 mm<sup>2</sup>) e digeridas com tripsina, separadamente. Os fragmentos de gel foram lavados 2 vezes (ou até que os géis ficassem transparentes) por 30 min, com 400  $\mu$ L de uma solução de acetonitrila (50%, v/v) e bicarbonato de amônio 15 mM pH 8,0, para retirada do corante SDS. Após a remoção dessa solução descorante, adicionou-se 10

$\mu\text{L}$  da solução de tripsina (144  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio 50 mM, 36  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  Mili-Q, 20  $\mu\text{L}$  de acetonitrila e 4  $\mu\text{L}$  de tripsina 1  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ). Os microtubos foram mantidos por 30 min em banho de gelo e *overnight* a 37 °C. Após esse período, o sobrenadante contendo os peptídeos, foi transferido para outro microtubo. Uma nova lavagem foi realizada para remoção dos peptídeos restantes nos fragmentos de gel. Para isso, utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de TFA 5% (v/v) e acetonitrila 50% (v/v), agitando-se por 30 min e transferindo o sobrenadante para os microtubos já contendo a solução com os peptídeos, utilizada para a análise de MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization* MALDI *time-of-flight* TOF) (SHEVSHENKO *et al.*, 1996).

As proteínas excisadas foram misturadas com uma solução de matriz saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (dissolvido em acetonitrila 50% v/v, TFA a 0,1% v/v), colocadas em placa de MALDI, onde permaneceram até secar. Os espectros de massa foram obtidos utilizando um espectrômetro MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As análises de MS foram realizadas em modo positivo de reflexão de íon, usando voltagem de aceleração de 20 kV. Listas de pico foram criadas usando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). Como padrões, foram utilizadas as proteínas: angiotensina I (1296,685 Da), angiotensina II (1646,542 Da), somatostatina (1637,724 Da), ACTH 1-17 (2093,087 Da), ACTH 18-39 (2465,199 Da) e ACTH 1-24 (2932,588 Da). Uma pesquisa de base de dados foi realizada através do programa Mascot 2.2, onde as listas de massa foram comparadas com as contidas em banco de dados de fungos, considerando uma tolerância de erro de 100 ppm.

#### 4.5 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Fusarium solani*

As características dos suportes selecionados para o estudo de imobilização estão apresentadas na TABELA 4. A imobilização da lipase de *F. solani* em ambos os suportes foi realizada colocando o suporte diretamente em contato com o extrato bruto produzido conforme descrito no item 4.5. A fim de comparar os resultados de imobilização com Accurel MP-1000 e Immobead-

150, a razão proteína/suporte definida para o estudo de imobilização foi de 10 mg g<sup>-1</sup> para ambos os suportes. Este valor foi definido com base em Madalozzo (2012) e Poppe *et al.* (2013), que usaram essa razão proteína/suporte para o Accurel MP-1000 e para o Immobead-150, respectivamente.

TABELA 4 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS SUPORTES UTILIZADOS PARA ESTUDO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Fusarium solani*

Suporte	Composição	Polaridade	Características
Accurel MP-1000	Polipropileno	Hidrofóbico	Partículas < 1500 µm Tamanho do poro: 25000 nm
Immobead-150	Poliacrílico	Hidrofílico	Grupo funcional – Epóxido Partículas: 100 a 300 µm Tamanho do poro: 15 nm

FONTE: SABBANI *et al.* (2006), POPPE *et al.* (2013).

#### 4.5.1 Imobilização por Adsorção em Accurel MP-1000

Para imobilização de LFS neste suporte, foi utilizado o método proposto por Al-Duri e Yong (2000). O suporte Accurel MP-1000 foi umedecido com solução de etanol (50% em água, v/v) por 30 min; em seguida, foi lavado com água destilada e filtrado, a fim de remover o ar contido nas partículas. Foram adicionados 0,2 g do suporte e 20 mL da solução enzimática em um Erlenmeyer de 125 mL, na razão de proteína/suporte de 10 mg g<sup>-1</sup>. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 150 rpm, a 4 °C. Após 24 h, o suporte foi removido da mistura por filtração em papel de filtro qualitativo Whatman nº1, seco em dessecador por 16 h e armazenado a 4 °C. Neste trabalho, o preparado contendo a lipase de *F. solani* imobilizada foi chamado de LFS-Acc.

#### 4.5.2 Imobilização por Ligação Covalente em Immobead-150

A imobilização com o suporte Immobead-150, anteriormente vendido como Eupergit C<sup>®</sup>, consiste na ligação direta da enzima aos polímeros via grupos oxiranos. A imobilização de LFS em Immobead-150 foi realizada de acordo com o método convencional utilizado para suportes com grupos epóxido (KNEZEVIC *et al.*, 2006). Este método envolve o contato direto entre a solução enzimática e o suporte, o qual não foi submetido a nenhum pré-tratamento. Para a imobilização, adicionaram-se 0,2 g do suporte e 20 mL da solução enzimática (10 mg g<sup>-1</sup> suporte) em um Erlenmeyer de 125 mL. Esses frascos foram incubados em agitador orbital a 150 rpm a 4 °C por 24 h. Após esse tempo, o suporte foi removido da mistura por filtração em papel de filtro qualitativo Whatman nº 1, seco em dessecador por 16 h e armazenado a 4 °C. O derivado imobilizado contendo a lipase de *F. solani* foi chamado, neste trabalho, de LFS-Imm.

#### 4.5.3 Cinética de Imobilização

Com o objetivo de determinar o tempo ideal de contato entre o extrato bruto e o suporte para a ligação da máxima quantidade de lipase, alíquotas de 0,5 mL foram coletadas do sobrenadante ao longo de 24 h, sendo a atividade e a concentração residual de proteínas determinadas pelo método titulométrico (item 4.7.2) e de Bradford (item 4.7.1), respectivamente.

A partir desse ensaio, obtiveram-se os perfis de decaimento de atividade e de proteína no sobrenadante ao longo da imobilização e foi possível calcular a eficiência da imobilização ( $E_i$ ), que é a razão entre a atividade residual e atividade inicial no sobrenadante, calculada a partir da Equação 1 (Eq. 1).

Também foi calculada a retenção de atividade (R), que indica se lipase ligada ao suporte manteve sua atividade, teve um aumento ou uma diminuição na atividade após a imobilização. Para o cálculo de retenção de atividade utilizou-se a Equação 2 (Eq. 2) (YADAV; JADHAV, 2005).

$$E_i = \frac{(At_i - At_f)}{At_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$R = \frac{At_{obs}}{At_{teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

$At_i$ : atividade inicial total de hidrólise frente à trioleína no sobrenadante, antes da imobilização (U);

$At_f$ : atividade final total de hidrólise frente à trioleína no sobrenadante após a imobilização (U);

$At_{obs}$ : atividade de hidrólise determinada pelo método titulométrico (pH-Stat), contra tricaprilina.

$At_{teórica}$ : reativa à concentração de proteína ligada no suporte e a atividade de hidrólise dessas proteínas quando presentes no extrato bruto enzimático.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Fusarium solani* LIVRE E IMOBILIZADA

Os critérios avaliados na etapa de imobilização (eficiência de imobilização, atividade de hidrólise e retenção de atividade) indicaram o Immobead-150 como melhor suporte para imobilização de LFS. Por isso, a etapa de caracterização foi realizada com LFS-Imm e LFS livre, comparando-se o efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática, a estabilidade ao pH e à temperatura e a regioespecificidade de LFS-Imm e de LFS livre. A enantiosseletividade e a estabilidade em solventes orgânicos foram avaliadas apenas com a LFS-Imm, pois a lipase livre não apresentou atividade nestes meios.

#### 4.6.1 Efeito do pH na Atividade Enzimática

A influência do pH na atividade enzimática foi determinada entre pH 4,0 e 11,0, pelo método titulométrico (item 4.7.2), utilizando 0,2 mL de extrato bruto ou 25 mg de LFS-Imm no frasco de reação.

#### 4.6.2 Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática

O efeito da temperatura na atividade de LFS foi avaliado entre 20 e 60 °C, sendo a atividade enzimática determinada pelo método titulométrico (item 4.7.2), utilizando 0,2 mL de extrato bruto ou 25 mg de LFS-Imm no frasco de reação.

#### 4.6.3 Estabilidade ao pH

Nesses ensaios, LFS livre (400 µL) e a enzima imobilizada LFS-Imm (25 mg), em microtubo Eppendorf de 2,5 mL, foram adicionados a 400 µL do tampão selecionado e incubados a 4 °C por 2 h. Os tampões utilizados foram: acetato (pH 4 e 5), citrato (pH 5 e 6), HEPES (pH 6 e 7), Tris-HCl (pH 7, 8 e 9) e glicina (pH 9 e 10), na concentração de 200 mM. Após incubação, 400 µL do extrato bruto e a enzima imobilizada (após retirada do excesso de tampão com micropipeta), foram transferidas ao reator do titulador automático pH-Stat que já continha 20 mL da emulsão de tricaprilina. A titulação foi iniciada pelo ajuste do pH a 7,5 e, a partir deste pH, a atividade lipolítica foi determinada conforme item 4.7.2. Como controle, amostras de LFS livre e de LFS-imm, sem tampão, foram incubadas a 4 °C nas mesmas condições dos ensaios acima.



#### 4.6.4 Estabilidade à Temperatura

LFS livre (400  $\mu$ L) e a enzima imobilizada LFS-Imm (25 mg em 400  $\mu$ L de tampão fosfato pH 7,0 50 mM) foram incubados em microtubos Eppendorf de 2,5 mL em temperaturas entre 30 a 45 °C em banho termostaticado (Tecnal TE-184). Amostras foram retiradas ao longo de 48 h (os intervalos variaram de acordo com a temperatura avaliada) e a atividade lipolítica foi determinada pelo método titulométrico (item 4.7.2). Como controle, amostras de LFS livre e de LFS-imm, foram incubadas a 4 °C, nas mesmas condições dos ensaios acima.

#### 4.6.5 Estabilidade em Solventes Orgânicos

O estudo da influência de solventes orgânicos na estabilidade de LFS foi realizado utilizando apenas sua forma imobilizada, FLS-Imm. Isso foi definido pelo fato de que, em biocatálise, a aplicação de lipases em solventes orgânicos ocorre, preponderantemente, com sua forma imobilizada, devido, em geral, a sua maior estabilidade e atividade nestes meios (STERGIOU *et al.*, 2013). Além disso, em ensaio prévio utilizando a LFS livre liofilizada, observou-se que a atividade de esterificação era praticamente nula e a hidrólise em meio orgânico levava à agregação do suporte na fração aquosa do meio orgânico. Assim, com vistas à utilização de LFS-Imm em reações de síntese, apenas a atividade de esterificação residual do preparado enzimático foi determinada, através da reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, como descrito no item 4.7.3.

Os ensaios foram realizados em frascos de vidro de 4 mL com tampa contendo 400  $\mu$ L de solventes orgânicos com diferentes valores de log P (entre -1,3 a 4), adicionados de 50 mg de LFS-Imm. Os tubos foram incubados por 8 h em agitador orbital a 200 rpm e a 35 °C. Após esse período, o solvente foi retirado meio utilizando micropipeta (100  $\mu$ L) e os frascos contendo com o suporte foram mantidos em dessecador por 16 h. A atividade de esterificação residual de LFS-Imm foi determinada utilizando o método de Lowry-Tinsley

(item 4.7.4), tendo como controle a LFS-imm sem incubação em solvente. Os solventes utilizados foram os seguintes: dimetilsulfóxido, DMSO (log P -1,3), metanol (log P -0,76), etanol (log P -0,31), acetona (log P -0,23), *n*-propanol (log P 0,25), tetraidrofurano, THF (log P 0,46), tolueno (log P 2,5), *n*-hexano (log P 3,5) e *n*-heptano (log P 4).

#### 4.6.6 Determinação da Regioespecificidade

A regioespecificidade de LFS livre e de LFS-imm foi determinada a partir da reação de hidrólise da trioleína em meio orgânico, por ser uma análise qualitativa e não ter interferência direta da agregação de LFS-imm, que ocorre em meio aquoso. A análise dos produtos oriundos dessa reação foi feita por cromatografia em camada delgada (CCD), segundo Sugihara *et al.* (1992). O meio reacional foi composto de 5 mL de *n*-heptano, 20 mmol L<sup>-1</sup> de trioleína, 0,2 mL de água destilada. A reação foi iniciada por adição de 20 mg de LFS-imm ou 0,2 mL do extrato bruto (dispensando a adição da água, neste caso). A mistura foi mantida em agitador orbital a 200 rpm, a 35 °C, durante 4 h. Após a reação, alíquotas do meio reacional correspondentes a 1 h e 4 h foram aplicadas com um capilar em uma placa de sílica gel (60 GF) (Fluka, Alemanha). As placas foram transferidas para a cuba de cromatografia contendo a fase móvel, que consistiu de uma mistura 1:3 (v/v) de acetato de etila:hexano. Para o desenvolvimento das bandas, foi utilizada uma câmara saturada com iodo gasoso. A regiosseletividade foi determinada levando-se em conta os valores de R<sub>f</sub> dos padrões 1,2-monoleína, ácido oleico, 1,2(2,3)-dioleína, 1,3-dioleína e trioleína (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

#### 4.6.7 Determinação da Enantiosseletividade

Esse estudo foi realizado apenas com LFS-imm devido à ausência de atividade de esterificação de LFS livre liofilizada em meio orgânico. A avaliação

da enantiosseletividade se deu por meio de reações de transesterificação de 1-fenil-1-etanol (FIGURA 4). Esse substrato é considerado padrão para avaliação de enantiosseletividade de lipases, pois apresenta características estruturais da regra de Kazlauskas que leva em consideração o volume dos substituintes ao redor do centro de quiralidade a ser resolvido (KAZLAUKAS *et al.*, 1991).

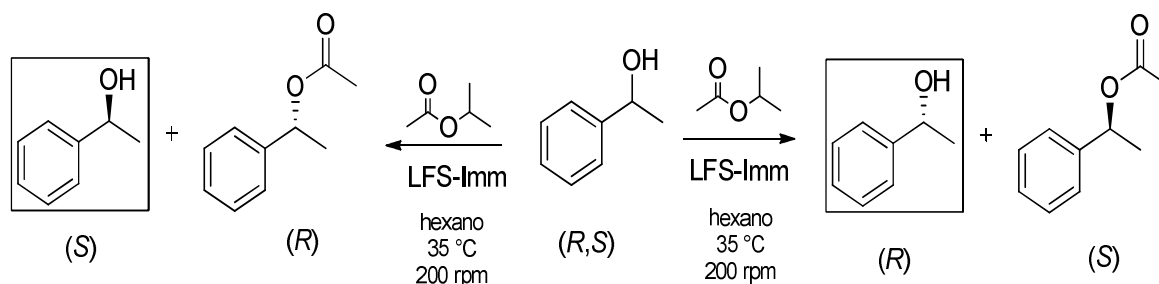


FIGURA 4 - TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÁLCOOL 1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA LIPASE DE *Fusarium solani* IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150

As reações foram realizadas em frascos de vidro de 4 mL com tampa, sendo o meio reacional composto de 1 mL de *n*-hexano, 0,1 mmol do substrato (*R,S*) 1-fenil-1-etanol, 0,4 mmol de acetato de isopropenila e 50 mg de enzima imobilizada. As reações foram realizadas a 35 °C em agitador orbital a 200 rpm e acompanhadas ao longo do tempo pela retirada de alíquotas (10  $\mu$ L), que foram analisadas por cromatografia em fase gasosa com coluna quiral (item 4.7.5). Foram realizados controles utilizando o suporte Immobead-150 isoladamente e LFS-Imm após fervura para desnaturação da lipase.

As configurações absolutas dos enantiômeros foram determinadas de forma indireta pela comparação com os resultados da resolução cinética enzimática utilizando a lipase comercial de *Candida antarctica* B (CALB, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark). Esta lipase é seletiva para o enantiômero R (R-seletiva) em relação a álcoois secundários (*R*) (HABULIN *et al.*, 2009; OVERMEYER *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 1998).

Os excessos enantioméricos de substrato ( $ee_s$ ) e produto ( $ee_p$ ) foram determinados pela diferença de porcentagens relativas de cada enantiômero, conforme Equação (Eq. 3), onde R é a concentração do enantiômero R e S é a concentração do enantiômero S. A conversão (c) foi calculada pela Equação 4

(Eq.4) e a razão enantiomérica (*E*), pela Equação 5 (Eq.5), segundo Chen *et al.* (1982).

$$ee(\%) = \left[ \frac{R-S}{R+S} \right] \times 100 \quad (Eq. 3)$$

$$c (\%) = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \times 100 \quad (Eq. 4)$$

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \quad (Eq. 5)$$

## 4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.7.1 Determinação de Proteínas

A dosagem de proteínas presente no extrato bruto foi feita de acordo com o método proposto por Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina, BSA, (2 mg mL<sup>-1</sup>) como padrão para a produção da curva de calibração. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

### 4.7.2 Método Titulométrico

Foi utilizada a metodologia proposta por Tiss, Carriere e Verger (2001), que se baseia na titulação, com NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>, dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis, utilizando um titulador automático do tipo pH-Stat (Metrohm 718 Stat Titrimo). Para todos os ensaios, foi preparada uma emulsão com goma arábica (3%, m/v), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (2 mmol L<sup>-1</sup>), tampão Tris-HCl (2,5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0) e NaCl (150 mmol L<sup>-1</sup>). A esta

emulsão foi adicionado o substrato definido como padrão (tricaprilina), após verificação da atividade frente à tributirina e trioleína, todos na concentração de 67 mmol L<sup>-1</sup>. Esta mistura foi homogeneizada durante 15 min em liquidificador. O extrato bruto (0,2 mL) e a enzima imobilizada (25 mg) foram adicionadas em 20 mL de emulsão no próprio frasco de reação (capacidade de 50 mL e termostatizado) sob agitação magnética (300 rpm), a 35 °C. A atividade de hidrólise foi calculada a partir da velocidade inicial da reação, que foi seguida por 5 min após o ajuste do pH para 7,5. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a produção de 1 μmol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio. As análises realizadas por esse método foram feitas em duplicata.

#### 4.7.3 Atividade da esterificação

A reação de esterificação (FIGURA 5) de síntese do oleato de etila foi utilizada como reação padrão para a determinação da atividade de esterificação de LFS livre liofilizada e LFS-Imm. As reações foram realizadas em duplicata em frascos (14 mL) de vidro com tampa, contendo 2,5 mL *n*-hexano, 50 mg de LFS-Imm, 70 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico e 210 mmol L<sup>-1</sup> de etanol, a 35 °C, com incubação em agitador orbital a 200 rpm (FERNANDES *et al.*, 2007).

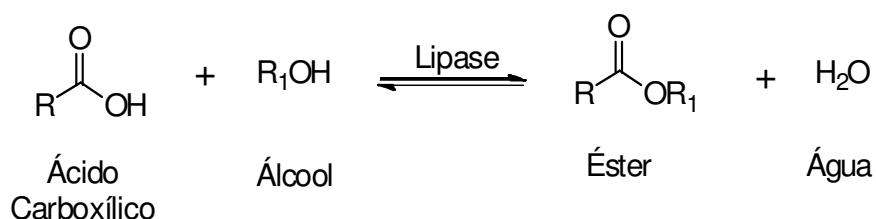


FIGURA 5- EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Em intervalos fixos, alíquotas de 100 μL foram coletadas do meio reacional e analisadas em triplicata quanto ao teor de ácido graxo residual, através do método de Lowry-Tinsley (item 4.7.4). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como o consumo de 1 μmol min<sup>-1</sup> de ácido graxo nas

condições do ensaio. As reações foram realizadas em duplicata e controles foram feitos com a adição do suporte sem a lipase.

#### 4.7.4 Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry-Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor de ácido oleico durante as reações de síntese do oleato de etila, utilizadas como padrão para verificar a atividade de esterificação de LFS livre liofilizada e LFS-Imm. O ensaio foi realizado em microtubos Eppendorf de 2,5 mL contendo 1,15 mL de hexano e 250  $\mu$ L do reativo de cor (solução aquosa de acetato de cobre II 5%, com pH entre 6,0-6,2, corrigido previamente com piridina). Adicionou-se 100  $\mu$ L da amostra, agitou-se em vórtex durante 40 s e a absorbância da fase orgânica foi lida em espectrofotômetro a 715 nm. A concentração de ácido graxo no meio foi calculada a partir de uma curva de calibração feita com o ácido oleico (90%, Sigma Aldrich) nas mesmas condições do ensaio. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.7.5 Cromatografia de Fase Gasosa em Coluna Quiral

O cromatógrafo de fase gasosa utilizado foi o modelo GC-2010 (Shimadzu Co. Kyoto, Japan), equipado com detector de ionização de chama (FID) e com coluna de fase estacionária quiral composta de  $\beta$ -ciclodextrina (CP Chirasil-DEX CB), com dimensões de 25 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu$ m de diâmetro de partícula. As condições cromatográficas foram: injeção (1  $\mu$ L) modo split (razão 1:50), temperatura do detector 220  $^{\circ}$ C, gás de arraste nitrogênio, N<sub>2</sub>, com gradiente de temperatura entre 110 e 120  $^{\circ}$ C, a 1  $^{\circ}$ C min<sup>-1</sup>. Os valores das conversões foram determinados a partir da integração das áreas dos picos dos compostos (*R,S*)-1-fenil-1-etanol e acetato de 1-feniletila, pelas Equações 2 e 3 (item 4.6.7).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

A identificação do fungo utilizado neste trabalho foi realizada pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), na UNICAMP. A análise filogenética e o sequenciamento de fragmentos de genes do *operon* ribossomal (ITS1-5.8S-ITS2) indicaram que esse fungo pertence ao gênero *Fusarium*, mais especificamente, à espécie *Fusarium solani*, também denominada *Nectria haematococca* (ANEXO 1).

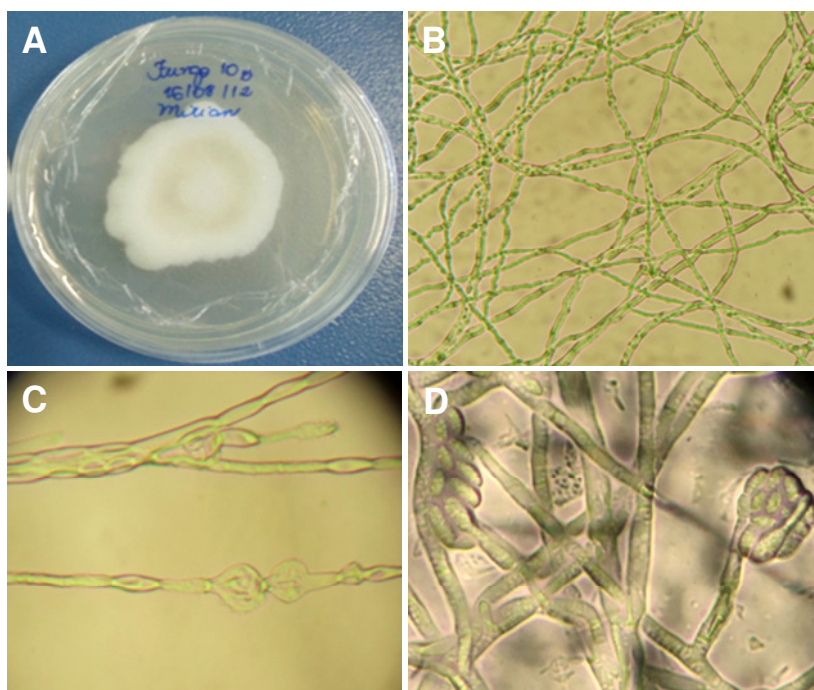


FIGURA 6 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO FUNGO ISOLADO DE ABACATE E IDENTIFICADO COMO *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02

Em (A) visualização do fungo em meio BDA, após 7 dias de incubação a 30 °C; visualização em microscópio óptico das lâminas de microcultivo, com aumento de 40x (B) e de 100x (C e D). FONTE: O autor.

Em relação às características morfológicas (FIGURA 6), a cepa *F. solani* CPQBA 515-12 DRM 02, utilizada nesse trabalho, apresenta micélio hialino e algodinoso. Microscopicamente, observa-se a presença de hifas

septadas (B), de fiálides (C) e de microconídios (D). Esses resultados foram obtidos através da técnica de microcultivo e evidenciam estruturas características dessa espécie, assim como mostrado anteriormente (item 2.4.2)

## 5.2 PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para produção da lipase de *F. solani* (LFS) por fermentação submersa, foi feito um pré-inóculo que, assim como o meio de cultivo, apresentou a mesma composição do meio utilizado por Moraes (2012). O óleo de soja foi adicionado como fonte de carbono e indutor na produção de lipase no pré-inóculo (1% m/v) e no meio de cultivo (2% m/v).

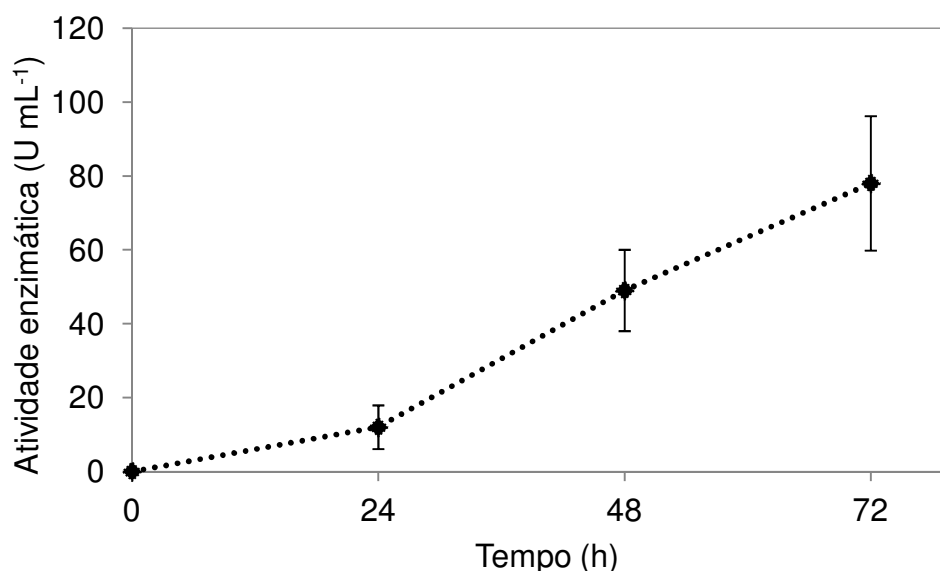


FIGURA 7 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Fusarium solani* POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Produção de lipase realizada com óleo de soja 2% (m/v), em triplicata. Determinação da atividade enzimática pelo método titulométrico (pHStat), com substrato tricaprilina, em pH 7,5, a 35 °C.

A FIGURA 7 mostra o perfil de produção de LFS que, mesmo com grande variação nos cultivos, atingiu-se atividade média de 78 U mL<sup>-1</sup>, correspondentes a uma atividade específica de 780 U mg<sup>-1</sup> em 72 h, próximo ao critério estabelecido para a interrupção dos cultivos (80 U mL<sup>-1</sup>). Este critério



foi definido em função da grande variação dos cultivos, que pode ser explicada pelo tipo de inóculo utilizado (adição de discos de micélio ao meio de cultivo).

Embora essa técnica não seja quantitativa e, por isso, menos precisa, o uso de suspensão de esporos como inóculo não foi possível devido à ausência de esporos sexuais na cepa de *F. solani* utilizada neste trabalho, quando visualizada em microscópio óptico. Segundo Cai *et al.* (2011), a reprodução sexuada por espécies de *Fusarium* é difícil de ser induzida *in vitro*. Além de ocorrer normalmente em condições ambientais mais severas, a reprodução sexuada só ocorre na presença de uma estirpe fêmea fértil ou hermafrodita. Isso ocorre porque, assim como outros ascomicetos, os fungos têm os papéis masculino ou feminino bem definidos (WINGFIELD *et al.*, 2008).

Para Jallouli *et al.* (2012), a máxima produção de lipase de *F. solani* foi de 30 U mL<sup>-1</sup> (determinada pelo método titulométrico, com óleo de oliva) e ocorreu em 96 h de incubação, utilizando como indutor 0,5% de óleo de oliva. Utilizando este óleo na mesma concentração, Maia *et al.* (1999) observaram o pico de produção de lipase de *F. solani* FS1 em 72 h, onde a atividade do extrato bruto foi de 10,5 U mL<sup>-1</sup>, determinada pelo método de pNPP. Também após 72 h de incubação, Kanmani *et al.* (2012) relataram atividade de 73 U mL<sup>-1</sup> (método de pNPP) em presença de óleo de palma 5% (v/v), com *F. solani* SKWF7.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *Fusarium solani*

Esses ensaios tiveram como objetivo caracterizar a atividade lipolítica no extrato bruto. Avaliou-se o efeito dos substratos naturais tributirina (C4), tricaprilina (C8) e trioléina (C18) na atividade do extrato enzimático bruto e, mensalmente, foi determinada sua atividade a fim de verificar sua estabilidade ao armazenamento a 4 °C. Conforme apresentado na FIGURA 8, a maior atividade hidrolítica foi exibida utilizando tricaprilina como substrato (70 U mL<sup>-1</sup>). Tanto para o substrato de maior quanto para o de menor cadeia de ácido graxo, a atividade foi similar, com 25 U mL<sup>-1</sup> e 28 U mL<sup>-1</sup> para tributirina e trioléina, respectivamente. A atividade dessa enzima frente a um substrato de

cadeia longa (trioleína) tornou possível caracterizá-la como sendo uma “lipase verdadeira” (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

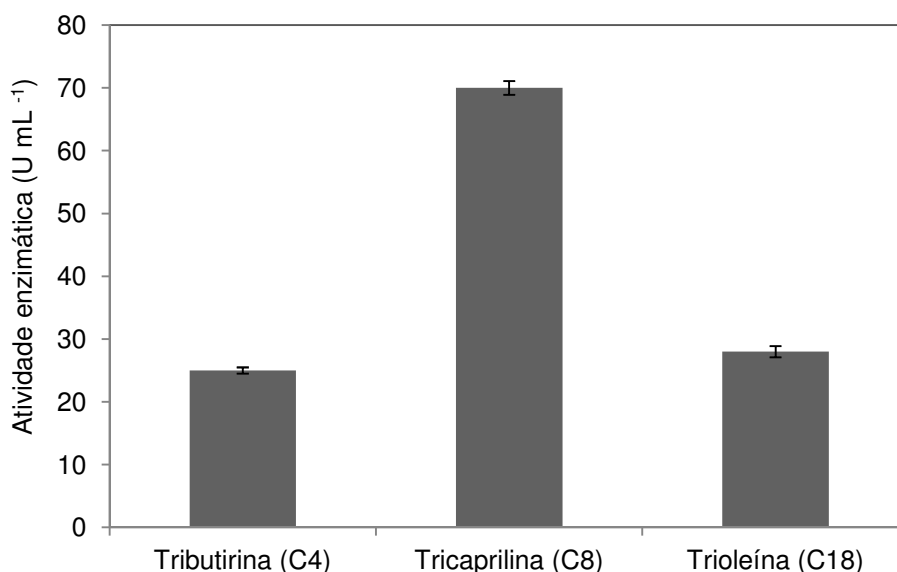


FIGURA 8 - EFEITO DO COMPRIMENTO DA CADEIA DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA LIPASE DE *Fusarium solani*

Condições do ensaio: 37 °C e pH 8,0. Ensaio realizado em duplicata pelo método titulométrico (pH-Stat).

A maior atividade de outras lipases do gênero *Fusarium* também é descrita para triacilgliceróis de cadeia média, como é o caso da lipase de *F. heterosporum*, que apresentou atividade contra trioleína, porém, a maior atividade foi observada contra tricaprilina (C8) e tricaprina (C10), expressas pelos autores em percentual (SHIMADA *et al.*, 1993). O mesmo perfil foi verificado para a lipase de *F. oxysporum f. sp. vasinfectum*, que apresentou maior atividade para tricaprilina (C8) e trilaurina (C12), com 62 e 68 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente (GULATI *et al.*, 2005). A lipase de *F. oxysporum*, apresentou baixa atividade contra TAG de cadeia curta, mas contra trioleína (C18) e tricaprilina (C8) foram observadas as maiores atividades, 44 U e 33 U totais, respectivamente (PRAZERES; CRUZ; PASTORE, 2006).

Outra característica avaliada foi a estabilidade ao armazenamento, considerada uma propriedade tão importante quanto à estabilidade operacional para enzimas com finalidade industrial (LIU *et al.*, 2009; MINOVSKA; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 2005). Analisou-se mensalmente a atividade

lipolítica do extrato bruto pelo método titulométrico, a fim de conhecer estabilidade da LFS armazenada a 4 °C em presença de 0,02% (m/v) de azida sódica (FIGURA 9). Verificou-se que LFS manteve-se estável por até 4 meses, mantendo cerca de 90% de atividade inicial; a partir daí, houve um decréscimo da atividade, mas mesmo após 8 meses de armazenamento, LFS manteve 62% de sua atividade inicial.

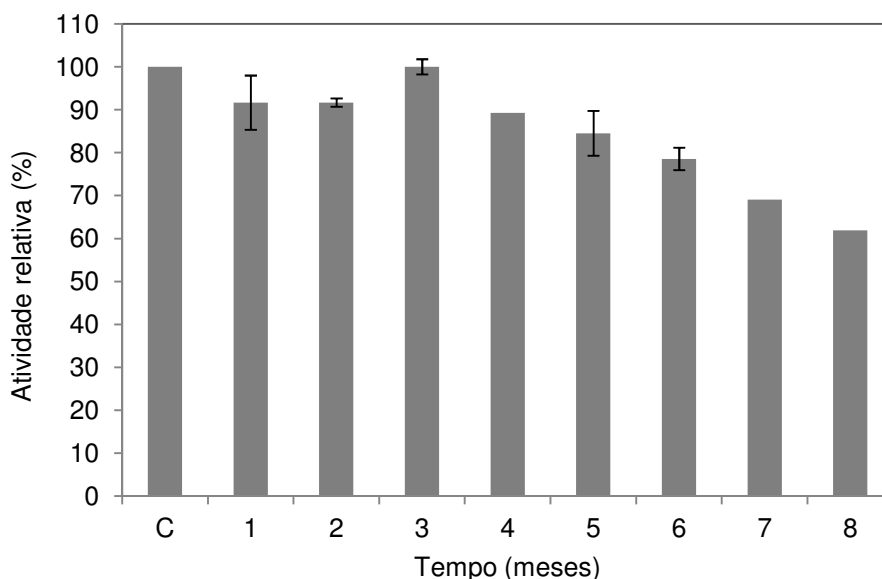


FIGURA 9 - ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO DE *Fusarium solani* AO ARMAZENAMENTO

Extrato bruto enzimático armazenado em presença de azida sódica 0,02% (m/v), a 4 °C. Dosagem de atividade enzimática realizada em duplicata pelo método titulométrico (pH-Stat) com tricaprilina como substrato. O extrato bruto recém obtido foi considerado o controle (C).

Poucos estudos mostram a estabilidade de lipases ao armazenamento. A lipase de *Fusarium solani* N4-2 purificada mostrou maior estabilidade ao armazenamento do que o extrato bruto enzimático, mantendo 94% da atividade após 1 mês a 4 °C (LIU *et al.*, 2013).

### 5.3.1 Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma

O perfil proteico do extrato bruto de *F. solani* está mostrado na FIGURA 10. Embora sem ter sido purificado, se observa um perfil bastante puro do

extrato bruto, mas a presença de outras proteínas, não detectadas pelo método de coloração utilizado, não pode ser descartada, já que o corante Azul Brillhante de Coomassie R-250 tem baixa sensibilidade (KANG *et al.*, 2002). Duas bandas de maior intensidade podem ser visualizadas, cujas massas moleculares calculadas a partir do gel foram de 63,2 kDa e 33,4 kDa. Como massas moleculares de lipase de *F. solani* já foram descritas por Jallouli *et al.* (2012) e Liu *et al.* (2009) com valores de 30 kDa e 31,6 kDa, respectivamente, era provável que a banda de 30 kDa fosse a de uma lipase. Pelo fato da banda de 60 kDa apresentar aproximadamente o dobro da massa da lipase, sugere-se que pode ter ocorrido a formação de um dímero da lipase. Esta hipótese, bem como a confirmação da banda de 33,4 kDa, foram investigadas através de zimograma e por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF).

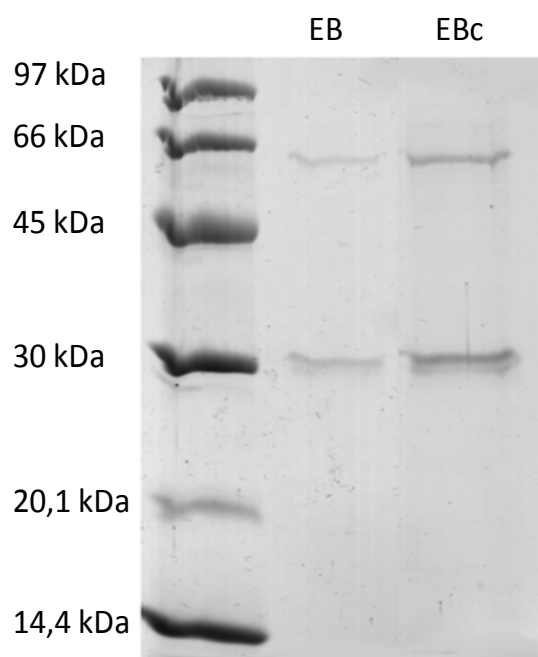


FIGURA 10 - ELETROFORESE SDS-PAGE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO DE *Fusarium solani*, PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Perfil proteico do extrato bruto sem concentração (EB) e concentrado (EBc), resultante da centrifugação com Milipore Vivaspin 20.

Em relação ao zimograma, não houve formação do halo laranja fluorescente, resultado da hidrólise da trioleína e complexação de ácidos graxos livres com Rhodamina B. Isso indica que as proteínas ali presentes não estão ativas e que pode haver a presença do SDS, mesmo após a lavagem

com tampão. Detergentes, como o SDS, podem causar a inibição de lipases, dependendo da concentração utilizada. Prazeres, Cruz e Pastore (2006) relataram o efeito fortemente inibitório do SDS à lipase de *Fusarium oxysporum*. Outras confirmações da inibição em presença de SDS também foram feitas para lipases de diferentes origens como a lipase LipC12 de metagenômica (GLOGAUER *et al.*, 2011), a lipase de *Rhizopus oryzae* (HIOL *et al.*, 2000) e para a lipase recombinante de *Aspergillus fumigatus* (SHANGGUAN *et al.*, 2011).

Em análise geral, o perfil proteínas extracelulares, observado no gel de eletroforese (FIGURA 10), com apenas duas bandas, pode estar relacionado com a presença do óleo de soja como única fonte de carbono e indutor na produção de lipase. Primeiro, porque esse óleo apresenta cerca de 20% de ácido oleico, descrito como principal indutor da produção de lipase (ZAMBIAZI *et al.*, 2007; GORDILHO *et al.*, 1998; MONTESINO *et al.*, 1996). Além disso, a ausência de glucose como fonte de carbono, tanto no pré-inóculo quanto no meio de cultivo, pode ter favorecido a maior produção de lipase, uma vez que já é conhecido o efeito repressor da glucose na produção dessa enzima (LAKSHMI *et al.*, 1999; MAIA *et al.*, 1999; MONTESINO *et al.*, 1996). Uma análise de expressão realizada em cepa de *F. graminearum* indicou que o gene da lipase (FGL1) é induzido por substratos lipídicos e reprimido pela glucose (VOIGT; SCHÄFER; SALOMON, 2005).

### 5.3.2 Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF)

A análise por espectrometria de massa foi utilizada para identificar as proteínas contidas nas duas principais bandas do gel SDS-PAGE e possibilitou uma cobertura de 21% da sequência da proteína contida na banda de aproximadamente 33,4 kDa. As sequências peptídicas cobertas (FIGURA 11, em vermelho) confirmaram a identidade dessa proteína com a lipase de *Nectria haematococca* MPVI 77-13-4, como é conhecida a forma sexuada do fungo *Fusarium solani*.

Os cálculos feitos a partir dos dados de massa revelaram que essa proteína apresenta massa de 36,1 kDa, pI calculado de 5,48 e é composta por 333 resíduos de aminoácidos. Já para a proteína contida na banda de 63,2 kDa, não foi obtida identificação por essa análise, devido a baixa qualidade dos espectros (ANEXO 2 ), mesmo após concentração da amostra de peptídeos.

```

1 MMLILSILSI IAFAAASPVP SIDENIRVLE HRAVTVTTQD LSNFRFYLQH
51 ADAAYCNFNT AVGKPVHCGA GNCPDVEKDS AIVVGSVVGT KTGIGAYVAT
101 DNARKEIVVS VRGSINVRNW ITNFNFGQKT CDLVAGCGVH TGFLEAWEEV
151 AANIKA AVSA AKTANPTFKF VVTGHS LGGA VATVAAAYLR KDGFPEDLYT
201 YGSPRVGNDF FANFVTQQTG AEYRVTHGDD PVPRLPPIVF GYRHTSPEYW
251 LDGGPLDKDY TVSEIKVCDG IANVMCNGGT IGLDILAHIT YFQSMATCAP
301 IAIPWKR DMS DEELDKKLTQ YSEMDQEFVK QMT

```

FIGURA 11 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA LIPASE DE *Nectria haematococca* (FORMA SEXUADA DA ESPÉCIE *Fusarium solani*)

Em destaque, os peptídeos da banda de aproximadamente 33,4 kDa, identificados pela espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF), equivalentes a 21% do total de 333 resíduos de aminoácidos.

Como já relatado, o gênero *Fusarium* é conhecido pela produção de cutinases que em geral têm baixa massa molecular (cerca de 22 kDa). Por isso, a possível presença dessa enzima na banda de 63,2 kDa, em forma de agregado, foi verificada através de uma análise *in silico*. As massas dos peptídeos, obtidos a partir da digestão da proteína com tripsina, foram comparadas àquelas obtidas pela digestão *in silico* de cutinases de *Fusarium*, utilizando o software PeptideCutter. Porém, não foi observada semelhança entre essas massas, sinalizando assim, que a proteína contida na banda de 63,2 kDa provavelmente também não se trata de uma cutinase.

## 5.4 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Fusarium solani*

### 5.4.1 Cinética de Imobilização

A cinética de imobilização foi realizada com a finalidade de determinar o melhor suporte para a imobilização de LFS, bem como o tempo necessário para que houvesse a máxima eficiência de imobilização (E), que consiste na razão entre a atividade residual inicial e final no sobrenadante, frente à reação de hidrólise da tricaprilina em meio aquoso pelo método titulométrico (pH-Stat). A fim de avaliar e comparar o comportamento de LFS em ambos os suportes, foi utilizada a razão proteína/suporte de  $10 \text{ mg g}^{-1}$ . Esta proporção definida com base no trabalho de Madalozzo (2012) e de Poppe *et al.* (2013), que utilizaram o suporte Accurel MP-1000 e Immobead-150 nesta condição, respectivamente.

Observou-se uma melhor eficiência de imobilização ( $E_i=86\%$ ) para o suporte Immobead-150 após 24 h; já para Accurel MP-1000,  $E_i$  foi de apenas 15% no mesmo tempo de incubação (FIGURA 12). Ressalta-se que os valores de eficiência indicam apenas que houve o desaparecimento da atividade no sobrenadante após a imobilização, mas não mostram que a enzima esteja ativa no suporte. Para isso, após a imobilização, determinou-se a atividade de hidrólise dos preparados enzimáticos imobilizados.

No caso do Accurel MP-1000, a determinação da atividade hidrolítica seria ideal que ocorresse em meio orgânico, pois previne a dessorção da enzima ao meio reacional (BARON *et al.*, 2005). Porém, um ensaio prévio mostrou que a hidrólise em meio orgânico com o suporte Immobead-150, tendo o *n*-hexano como solvente, não é reproduzível. Isso acontece em decorrência da (1) formação de agregados de suporte e (2) permanência dele na fase aquosa no meio reacional (2% v/v), devido à hidrofobicidade do meio e ao caráter hidrofílico do Immobead-150. Por isso, a verificação da atividade de LFS-Imm (lipase de *F. solani* imobilizada em Immobead-150) e LFS-Acc (lipase de *F. solani* imobilizada em Accurel MP-1000) foi realizada em meio aquoso utilizando o método titulométrico (pH-Stat). Esses dados estão apresentados na TABELA 5.

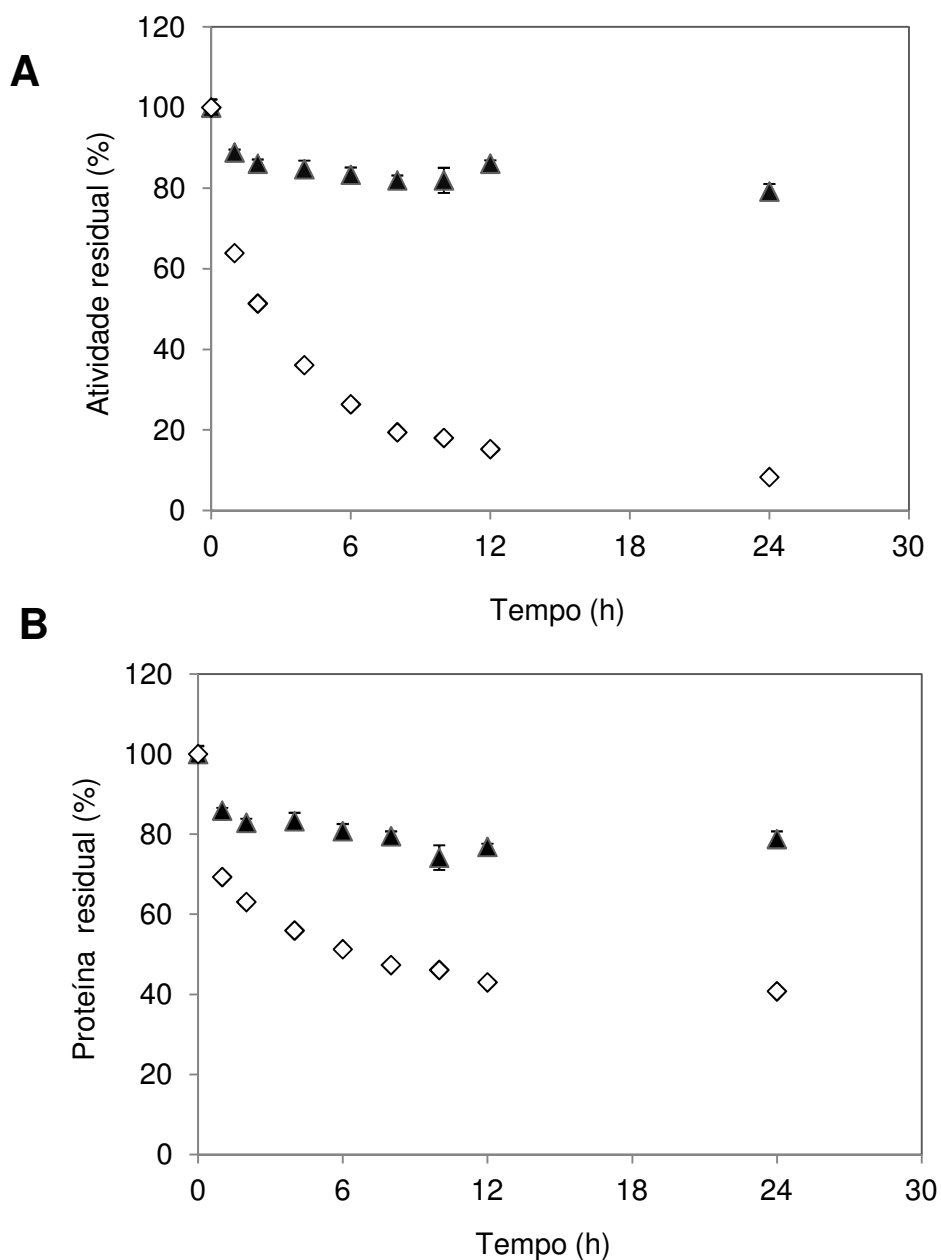


FIGURA 12 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Fusarium solani* EM TERMOS DE (A) ATIVIDADE RESIDUAL (%) E (B) CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NO SOBRENADANTE DA SOLUÇÃO OFERECIDA PARA IMOBILIZAÇÃO

(▲) Accurel MP-1000; (◊) Immobead-150. Em ambos os suportes a razão proteína/suporte foi de  $10 \text{ mg g}^{-1}$ . A atividade residual foi determinada pelo método titulométrico (pH-Stat) utilizando tricaprilina como substrato.

Nota-se que a atividade observada, ou seja, aquela obtida pelo método titulométrico, foi maior para LFS-Imm do que para LFS-Acc, o que se deve provavelmente à maior quantidade de LFS ligada ao suporte, dada pelo valor



de  $E_i$  (TABELA 5). A atividade teórica de LFS imobilizada foi calculada relacionando a quantidade de proteína ligada no suporte e a atividade dessas proteínas quando presentes no extrato bruto enzimático. Este parâmetro foi utilizado para a obtenção do valor de retenção de atividade, onde  $R=100\%$  indica que a atividade da lipase, presente no extrato bruto, foi mantida após a imobilização. Assim, observa-se que LFS foi desativada quando imobilizada em Accurel MP-1000, com retenção de atividade de apenas 33%. Já quando imobilizada em Immobead-150, LFS teve  $R=183\%$ , ou seja, sua atividade aumentada em 83% após a imobilização.

Devido ao melhor desempenho, Immobead-150 foi escolhido como suporte para a imobilização de LFS e caracterização da lipase imobilizada, sendo que as imobilizações subsequentes ocorreram *overnight*, por não haver aumento considerável na imobilização após 12 h.

TABELA 5 – PARÂMETROS AVALIADOS NOS ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Fusarium solani*

Suporte	$E_i^1$ (%)	Atividade Observada <sup>2</sup> (U g <sup>-1</sup> )	Atividade Teórica <sup>3</sup> (U g <sup>-1</sup> )	Retenção de Atividade <sup>4</sup> (%)
Accurel MP-1000	15	75	225	33
Immobead-150	86	330	180	183

[1] Eficiência de imobilização: ( $E_i$ ) calculada pela diferença entre a atividade inicial da lipase *F. solani* e final presente no sobrenadante após ao final da imobilização (24 h).

[2] Atividade observada: determinada em meio aquoso, pelo método titulométrico (pH-Stat), contra tricaprilina.

[3] Atividade teórica: reativa à quantidade de proteína ligada no suporte e a atividade de hidrólise dessas proteínas quando presentes no extrato bruto enzimático.

[4] Retenção de atividade (R): razão entre a atividade observada da lipase imobilizada e a atividade teórica.

Entretanto, para explicar os resultados adequadamente, é necessário levar em conta que Immobead-150 promove a imobilização da enzima por ligações covalentes entre os resíduos de aminoácidos da proteína e os grupos epóxido livres. Esses grupos sofrem ataque nucleofílico de diferentes grupos da superfície da enzima, como amida, tiol e hidroxila, permitindo interações entre a enzima e o suporte. Porém, os resíduos de aminoácidos têm sua reatividade influenciada pelo pH do meio. Os resíduos de lisina, por exemplo,

apresentam um  $pK_a$  de 10,5 e, em pH neutro dificilmente serão reativos (MATEO *et al.*, 2003). Em pH neutro, como utilizado para imobilização de LFS, os grupamentos N-terminais da enzima são os grupos mais reativos. Possivelmente, apenas houve a ligação por essas regiões de LFS ao Immobead-150, não formando ligações multipontuais entre LFS e o suporte, que poderia afetar negativamente a atividade de LFS.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram maior eficiência de imobilização e atividade para LFS são diferentes dos relatados para muitas lipases. Alnoch (2012) observou a maior eficiência de imobilização ( $E_i=90\%$  em 3 h) com o suporte Immobead-150 em relação ao Accurel MP-1000 (87% em 48 h), utilizando a lipase de metagenômica, LipC6G9. Porém, esta lipase apresentou atividade maior quando imobilizada no Accurel MP-1000 ( $160 \text{ U g}^{-1}$ ) do que no Immobead ( $26 \text{ U g}^{-1}$ ). Além do tamanho do poro do Accurel MP 1000 ser mais de 1600 vezes maior do que o do Immobead-150 e não causar impedimento na acomodação de LFS, se sabe que suportes hidrofóbicos, particularmente polipropilenos altamente porosos como o Accurel, são adequados para lipases pois mantêm a sua atividade e, até mesmo, ativam essas enzimas. A maioria das lipases possui um domínio hidrofóbico (*lid*) que cobre o sítio ativo e que interage com o suporte, preservando-a na conformação aberta e permitindo, assim, maior acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (MATEO *et al.*, 2007). Este foi o caso da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 que mostrou ativação quando imobilizada em Accurel EP 100 (polipropileno) em relação a sua forma livre liofilizada e à encapsulada em micelas reversas (SALUM *et al.*, 2008). Baron *et al.* (2011) também observaram ativação desta lipase quando imobilizada em Accurel EP 100 em relação a outros suportes. Neste estudo os autores propuseram uma nova forma de imobilização, chamado "SPIL" (Simultânea Produção e Imobilização de Lipase), na qual a lipase entra em contato com o suporte e é imobilizada durante a produção da enzima. A lipase imobilizada por esse método demonstrou-se mais ativa do que utilizando o método convencional (BARON *et al.*, 2011).

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Fusarium solani* LIVRE E IMOBILIZADA

### 5.5.1 Efeito do pH na Atividade Enzimática

O efeito do pH na atividade de LFS livre e LFS-Imm foi investigado entre pH 4,0 a 11,0 utilizando tricaprilina como substrato. A FIGURA 13 revela que nos extremos de acidez e alcalinidade houve baixa atividade de LFS livre, sendo nula em pH 4,0 e 11,0.

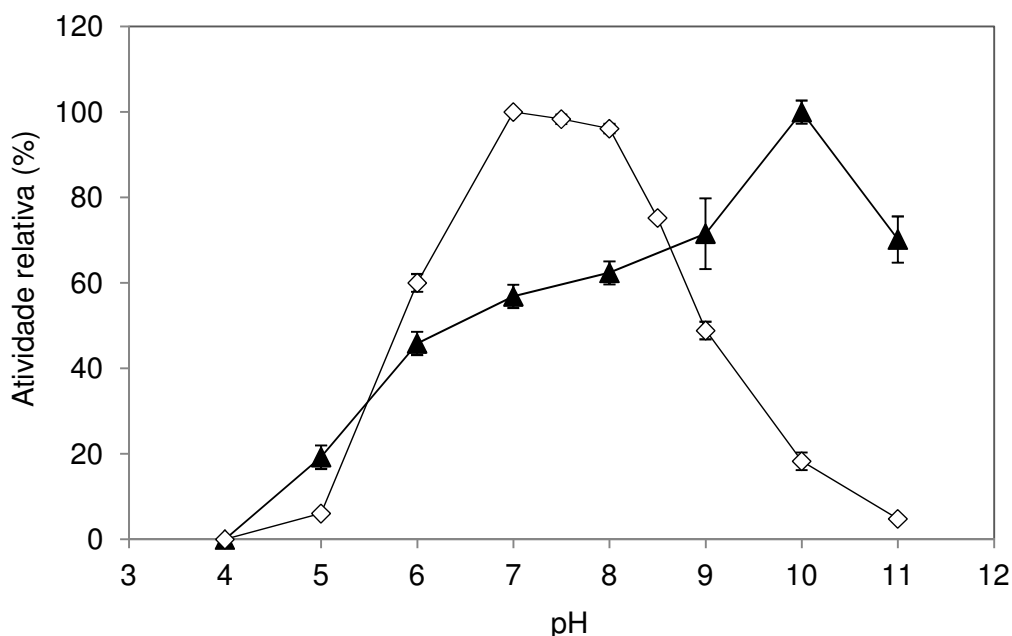


FIGURA 13 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA LIPASE DE *Fusarium solani*, LIVRE (◇) E IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150 (▲)

Condições do ensaio: 35 °C, tricaprilina como substrato. Ensaio realizado em duplicata pelo método titulométrico (pH-Stat) e expressos em termos de percentual, considerando 100% de atividade em pH 7,0 e 10,0, para LFS livre e LFS-Imm, respectivamente.

Embora em pH 7,0 tenha ocorrido o pico de atividade enzimática (72 U mL<sup>-1</sup> ou 720 U mg<sup>-1</sup>), não houve diferença significativa ( $p < 0,5$ ) entre pH 7 a 8. LFS-Imm apresenta menor atividade entre pH 6,0 a 8,0 do que LFS livre. No entanto, nota-se que a máxima atividade de LFS-Imm ocorreu em pH 10,0, onde a forma livre de LFS apresentava menos de 20% de atividade. Isso

indica, portanto, que a imobilização é a razão da alteração observada no perfil de atividade de LFS em função do pH.

O efeito do pH na atividade de lipases imobilizadas é demonstrado pelo deslocamento do valor ótimo de pH para valores mais alcalinos (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; TISCHER; WEDEKIND, 1999). Isso ocorre porque, durante a reação de hidrólise, há a formação e o acúmulo de prótons dentro dos poros do suporte. Um gradiente de prótons é gerado, levando à diminuição do pH no interior dos poros. Porém, hidrolases, como as lipases, atuam em valores de pH próximos de 8,0 (valor ótimo de pH), tendo sua atividade diminuída em meios ácidos. Em pH alcalino, ocorre o transporte dos prótons gerados para o exterior do suporte, gerando, assim, um efeito positivo na atividade da lipase imobilizada. O mesmo não acontece em pH ácido e neutro, que não auxiliam na neutralização do efeito dos prótons e no aumento do pH no interior dos poros (TISCHER; WEDEKIND, 1999). Este fenômeno explica a razão da baixa atividade de LFS-Imm em pH neutro e o aumento em pH 9,0 e 10,0.

Em pH alcalino, foram observados valores máximos de atividade de lipases desta espécie fúngica. Jallouli *et al.* (2012) descreveram máxima atividade em pH alcalino (pH 8,5 a 9,0) para lipase de *F. solani*, assim como que Liu *et al.* (2009) para lipase da cepa *F. solani* N4-2, atingindo cerca de 1500 e 6000 U mg<sup>-1</sup>, respectivamente. O pH ideal encontrado para da lipase de *F. solani* FS1 (pH 8,5), onde a máxima atividade foi de 10 U mL<sup>-1</sup> (MAIA *et al.*, 1999). Já a lipase de outra espécie desse gênero, *F. heterosporum*, exibiu atividade máxima em condições mais ácidas (pH 5,5 e 6,0), porém, os valores de atividades não foram apresentados pelos autores (SHIMADA *et al.*, 1993).

### 5.5.2 Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática

O ensaio da influência da temperatura na atividade de hidrólise de LFS e LFS-Imm foi realizado na melhor condição de substrato (tricaprilina) e de pH (7,5), obtida nos ensaios anteriores. LFS livre apresentou altas atividades entre 25 a 35 °C, com um máximo em 35 °C (84 U mL<sup>-1</sup> ou 840 U mg<sup>-1</sup>) (FIGURA

14). Em 40 °C, LFS ainda apresenta cerca de 74% da atividade máxima, decaindo consideravelmente acima dessa temperatura, sendo que, em 50 °C, sua atividade é praticamente nula. Já para LFS-Imm, o aumento da temperatura favoreceu, também, o aumento da atividade enzimática, decaindo apenas em temperaturas acima de 50 °C.

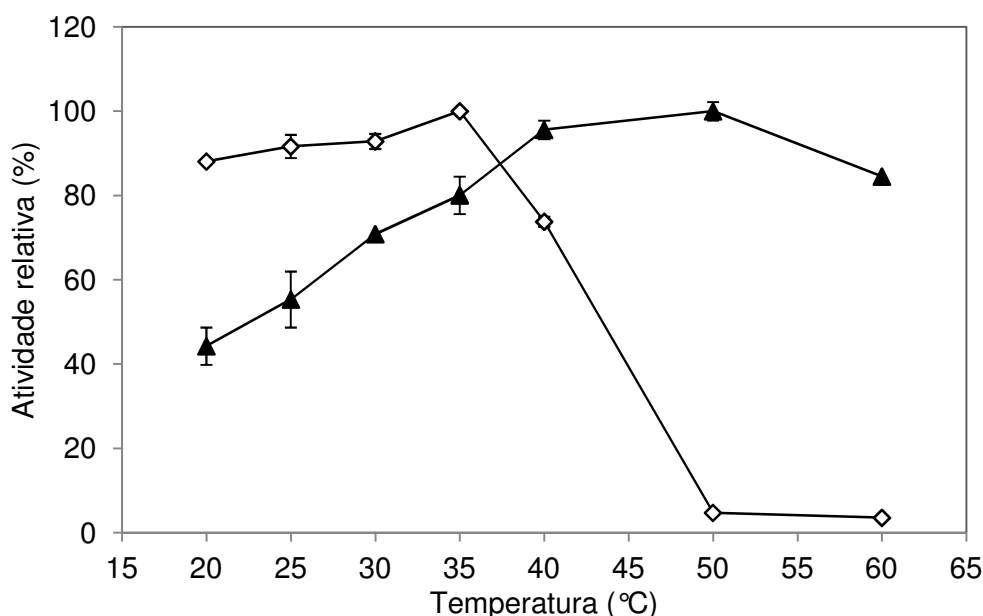


FIGURA 14 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA LIPASE DE *Fusarium solani*, NA SUA FORMA LIVRE (◇) E IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150 (▲)

Condições do ensaio: pH 7,5 e tricaprilina como substrato. Ensaio realizado em duplicata pelo método titulométrico (pH-Stat).

A explicação para o efeito da temperatura na atividade de ambas, LFS e LFS-imm, está no fato de que, aumentando a temperatura, aumenta-se também a velocidade de reação por unidade de enzima. Porém, também eleva a taxa de desnaturação térmica da lipase, que ao longo do tempo, reduz a quantidade de enzima ativa (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). Além disso, deve-se ressaltar que a diferença observada entre a máxima atividade de LFS livre e de LFS-imm é consequência da imobilização, já que as mesmas condições reacionais foram utilizadas para ambos os preparados enzimáticos. A ligação covalente entre a enzima e o suporte evita a quebra das interações responsáveis pela conformação ativa da enzima e minimiza, assim, o efeito da

temperatura na diminuição da atividade enzimática (GONÇALVES *et al.*, 1997; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996).

A máxima atividade de lipase para outras cepas desta espécie foi descrita entre 30 a 37 °C, sendo expressas tanto em atividade volumétrica (U mL<sup>-1</sup>), quanto em atividade específica (U mg<sup>-1</sup>). A lipase de *F. solani* FS1 apresentou máxima atividade em 30 °C, com aproximadamente 6 U mL<sup>-1</sup> (MAIA *et al.*, 1999). Nesta temperatura, a lipase produzida pela cepa *F. solani* N4-2 atingiu sua máxima atividade (6000 U mg<sup>-1</sup>), após purificação (LIU *et al.*, 2009). A lipase de *F. solani* descrita por Jallouli *et al.* (2012), alcançou em 37 °C e aproximadamente 1500 U mg<sup>-1</sup>, o pico de atividade dessa enzima (JALLOULI *et al.*, 2012). A mesma temperatura favoreceu a máxima atividade da lipase de *F. globulosum*, de apenas 4 U mL<sup>-1</sup> (GULATI *et al.*, 2005) .

### 5.5.3 Estabilidade ao pH

A estabilidade ao pH foi determinada pela incubação de LFS livre e de LFS-Imm em diferentes tampões, abrangendo a faixa entre pH 4 a 10. A atividade residual, após 2 h a 4 °C, foi determinada contra tricaprilina pelo método titulométrico (pH-Stat). Na FIGURA 15, observa-se que, tanto LFS livre quanto LFS-Imm são estáveis em ampla faixa de pH, mantendo de 80 a 100% da atividade entre os valores de pH 4,0 a pH 9,0, quando incubadas por 2 h, a 4 °C.

A diferença mais importante, está em pH 10,0: enquanto a estabilidade de LFS livre decaiu cerca de 60%, a estabilidade de LFS-Imm foi aumentada em aproximadamente 20%. Esse fenômeno, também ocorreu no ensaio de atividade em diferentes valores de pH (item 5.5.1), e pode estar relacionado ao acúmulo de prótons, formados durante a hidrólise, no interior dos poros. Em valores de pH mais alcalinos, o efeito desses prótons é neutralizado, mantendo assim, o pH ideal para a enzima no interior dos poros (TISCHER; WEDEKIND, 1999).

A lipase de *F. solani* FS1 manteve apenas 40%, após incubação a 25 °C por 2 h entre pH de 6,4-8,8 (MAIA *et al.*, 1999). Outro estudo mostrou que a

lipase dessa espécie fúngica permaneceu estável em meio alcalino (pH 8,0 a 11,0), com 76% de sua atividade inicial após pré-incubação a 30 °C por 1 h. Segundo os autores, esse fato não é comum à essa lipase e se deve ao fato do fungo *F. solani* N4-2 ter sido isolado de um lago alcalino (pH 9,6) e ser considerado um alcalófilo (LIU *et al.*, 2009). Já a lipase de *F. oxysporum* se mostrou mais estável em pH 7,0 a 9,0, sendo que em pH 11 manteve cerca de 45% da atividade após 24 h de incubação a 4 °C (PRAZERES; CRUZ; PASTORE, 2006).

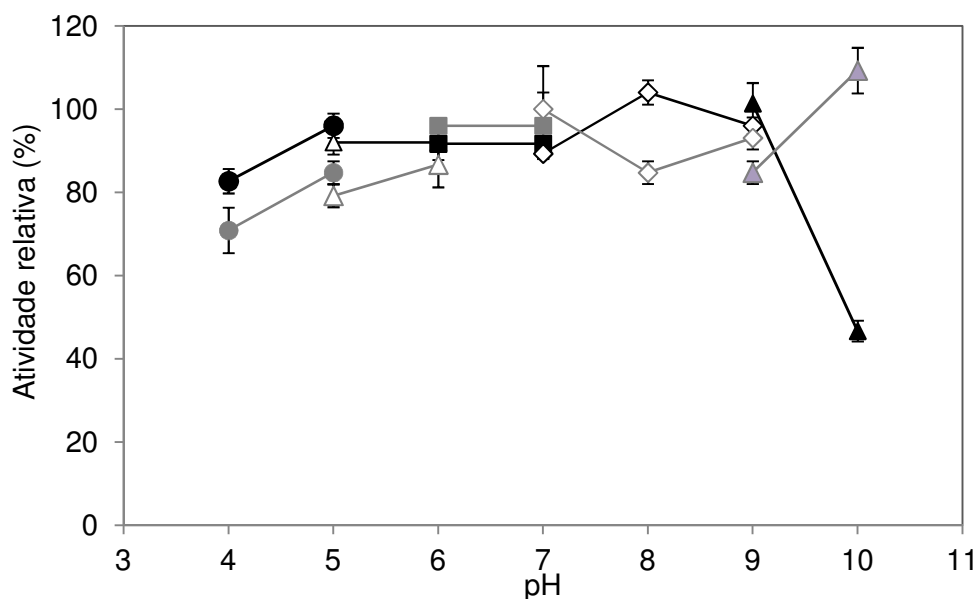


FIGURA 15 - ESTABILIDADE AO pH DA LIPASE DE *Fusarium solani* LIVRE (preto) E IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150 (cinza)

Tampão acetato (●), citrato (Δ), HEPES (■), Tris-HCl (◇) e glicina (▲). Atividades residuais foram determinadas pelo método titulométrico (pH-Stat), com tricaprilina como substrato. A lipase livre e imobilizada, incubada (sem tampão) a 4 °C por 2 h, foi utilizada como controle.

Em estudos do pH há, normalmente, uma correlação entre o perfil observado para seu efeito na atividade e na estabilidade de lipases. No entanto, isso não ocorreu para LFS, já que sua atividade é praticamente nula em pH 4,0 e 5,0 (FIGURA 13) e, ainda assim, LFS é estável em tampões ácidos. Isto provavelmente se deve ao fato que, na determinação da atividade, a lipase está sofrendo alterações no seu estado de protonação durante o ensaio, enquanto que, nos ensaios de estabilidade, a enzima é incubada em um determinado pH e depois é submetida a um meio com pH no qual a sua

atividade é ótima, neste caso, pH 7,5. É provável, assim, que LFS volte ao seu estado de protonação de maior atividade, mesmo após incubação em valores de pH nos quais não apresenta atividade.

Os mecanismos pelos quais os tampões podem causar a estabilização da proteína (ou desestabilização) são complexos e não são ainda bem compreendidos. Entre as razões está, por exemplo, o efeito da ligação de metal ou substrato mediada por tampões ou pela própria atuação deles como pseudo-substratos. A instabilidade conformacional gerada não consiste apenas em desdobramento, agregação ou desnaturação da proteína, mas também às mudanças sutis em domínios específicos da proteína (UGWU; APTE, 2004).

#### 5.5.4 Estabilidade à Temperatura

A estabilidade à temperatura de LFS livre e de LFS-Imm foi avaliada ao longo de 48 h, através da determinação da atividade enzimática relativa, pelo método titulométrico (pH-Stat), usando tricarpilina como substrato. Conforme observado na FIGURA 16, LFS-Imm é mais estável à temperatura do que LFS livre.

A 30 e 35 °C, nota-se uma diferença de cerca de 20% na atividade relativa final de LFS livre e de LFS-Imm. Maiores temperaturas evidenciam ainda mais o decaimento da estabilidade de LFS livre que, em apenas 3 h, perde aproximadamente 50% da sua atividade quando incubada a 40 °C. A partir dessa temperatura, houve perda total da atividade de LFS livre em 24 h, o que não ocorre para a enzima imobilizada que, após 48 h, permanece com cerca de 35% e 20 % de sua atividade em 40 e 45 °C, respectivamente.

Estabilidade em altas temperaturas não foi relatada para lipases de *F. solani* e também não existem outros estudos que descrevam a caracterização da lipase de *F. solani* imobilizada para comparação. Em relação à sua forma livre, Maia *et al.* (1999) notaram boa estabilidade em 25 a 30 °C para lipase de *F. solani* FS1, com perda significativa da estabilidade com incubação por 1 h em temperaturas elevadas (50-60 °C). A maior termoestabilidade da lipase de *F. solani* N4-2 foi entre 30, 40 e 50 °C, temperaturas nas quais não houve



diferença significativa e onde a lipase manteve cerca de 90% da atividade após 2 h de incubação (LIU *et al.*, 2009).

Assim como a atividade enzimática, a estabilidade da enzima à temperatura também é aumentada pela imobilização, pelas razões já citadas acima, que se referem à manutenção da estrutura ativa da enzima pela ligação entre enzima e suporte (GONÇALVES *et al.*, 1997; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). Maior estabilidade de lipase imobilizada em Immobead-150, em relação à enzima livre também foi relatada por Matte *et al.* (2014), Poppe *et al.* (2013), Knezevic *et al.* (2006) e Mateo *et al.* (2000).

Para o suporte Accurel também existem relatos de aumento de estabilidade em relação à enzima livre. A lipase do fungo de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Accurel MP-1000 mostrou-se mais estável do que a forma livre, permanecendo com 77% de sua atividade a 40 °C por 24 h (MADALOZZO *et al.*, 2011). Comportamento semelhante foi relatado para a lipase de origem metagenômica, LipC6G9. Quando imobilizada em Accurel MP 1000, essa enzima manteve 100% e 70% de sua atividade após incubação por 8 h a 30 °C e a 40 °C, respectivamente. Já a enzima livre perde aproximadamente 50% da sua atividade em 8 h de incubação a 50 °C (ALNOCH, 2013).

O aumento da estabilidade à temperatura após a imobilização era esperado nesse ensaio, devido aos extensivos relatos na literatura. Observa-se, contudo, que LFS mesmo após a imobilização, não apresenta atividade e estabilidade para aplicação em reações com temperaturas acima de 35 °C. Definiu-se, dessa forma, seu uso em reações a 30 e 35 °C, considerando que, a 35 °C, LFS-Imm permanece com 88% de atividade residual após 8 h. Além disso, o aumento da temperatura favorece a velocidade de reações e a estabilidade térmica é geralmente maior na presença do substrato, isso porque, a ligação com o substrato estabiliza a estrutura tridimensional da enzima (CORNISH-BOWDEN, 2012), diferentemente do que ocorre nesse ensaio onde o substrato é ausente.

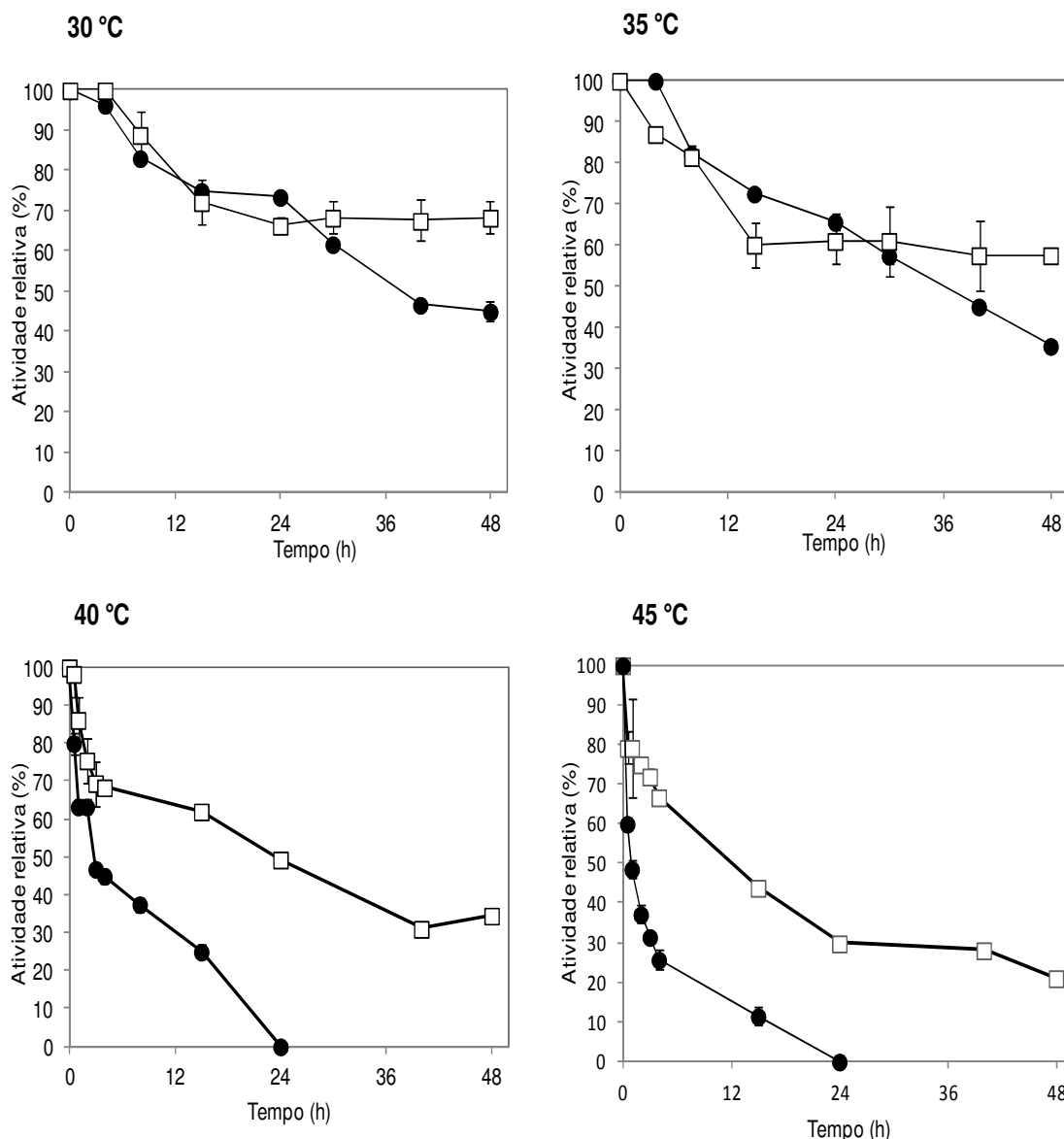


FIGURA 16 – ESTABILIDADE À TEMPERATURA DA LIPASE DE *Fusarium solani* LIVRE (●) E IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150 (□)

Atividades residuais foram determinadas pelo método titulométrico (pH-Stat), tendo como controle a incubação da lipase na forma livre e imobilizada (com tampão fosfato pH 7,0) a 4 °C.

### 5.5.5 Estabilidade em Solventes Orgânicos

Esta etapa visou selecionar meios reacionais que pudessem ser utilizados com LFS. Foi determinada a estabilidade em solventes orgânicos apenas de LFS na sua forma imobilizada já que LFS livre (liofilizada) não

apresentou atividade de esterificação. Além disso, tendo em vista aplicações dessa lipase em biocatálise, é mais recomendada a utilização de enzimas imobilizadas que, normalmente, apresentam maior estabilidade às condições de reação. Para estes ensaios, LFS-Imm foi incubada em solventes orgânicos abrangendo ampla faixa de log P (-1,35 a 4,0) por 8 h, a 35 °C. As atividades residuais de esterificação foram determinadas a partir das velocidades iniciais da reação e calculadas em relação ao controle, realizado sem pré-incubação (FIGURA 17).

LFS-Imm mostrou-se estável em solventes polares como DMSO (log P -1,4), etanol (log P -0,3) e *n*-propanol (log P -0,25), onde permaneceu com aproximadamente 85% de sua atividade. Já para a acetona (log P -0,2) não houve perda de atividade, o que é incomum para lipases em solventes hidrofílicos. Em destaque, está o efeito dos solventes apolares na atividade de LFS-Imm, que foi ativada em presença de tolueno (log P 2,5) e *n*-heptano (log P 4), sendo sua atividade relativa de 157% e 142%, respectivamente.

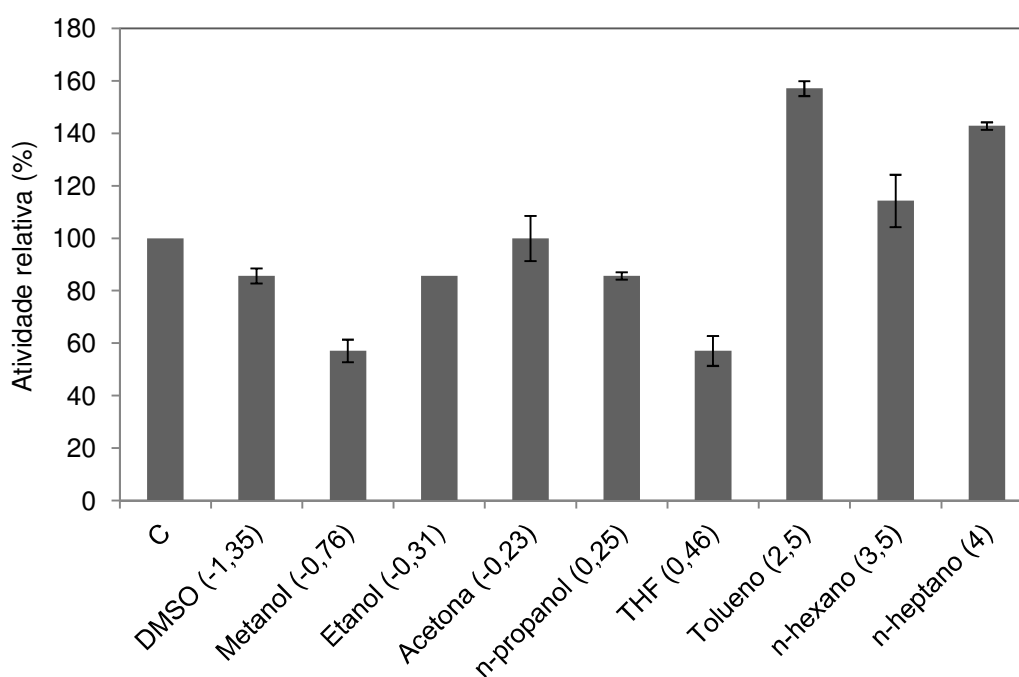


FIGURA 17 – ESTABILIDADE EM SOLVENTES ORGÂNICOS DA LIPASE DE *Fusarium solani* IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150

Condições de ensaio: incubação de 50 mg da enzima imobilizada em 400 µL dos solventes escolhidos por 8 h, a 200 rpm. Reação padrão de esterificação: ácido oleico (70 mmol. L<sup>-1</sup>), etanol (210 mmol L<sup>-1</sup>), lipase imobilizada (50 mg), *n*-hexano (2,5 mL), 35 °C, 200 rpm. Controle: enzima imobilizada sem incubação em solvente. Os valores de Log P estão expostos ao lado de cada respectivo solvente, sendo “C”, o controle.

Em relação a outras lipases fúngicas desse gênero, é relatado um aumento na atividade relativa da lipase livre de *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* pela incubação em *n*-hexano, o que foi ainda mais acentuado em maior concentração do solvente. Já em solventes orgânicos hidrofílicos em concentrações superiores a 25% (v/v), a atividade dessa enzima foi nula, quando incubada por 1 h, em temperatura ambiente (RAPP, 1995). A atividade relativa da lipase de *F. solani* FS1 aumentou consideravelmente pela incubação em *n*-hexano e tolueno, atingindo seu pico na concentração de 50% dos solventes (v/v), após incubação por 1 h, em agitação, a 25 °C. Etilacetato e hexadecano estimularam a atividade da lipase em concentrações de solvente acima de 20 % (v/v) (MAIA *et al.*, 2001).

As lipases variam em sua estabilidade a solventes orgânicos. Em geral, a estabilidade das lipase é menor em solventes hidrofílico ( $-2,5 < \log P < 0$ ), como a acetona e os éteres, do que em solventes hidrofóbicos ( $2 < \log P < 4$ ), como os alcanos ou haloalcanos. Solventes orgânicos hidrofílicos atuam removendo a camada de água em torno da enzima, o que provoca uma distorção drástica da sua conformação, levando à inativação da enzima (KRIEGER *et al.*, 2004; LAANE *et al.*, 1987; ZAKS; KLIBANOV, 1985). Porém, mesmo com pouca quantidade absoluta de água na camada de solvatação, a estrutura da enzima pode ser mantida, garantindo seu funcionamento em um meio orgânico quase anidro (ZAKS; KLIBANOV, 1985). Embora essa seja a hipótese mais aceita, outra explicação se baseia na atuação de solventes orgânicos como inibidores competitivos através de interações específicas com enzimas, o que poderia levar a mudanças na cinética de reação e na especificidade ao substrato (OGINO; ISHIKAWA, 2001).

Em relação aos resultados obtidos, é importante ressaltar que LFS livre (liofilizada) não apresentou atividade de esterificação, utilizando *n*-hexano como solvente sendo, assim, impossível a aplicação da lipase na sua forma livre em reações de síntese. O bom desempenho de LFS-Imm em solventes orgânicos é resultante do processo de imobilização, que já é conhecido na literatura pelo aumento da estabilidade de lipases em meio orgânico (OGINO; ISHIKAWA, 2001). Além disso, a estabilidade de enzimas bacterianas e fúngicas em solventes orgânicos hidrofílicos é rara (KRIEGER *et al.*, 2004), o que torna essa lipase ainda mais atrativa.

### 5.5.6 Determinação da Regioespecificidade

Como exposto anteriormente, as lipases podem ser classificadas de acordo com sua especificidade posicional (regioespecificidade) em 1,3 específicas, quando hidrolisam a ligação éster nas posições *sn* 1 e *sn* 3 dos triacilgliceróis, lipases 2-específicas, quando hidrolisam a ligação éster nas posições *sn* 2 dos triacilgliceróis, e lipases não específicas, que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de modo não específico ou aleatório (SUGIHARA *et al.*, 1992). A importância da identidade regioespecífica das lipases está no seu potencial de aplicação como catalisadores em reações de interesterificação, para produção de lipídios estruturados. Neste caso, essas enzimas atuam realizando a modificação e substituição de um ou mais ácidos graxos em posições específicas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

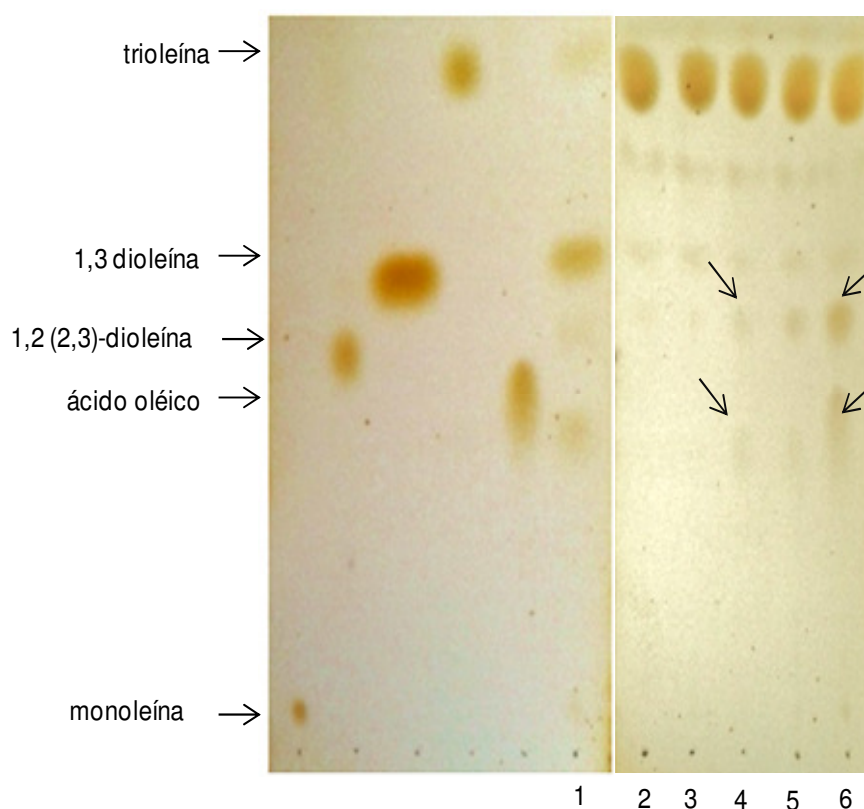


FIGURA 18 - DETERMINAÇÃO DA REGIOESPECIFICIDADE DA LIPASE DE *Fusarium solani* LIVRE E IMOBILIZADA, ATRAVÉS DE ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA TRIOLEÍNA POR CCD

Linha 1: mistura dos padrões; linha 2: tempo 0 de reação/meio reacional; linha 3: LFS livre em 1 h; linha 4: LFS livre em 4 h; linha 5: LFS-Imm em 1 h; linha 6: LFS-Imm em 4 h de reação.

A determinação da regioespecificidade de LFS livre e de LFS-Imm foi realizada através da análise dos produtos da reação de hidrólise da trioleína em meio orgânico por cromatografia em camada delgada (CCD). Nesses ensaios foram utilizados como padrões monoleína, ácido oleico, 1,2 (2,3)-dioleína, 1,3 dioleína e trioleína. Na FIGURA 18, nota-se a presença de ácido oleico (produto majoritário) e 1,2 (2,3)-dioleína e trioleína. Porém, a ausência de 1,3 dioleína como produto da reação indica que a lipase não é capaz de hidrolisar a ligação éster na posição *sn*-2 da trioleína.

Portanto, a lipase contida no extrato bruto do fungo *Fusarium solani*, utilizado neste trabalho, pode ser classificada como 1,3-específica. Esse resultado é corroborado por Jallouli *et al.* (2013), cujo estudo é recente e o único a caracterizar a regioespecificidade da lipase da espécie *F. solani*. Pertencente ao mesmo gênero, a lipase de *F. heterosporum* também foi descrita como 1,3 regioespecífica (NAGAO *et al.*, 2001).

#### 5.5.7 Determinação da Entantiosseletividade

As lipases podem ser seletivas para um dos enantiômeros (*R* ou *S*) de uma mistura racêmica. Esta propriedade permite a aplicação dessas enzimas na indústria farmacêutica, onde são requeridos compostos enantiomericamente puros. Para determinar a entantiosseletividade de LFS-Imm, realizou-se a reação de transesterificação do álcool (*R,S*) 1-fenil-1-etanol, considerado um composto padrão para a determinação da entantiosseletividade de lipases (KAZLAUKAS *et al.*, 1991).

A entantiosseletividade de LFS livre não foi determinada devido à ausência de atividade de esterificação desta lipase. A determinação da entantiosseletividade de LFS-Imm (*R* ou *S*) foi feita indiretamente por comparação com o perfil cromatográfico do meio reacional obtido com a lipase comercial de *Candida antarctica* B (CALB, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), uma vez que ela possui entantiosseletividade para o isômero *R*, como descrito na literatura (OVERMEYER *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 1998).

Em análise qualitativa, a FIGURA 19 (B) mostra que LFS-Imm catalisou a reação de acilação do (*R,S*) 1-fenil-1-etanol seletivamente, tendo sua preferência para o enantiômero *R*, uma vez que o perfil cromatográfico foi semelhante ao apresentado para a reação catalisada por CALB (FIGURA 19 A).

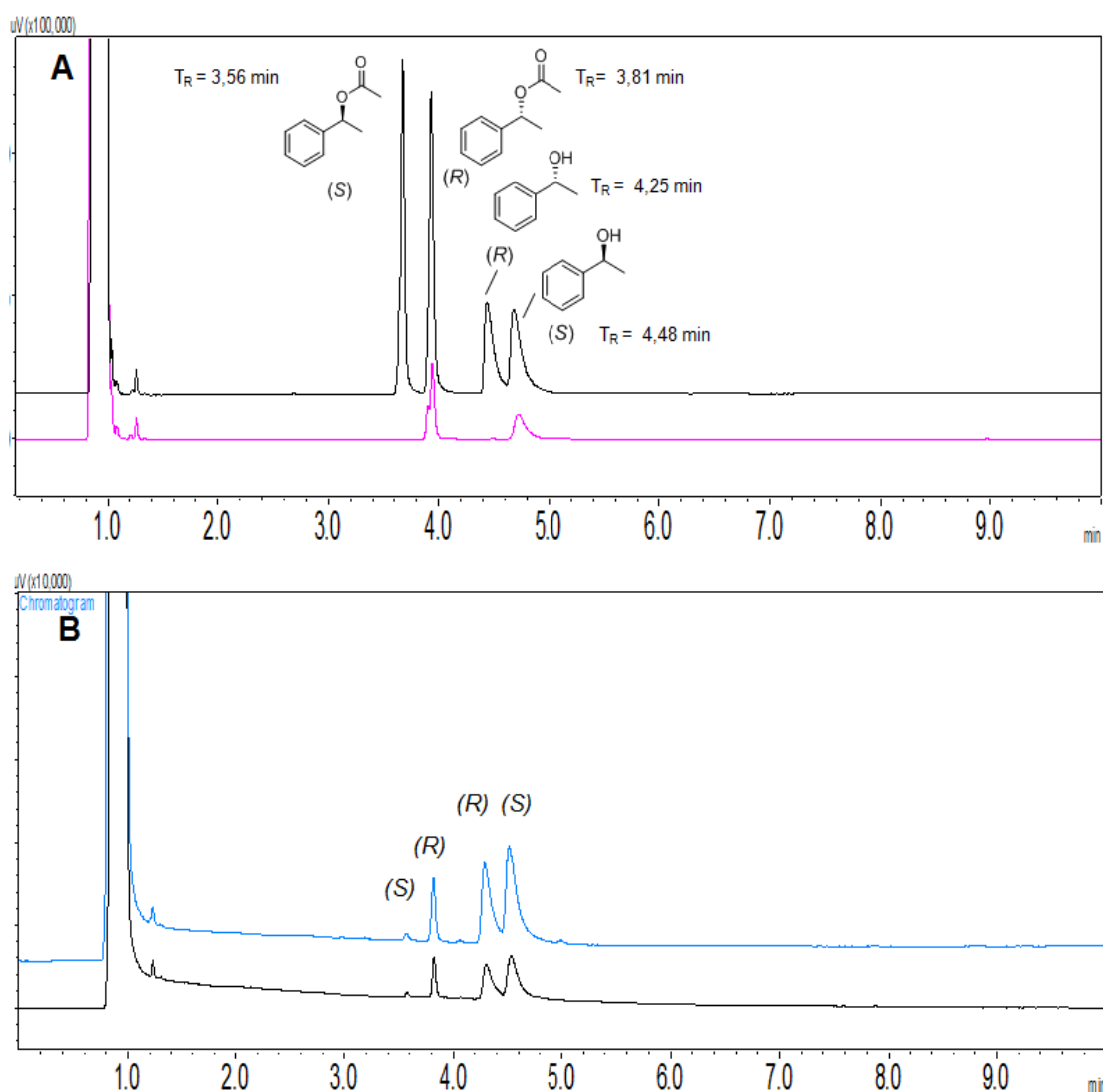


FIGURA 19 - DETERMINAÇÃO DA ENANTIOSELETIVIDADE DA LIPASE DE *Fusarium solani* IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150

Em (A) padrão (*R,S*) 1-fenil-1-etanol e (*R,S*) acetato de 1-fenil etila (preto) e padrão de enantiosseletividade: reação catalisada com a lipase de CalB (rosa). Em (B) resolução cinética do (*R,S*) 1-fenil-1-etanol catalisada pela lipase de *F. solani* imobilizada em ImmoBead-150, em 24 (preto) e 48 h de reação (azul). Coluna com fase estacionária quiral ( $\beta$ -ciclodextrina), temperatura do detector 220 °C, gás de arraste (N<sub>2</sub>), temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min<sup>-1</sup>. Condições reacionais: 1 mL de *n*-hexano, 0,1 mmol de 1-fenil-1-etanol, 0,4 mmol de acetato de isopropenila, 50 mg de enzima imobilizada, 200 rpm, 35 °C. Apenas para análise qualitativa e visual, a intensidade dos picos foi desconsiderada nesta figura.

Os parâmetros obtidos nos tempos de 24 e 48 h de conversão (c), de excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s$ ) e do produto ( $ee_p$ ) e razão enantiomérica ( $E$ ) estão apresentados na TABELA 6. A reação de transesterificação do 1-fenil-1-etanol catalisada por LFS-Imm apresentou baixa conversão (15%) em 48 h, sendo desejáveis valores próximos a 50%. O  $ee_p$  mostra que, do total de substrato convertido, houve um excesso de 80% de um dos enantiômeros, considerando que para um composto enantiomericamente puro, o valor de  $ee$  deve ser de 1 ou 100%, enquanto que para uma mistura racêmica, esse valor é sempre zero. A preferência de LFS-Imm para o enantiômero  $R$  é confirmada pela percentagem relativa de éster formado, que foi majoritariamente  $R$  (90%).

Porém, o valor da razão enantiomérica ( $E$ , parâmetro que indica a enantiosseletividade da enzima) foi baixo, sendo esperado valor de  $E$  de no mínimo 20, para uma resolução cinética ser considerada aceitável. Esse resultado é decorrente da baixa conversão demonstrada, já que a equação utilizada para a obtenção do parâmetro  $E$  inclui os valores obtidos de conversão.

TABELA 6 - RESOLUÇÃO DE (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO A LIPASE DE *Fusarium solani* IMOBILIZADA EM IMMOBEAD-150.

	Tempo	c (%)	$ee_s$ (%)	$ee_p$ (%)	% relativa éster	$E$	Enantiopreferência
1-fenil-1-etanol	24 h	14	13	80	90 ( $R$ )	10	$R$
					10 ( $S$ )		
	48 h	15	14	80	90 ( $R$ )	10	$R$
					10 ( $S$ )		

(c) conversão do éster; ( $ee_s$ ) excesso enantiomérico do substrato; ( $ee_p$ ) excesso enantiomérico do produto; ( $E$ ) razão enantiomérica.

Existem alguns fatores que afetam a atividade e seletividade de reações catalisadas por lipases, incluindo o agente doador de acila, a temperatura, o solvente e o suporte, em caso de imobilização (AHMED; KELLY; GHANEM, 2012; SABBANI *et al.*, 2006). Dessa forma, é necessária a otimização dessas variáveis para aplicação da LFS-Imm em resolução cinética



e obtenção de um enantiômero com alto grau de pureza. Enzimas utilizadas em resolução geralmente apresentam um valor de  $E$  de 50 ou maior, sendo  $E$  maior que 100 considerado excelente (SUNNA *et al.*, 2002).

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, pela produção, caracterização e comparação das propriedades da lipase de *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02, livre e imobilizada em Immobead-150, permitem as seguintes conclusões:

### (I) Produção e Caracterização da Lipase Livre

A lipase presente no extrato enzimático bruto de *F. solani* (LFS) possui massa calculada de 33,4 kDa e identidade com a lipase de *Nectria haematococca* MPVI 77-13-4.

LFS apresenta alta atividade de hidrólise ( $84 \text{ U mL}^{-1}$ ), sendo as condições de máxima atividade  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,5 e tricaprilina como substrato.

LFS é altamente estável ao armazenamento, quando mantida a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  com adição de azida sódica 0,02% (m/v) ao extrato enzimático bruto.

### (II) Imobilização da Lipase

Maior eficiência de imobilização de LFS foi obtida com o suporte Immobead-150, que promove ligações covalentes com a lipase, em relação ao Accurel MP-1000, no qual a imobilização ocorre por adsorção.

LFS imobilizada em Immobead-150 (LFS-Imm) apresenta maior atividade de hidrólise e retenção de atividade do que a imobilizada em Accurel MP-1000 (LFS-Acc).

### (III) Caracterização e Comparação das Propriedades da Lipase Livre e Imobilizada

LFS-Imm apresenta, claramente, maior estabilidade à temperatura do que LFS livre.

A imobilização gerou uma alteração no perfil de atividade e estabilidade em relação ao pH, permitindo a atuação de LFS-Imm em valores alcalinos, especialmente em pH 10,0.

LFS-Imm apresentou alta estabilidade em solventes orgânicos hidrofílicos e foi ativada quando incubada em solventes orgânicos hidrofóbicos por 8 h de incubação a 30 °C e 200 rpm.

Os melhores solventes para essa lipase são tolueno e *n*-heptano, onde, após incubação, LFS-Imm apresentou 157% e 142% de atividade residual, respectivamente. A estabilidade de LFS-Imm a solventes orgânicos é resultado da imobilização, vez que LFS livre liofilizada não apresenta atividade em meio orgânico.

LFS livre e LFS-Imm são 1,3 regioseletivas e LFS-Imm apresenta preferência ao enantiômero *R* em uma mistura racêmica de (*R,S*) 1-*fenil*-1-*etanol*.

Estes resultados sugerem que LFS livre não apresenta características para utilização em síntese orgânica, mas demonstrou potencial de aplicação em reações de hidrólise de triacilglicerol em meio aquoso. Já LFS-Imm apresenta potencial para ser utilizada em meio orgânico, na síntese de ésteres.

## 7. PERSPECTIVAS

Os resultados relatados para lipase de *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02, livre e imobilizada em Immobead-150, mostram o potencial dessa lipase em biocatálise, seja para reação de hidrólise quanto de esterificação. Portanto, sugere-se como estudos futuros:

- Reutilização de LFS-Imm em reação de esterificação do ácido oleico.
- A determinação da seletividade frente a diferentes ácidos graxos e alcoóis em meio orgânico, para melhor direcionamento de LFS-Imm em reações de esterificação, bem como a otimização das condições desta reação.
- A aplicação de LFS-Imm em reação de hidrólise em meio orgânico utilizando acetona como solvente e, assim, impedindo a formação de agregados
- Estudo da estabilidade de LFS livre liofilizada a baixas temperaturas (menores que 25 °C), para investigar a possibilidade de aplicá-la em formulações de detergentes.
- Otimização das condições reacionais para a aplicação de LFS-Imm em resolução cinética de misturas racêmicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; KOBAYASHI, M.; HONMA, N.; NAKASAKI, K. Microbial gradation of poly(butylene succinate) by *Fusarium solani* in soil environments. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 2, p. 138–143, 2010.

ADLERCREUTZ, P. Fundamentals of Biocatalysis in Neat Organic Solvents. In: **Organic synthesis with enzymes in nonaqueous media**. GIACOMO CARREA, SERGIO RIVA, Ed(s). Weinheim: Wiley-VCH, p. 3–24, 2008.

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406–36, 2013.

AHMED, M.; KELLY, K.; GHANEM, A. Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. **Tetrahedron**, v. 68, p. 6781-6802, 2012.

ALBERTON, D.; MITCHELL, D. A.; CORDOVA, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; KRIEGER, N. Production of a Fermented Solid Containing Lipases of *Rhizopus microsporus* and Its Application in the Pre-Hydrolysis of a High-Fat Dairy Wastewater. **Food Technol. Biotechnol**, v.48, n.1, p. 28-35, 2010.

AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilization: an equilibrium study of lipases immobilized on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 207-215, 2000.

ALMEIDA, M. C.; R. RUIVO; C. MAIA; L. S. FREIRE; T. CORRÊA DE SAMPAIO; S. BARREIROS. Novozym 435 Activity in Compressed Gases. Water Activity and Temperature Effects. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 6, p. 494-499, 1998.

ALMEIDA, R.V.; ALQUÉRES, S.M.C.; LARENTIS, A.L.; RÖSSLE, S.C.; ALMEIDA, W.I.; CARDOSO, A.M.; BISCH, P.M.; ALVES, T.L.M.; MARTINS, O.B. Cloning, expression, partial characterization and structural modeling of a novel esterase from *Pyrococcus furiosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1128–1136, 2006.

ALNOCH, R.C. **Imobilização e Caracterização de uma Nova Lipase Obtida por Prospecção Metagenômica**. Curitiba, 2012, 113p, (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 2012.

ALVES, L. C. **Seleção de fungos lipolíticos isolados do abacate (*Persea americana* Mill.) produtores de lipases**. 2009. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 951–960, 2007.

ANDRADE, L. H.; BARCELLOS, T. Lipase-catalyzed highly enantioselective kinetic resolution of boron-containing chiral alcohols. **Organic letters**, v. 11, n. 14, p. 3052–5, 2009.

ANDREESCU, S.; BUCUR, B.; MARTY, J.L. Affinity Immobilization of Tagged Enzymes. In: JOSÉ M. GUIBAN, Ed. **Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press Inc., 97-106, 2006.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Lipase catalyzed modification of milkfat. **Biotechnology advances**, v. 16, n. 2, p. 309–41, 1998.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BARON, A. M.; BAROUH; N., BAREA, B., VILLENEUVE, P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. **Fuel**, v. 117, p.458–462, 2014.

BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M.; BAIGORÍ, M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **J Mol Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, p. 35-32, 2005.

BARON, A. M.; ZAGO, E.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, n. 1, p. 19-24, 2011.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and Characterization of Three Distinct Forms of Lipases from *Candida rugosa* Produced in Solid State Fermentation. Brazilian **Archives of Biology and Technology**, v. 44, n.2, p. 213–221, 2001.

BORNSCHEUER, T.U.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, H.S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

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

BRAUN, B.; KLEIN, E. Immobilization of *Candida rugosa* lipase to nylon fibers using its carbohydrate groups as the chemical link. **Biotechnology and Bioengineering**, v.51, p. 327–341, 1996.

BREM, J.; TURCUB, M.C.; PAIZSA, C.; LUNDELLB, K.; TOS, M.; IRIMIEA, F.; KANERVAB, L.T. Immobilization to improve the properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 119–126, 2012.

CAI, L.; GIRAUD, T.; ZHANG, N.; BEGEROW, D.; CAI, G.; SHIVAS, R.G. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, v, 46, n.1, p. 121–133, 2011.

CAMARGO-DE-MORAIS, M.M.; MAIA, M.M.D.; BORBA, F.F.S.; MELO, K.G.; SANTOS, C.M.S.O.; REIS, E.R.A., MORAIS JR, M.A.; LIMA-FILHO, J.L. Oil/mineral-salts medium designed for easy recovery of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 19, p 17–20, 2003.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHMID, R. D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.6, p. 279-285, 1999.

CARTA, G.; GAINER, J. L.; BENTON, A. H. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 1004–1009, 1991.

CARVALHO, C.M. L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL; J.M.S. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.D. SILVA, P.R.; RAMOS, A. P.; ARANDA, D.A.G.; FREIRE, D.M.G. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2010.

CHANDRAN, M. R.; KUMAR, M. R. Studies on cultural, morphological variability in isolates of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. incitant of dry root-rot of Citrus. **Current Biotica**, v. 6, n. 2, p. 152–162, 2012.

CHEN, C.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers. **Journal of American Chemistry Society**, v. 104, p.7294-7299, 1982.

CHIOU, S. H.; WU, W. T.; Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl group. **Biomaterials**, v. 25, p. 197–204, 2004.

**Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB)** - Melbourne Code, Artigo 59. Disponível em: <<http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=art59>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

COLEMAN, J. J. *et al.* The Genome of *Nectria haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 8, 2009.

CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of Enzyme Kinetics**, Wiley-VCH (Ed.), 510p, 2012.

DHEEMAN, D. S.; HENEHAN, G. T. M.; FRÍAS, J. M. Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3373–9, 2011.

DUMESTRE, A.; CHONE, T. PORTAL, J.; GERARD, M.; BERTHELIN, J. Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, 1997.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 263, p. 8-13, 2007.

FERREIRA, A.V.B. **Fungos os primórdios do sexo**. Ciência Hoje, v. 37, n. 218, p. 33 - 41, 2005.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida Antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107-108, p. 23-30, 2005.

GALAL, A. M.; JOHNSON, J. A.; VARRIANO-MARSTON, E. Lactic and volatile (C2-C5) organic acids of *San Francisco* sourdough French bread. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 55, n. 4, p. 461-468, 1978.

GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Solvent-Free Synthesis of Flavour Esters through Immobilized Lipase Mediated Transesterification. **Enzyme Research**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

GE, J.; YAN, M.; LU, D.; ZHANG, M.; LIU, Z. Hyperbranched polymer conjugated lipase with enhanced activity and stability. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36 p. 93–99, 2007.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: a review. **Journal of chromatography. B**, v. 819, n. 1, p. 3–16, 2005.

GLOGAUER, A.; MARTINI, V.P.; FAORO, H.; COUTO, G.H.; SANTOS, M.M.; MONTEIRO, R.A.; MITCHELL, D.A.; SOUZA, E.S.; PEDROSA, F.O.; KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n.54, 2011.

GONÇALVES, A. P. V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e da estabilidade**. Dissertação de mestrado, 58 p. Instituto Superior Técnico Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal, 1999.



GONÇALVES, A. P. V.; LOPES, J. M.; LEMOS, F.; RIBEIRO, F. R.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S. Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 96 ,p. 93-101,1997.

GORDILHO, M. A.; MONTESINOS, J. L; CASAS. C.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÁ, C. Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach. **Chemistry and Physics Lipids**, v. 93, p. 131-142, 1998.

GUIBAN, J.M.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R., FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; HALLING, P.J.; KENNEDY, D.; MIYATA, E.; RE, D. Preparation of new lipases derivatives with high activity–stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 817–824, 2001.

GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K.. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n.1, p. 251–262, 2005.

HABULIN, M.; KNEZ, Z. Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 58, n. 1-4, p. 24-28, 2009.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; SUZUKI, Y.; YOSHIDA, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Preparation and comparative characterization of immobilized *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase for enzymatic biodiesel production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 637–45, 2008.

HANEFELD, U; GARDOSI, L.; MAGNER, B. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453–468, 2009.

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

HAWTHORNE, B.T.; BALL, R.D.; REES-GEORGE, j. Genetic analysis of variation of pathogenicity in *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*) on Cucurbita sp. **Mycal Res**, v. 98, n.10, p.1183-1191, 1994.

HAWTHORNE, B.T.; REES-GEORGE, J.; CROWHURST, R.N. Induction of cutinolytic esterase activity during saprophytic growth of cucurbit pathogens, *Fusarium solani* f. sp. cucurbitae races one and two (*Nectria haematococca* MPI and MPV, respectively). **FEMS Microbiology Letters**, v.194, p.135-141, 2001.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421–430, 2000.

HUANG, Z.M.; ZHANG, Y. Z.; KOTAKI, M.; S. RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 2223–2253, 2003.

IFTIKHAR, T; NIAZ, M.; ALI, E.A.;JABEEN, R.; ABDULLAH, R. Production process of extracellular lipases by *Fusarium* sp. Using agricultural byproducts. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, p. 335–339, 2012.

ISHIDA, K. ALVIANO, D.S.; SILVA,B.G.; GUERRA,C.R.; COSTA, A.S.; NUCCI, M.; ALVIANO, C.S.; ROZENTAL, S. Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 411–416, 2012.

IVANOV, A. E.; SCHNEIDER, M. P. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3 p. 303–309, 1997.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JALLOULI, R.; FENDRI, A.; MECHICHI, T.; GARGOURI, Y.T.; BEZZINE, S. Kinetic Properties of a Novel *Fusarium solani* (phospho) lipase : A Monolayer Study. **Chirality**, v. 38, n. p. 35–38, 2013.

JALLOULI, R.; KHROUF, F.; FENDRI, A.; MECHICHI, T. ; GARGOURI, Y.; BEZZINE, S. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Alkaline (Phospho)lipase from a Newly Isolated *Fusarium solani* Strain. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.168, 2012.

KAISER, P.; RAINA, C.; PARSHAD, R.; JOHRI, S.; VERMA, V.; ANDRABI, K.I.; QAZI, G.N.. A novel esterase from *Bacillus subtilis* (RRL 1789): purification and characterization of the enzyme. **Protein expression and purification**, v. 45, n. 2, p. 262–8, fev. 2006.

KANG, D.; GHO, Y.S.; SUH, M.; KANG, C. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Bull Korean Chem Soc**, v. 23, n.11, p. 1511-1512, 2002.

KANMANI, P.; KARTHIK, S.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. The use of response surface methodology as a statistical tool for media optimization in

lipase production from the dairy effluent isolate *Fusarium solani*. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; BOUAZIZ, I.; BOUFI, S.; do REGO, A. M. B.; GARGOURI, Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: activity and stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. In press. 2008.

KATCHALSKI-KATZIR, K.; KRAEMER, D.M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 157–176, 2000.

KAWAKAMI, K.; TAKAHASHI, R.; SHAKERI, M.; SAKAI, S. Application of a lipase-immobilized silica monolith bioreactor to the production of fatty acid methyl esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 194–197, 2009.

KAZLAUSKAS, R.; WEISSFLOCH, A.N.E.; RAPPAPORT, A.T.; CUCCIA, L.A. A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.

KERÉNYI, Z.; MORETTI, A.; WAALWIJK, C.; OLÁH, B.; HORNOK, L. Mating Type Sequences in Asexually Reproducing *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4419–4423, 2004.

KIM, K.K.; SONG, H.K.; SHIN, D.H.; HWANG, K.Y.; SUH, S.W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 173–185, 1997.

KLIBANOV, A M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends in biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 97–101, 1997.

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 3, p. 269–278, 2006.

KNIGHT, K.; PIMENTEL, M. C. B.; MORAIS, M. M. C.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L.; MAIA, M. M. D. IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Fusarium solani* FS1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 220–222, 2000.

KÖLLER, W.; KOLATTUKUDY, P. E. Mechanism of action of cutinase: chemical modification of the catalytic triad characteristic for serine hydrolases. **Biochemistry**, v. 21, n. 13, p. 3083–90, 1982.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.; LIMA, V.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.

LAANE, S.; BOEREN, K. VOS; C. VEEGER. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.30, p. 81–87, 1987.

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

LAKSHMI, B.S., KANGUEANE, P., ABRAHAM, B., PENNATHUR, G. Effect of vegetable oils on the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM2031). **Lett Appl Microbiol**, v. 29, p. 66–70, 1999.

LEE, W.H.; WHEATLEY, W.H; BENEDICT, W.F.; HUANG, C.M.; LEE, E.Y.H.P. Purification, biochemical characterization, and biological function of human esterase D. **PNAS**, v. 83, n. 18, p. 6790–4, 1986.

LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, 98-102, 2006.

LINK, H.F. Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. Gesellschaft der Naturforschenden Freunde Berlin, Magazin der Neuesten Entdeckungen in der gesammten. **Naturkunde** 3:3–42, 1809.

LIU, R.; JIANG, X.; MOU, H.; GUAN, H.; HWANG, H.; LI, X. A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v.46, n. 3, p. 265-270, 2009.

LIU, Y.; YAN, Q.; YANG, S.; DUA, X.; JIANG, Z. Biochemical characterization of a first fungal esterase from *Rhizomucor miehei* showing high efficiency of ester synthesis. **PloS one**, v. 8, n. 10, 2013.

LONGHI, S.; CABBILLAU, C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1441, n. 2-3, p. 185–96, 23 nov. 1999.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free acids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

LUO, Z.H.; WU, Y.R.; CHOW, R.K.K.; LUO, J.J.; GU, J.D.; VRIJMOED, L.L.P. Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 687–693, 2012.

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

MADALOZZO, A. D. **Síntese de Ésteres Etílicos Utilizando uma Lipase Recombinante de *Rhizopus oryzae***. Curitiba, 2011, p.168, (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 2011.

MADALOZZO, A.D. **Imobilização e caracterização de uma lipase de metagenômica e sua aplicação na síntese de lipídios estruturados.** Relatório (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

MADALOZZO, A.D.; MUNIZ, L.S.; BARON, A.M.; PIOVAN, L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.005> 2013.

MAIA, M. M.; HEASLEY, A.; CAMARGO DE MORAIS, M. M.; MELO, E. H. M.; MORAIS, M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource technology**, v. 76, n. 1, p. 23–7, 2001.

MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C; MORAIS JR, M.A.; MELO, E.H.M; LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 304-309, 1999.

MANOHAR, B.; DIVAKAR, S. An artificial neural network analysis of porcine pancreas lipase catalysed esterification of anthranilic acid with methanol. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3372–3376, 2005.

MARINI, A.; IMELIO, N.; PICÓ, G.; ROMANINI, D.; FARRUGGIA, B. Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography B**, v. 879, n. 22, p. 2135–41, 2011.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M. Reversible enzyme immobilization via very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethyleneimine composites. **Biotechnology and Bioengineering**, v.8, p. 98-105, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-63, 2007.

MATEO, C.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; HIDALGO, A.; LOPEZ-GALLEGO, F.; ABIAN, O.; PALOMO, J. M.; BETANCOR, L.; PESSELA, B. C. C.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 772-777, 2003.

MATTE, C.R.; BUSSAMARA, R.; DUPONT, J.; RODRIGUES, R.C.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Different Techniques on Immobead 150 Support: Characterization and Applications. **Appl Biochem Biotechnol**, DOI 10.1007/s12010-013-0702-4, 2014.

MELO, A. F. **Produção e Aplicação de Lipase no Desenvolvimento de um Biossensor Potenciométrico para Triglicérides.** Rio de Janeiro, 2012. Tese

(Doutorado em ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Effect of enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on anaerobic biodigestion. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 3, p. 185-190, 2006.

MERÇON, F.; ERBES, V.L.; SANT'ANNA JR, G.L.; NOBREGA, R. Lipase immobilized membrane reactor applied to babassu oil hydrolysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 1, 1997.

MINOVSKA, V., WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.70, n. 4, p. 609–624, 2005.

MONTESINOS, J.L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M.A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. SOLÀ, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.59, p. 25-37, 1996.

MORAES, M. R. **Avaliação da produção de lipase e biossurfactante por fungos isolados de abacate**. 2012. 57f. Monografia (Especialização em Bioquímica Aplicada) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MORENO, J.M.; SINISTERRA, J.V. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 357–369, 1995.

MOURE, V.R.; FABRÍCIO, C.; FRENCH, G.; MARQUES, F.A.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. **Biocatal.Agric.Biotechnol**), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.011i>, 2013.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAM, P. K. A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 57-66, 2002.

NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; MURATA, A., KOMEMUSHI, S.; TOMINAGA, Y. Use of thermostable *Fusarium heterosporum* lipase for production of structured lipid containing oleic and palmitic acids in organic solvent-free system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n.2, p. 167–172, 2001.

NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Expression of lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: High-level production and purification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 488–492, 1996.

**NC-IUBMB (Enzyme Nomenclature)**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/74.html>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

OGINO, H.; ISHIKAWA, H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 91, n. 2, p. 109–116, 2001.

OH, B.; KIM, H.; LEE, J.; KANG, S.; OH, T. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 385-392, 1999.

OVERMEYER, A.; S. SCHRADER-LIPPELT; V. KASCHE; G. BRUNNER. Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40 °C to 160 °C in supercritical CO<sub>2</sub>. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 1, p. 65-69, 1999.

PAIVA, A.; BALCÃO, V.; MALCATA, F. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 3-5, p. 187–204, 2000.

PASSADOR, M.M.; PIRES, G.C.C.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca "Mário Barreto Figueiredo". **Biológico**, v.72, n.1, p.51-55, 2010.

POPPE, J. K., PAULA, A., COSTA, O., BRASIL, M. C., RODRIGUES, R. C., ANTÔNIO, M., AYUB, Z. Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 94, 57–62, 2013

PRAZERES, J. N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 505–509, 2006.

QUERALES, P.J. **Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à prodrisão do colmo de milho (*Zea mays* L.)**. Tese (Doutorado em Ciências - Fitopatologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RANJITHA, P.; KARTHY, E. S.; MOHANKUMAR, A. Purification and Partial Characterization of Esterase from Marine *Vibrio fischeri*. **Modern Applied Science**, v. 3, n. 6, p. 73–82, 2009.

RAPP, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 9, p. 832–838, 1995.

RASERA, K.; OSÓRIO, N.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; FERREIRA-DIAS, S. Interesterification of fat blends using a fermented solid with lipolytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 75– 81, 2012.

REGALADO, V.; RODRÍGUEZ, A.; PERESTELO, F.; CARNICERO, A.; DE LA FUENTE, G.; FALCÓN, M.A. Lignin Degradation and Modification by the Soil-Inhabiting Fungus *Fusarium proliferatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3716–3718, 1997.

REN, M.Y.; BAI, S.; ZHANG, D.H.; SUN, Y. pH memory of immobilized lipase for (+/-)-menthol resolution in ionic liquid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2388–91, 2008.

RODRIGUES, D.S.; CAVALCANTE, G.P.; FERREIRA, A.L.O.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase Type B by Adsorption on Activated Carbon. **Chemical & Biochemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 125–133, 2008.

ROMDHANE, I. B.B.; FRIKHA, F.; MAALEJ-ACHOURI, I.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Gene cloning and molecular characterization of the *Talaromyces thermophilus* lipase catalyzed efficient hydrolysis and synthesis of esters. **Gene**, v. 494, n. 1, p. 112–8, 2012.

RUCKA, M.; TOMASZEWSKA, M. Hydrolysis of sunflower oil by means of hydrofobic membrane with lipolytic activity. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 3, p. 167–172, 1989.

SABBANI, S.; HEDENSTRÖM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 1–9, 2006.

SALGADO, J. M.; DANIELI, F.; REGITANO-DARCE, M. A. B.; FRIAS, A; MANSI, D. B. O óleo de abacate (*Persea americana* Mill) como matéria-prima para a indústria alimentícia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 20-26, 2008.

SALUM, T.F.C.; BARON, A.M.; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalysing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatal Biotransformations**, v. 26, n.3, p. 197-203, 2008.

SALUM, T.F.C.; VILLENUEVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C.I.; CÔCCO, L.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348–1354, 2010.

SCULLY, E. D.; HOOVER, K.; CARLSON, J.; TIEN, M.; GEIB, S. M. Proteomic Analysis of *Fusarium solani* Isolated from the Asian Longhorned Beetle, *Anoplophora glabripennis*. **PLoS one**, v. 7, n. 4, 2012.

SHAMEL, M. M.; RAMACHANDRAN, K.B.; HASAN, M.; AL-ZUHAIR, S. Hydrolysis of palm and olive oils by immobilised lipase using hollow fibre reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 3, p. 228–235, 2007.

SHANGGUAN, J.J., LIU, Y.Q., WANG, F.J., ZHAO, J., FAN, L.Q., LI, S.X., XU, J.H. Expression and characterization of a novel lipase from *Aspergillus fumigatus* with high specific activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.165, p. 949–62, 2011.



SHANGGUAN, J.J.; LIU, Y.Q.; WANG, F.J.; ZHAO, J.; FAN, L.Q.; LI, S.X.; XU, J.H. Expression and characterization of a novel lipase from *Aspergillus fumigatus* with high specific activity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 165, n.3-4, p.949-62, 2011.

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

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

SHEVSHENKO, A; WILM, M; WORM, O. MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v.68, p. 850-858, 1996.

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; AKIO, S.; NAGAO, T.; TAKADA, N.; SUSUMU, T.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 349–352, 1993.

SIDDIQUE, T.; OKEKE, B. C.; ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Biodegradation kinetics of endosulfan by *Fusarium ventricosum* and a *Pandora* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 27, p. 8015–9, 2003. 94

SILVA, J.N.; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Application of Home-Made Enzyme and Biosurfactant in the Anaerobic Treatment of Effluent with High Fat Content. **Bioprocessing & Biotechniques**, v.3, n.3, 2013.

SOARES, D.; MADALOZZO, A.D.; BOTTON, V.; MARTINI, V.P.; KRIEGER, N. Biocatálise com lipases em solventes orgânicos. In: Regina Aparecida Correia Gonçalves; Arildo José Braz de Oliveira; José Eduardo Gonçalves. (Org.). **Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações**, 1ª ed., Editora Schoba, São Paulo, v. 2, p. 247-280, 2012.

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A.G.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor, **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p.15-23, 2013.

SOLIDAY, C. L.; FLURKEY, W. H.; OKITA, T. W.; KOLATTUKUDY, E. Cloning and structure determination of cDNA for cutinase, an enzyme involved in fungal penetration of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, p. 3939–3943, 1984.

STAMATIS, H.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; KOLISIS, F.N. Studies on the synthesis of short-chain geranyl esters catalysed by *Fusarium oxysporum* esterase in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, n. 4, p. 229–236, 1998.

STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; PAPAMICHAEL, E. M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, n. 8, p. 1846–59, 2013.

SUGIHARA, A.; UESHIMA, M.; SHIMADA, Y.; TSUNASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Biochemistry**, v. 112, n.5, p.598-603, 1992.

SUN, J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S.Q. Optimisation of flavour ester biosynthesis in an aqueous system of coconut cream and fusel oil catalysed by lipase. **Food Chemistry**, v.135, p. 2714–2720, 2012.

SUNNA, A.; HUNTER, L.; HUTTON, C. A.; AND BERGQUIST, P. L. Biochemical characterization of a recombinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 4, p. 472- 476, 2002.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P.L. Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2016–2019, 2010.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R.; LIMONTA, S. N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 17-23, 2004.

TAYLOR, J. M.; JACOBSON, D. J.; FISHER, M. C. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. **Annual Review of Phytopathology**, p. 197–246, 1999.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. **Immobilized Enzymes: Methods and Applications**. In: FESSNER, W. D. (Ed.). Topics in Current Chemistry. New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 200, p. 95-126, 1999.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of Arabic gum on interfacial lipases binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36-43, 2001.

TOPAKAS, E.; STAMATIS, H.; MASTIHUBOVA, M.; BIELY, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 729–737, 2003.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; LUCCIO, M.D.; OLIVEIRA, J.V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p.182-196, 2010.

TUFVESSON, P.; TÖRNVALL, U.; CARVALHO, J.; KARLSSON, A. J.; HATTI-KAUL, R. Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of

specialty chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 200–205, 2011.

UGWU, S.O.; APTE, E.P. The Effect of Buffers on Protein Conformational Stability. **Pharmaceutical Technology**, mar.2004.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**.15, p.32-38, 1997.

VERMA, N.; THAKUR, S.; BHATT, A. K. Microbial Lipases : Industrial Applications and Properties (A Review). **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 8, p. 88–92, 2012.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113–148, 2000.

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.109, n.13, p. 6436-41, 2005.

VOIGT, C. A.; SCHÄFER, W.; SALOMON, S. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. **The Plant Journal**, v. 42, p. 364–375, 2005.

WARD, O. P.; FANG, J.; LI, Z. Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 1, p. 52–56, 1997.

WATANABE, Y.; KUWABARA, K.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R.. Production of saturated acyl L-ascorbate by immobilized lipase using a continuous stirred tank reactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4628–32, 2003.

WINGFIELD, M. J.; HAMMERBACHER, A.; GANLEY, R. J.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T. R.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* -- a growing threat to pine plantations and forests worldwide. **Australasian Plant Pathology Society**, v. 37, p. 319–334, 2008.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microsporous Mesoporous Materials**, v.86, n.1-3, p. 215-222, 2005.

YIĞİTOĞLU, M.; TEMOÇİN, Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 130–135, 2010.

ZAKS, A; KLIBANOV, A M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 10, p. 3192–6, 1985.

ZAMBIAZI, R.C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M.W.; MENDONÇA, C.B.; Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **B.CEPPA**, v. 25, n. 1, jan./jun. 2007.



ZAWADZKI, R. A. F. O.; PRADO, M.R.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.. Continuous Enzymatic Prehydrolysis Treatment of High-Fat Wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 293-300, 2013.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between *n*-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 355–363, 2004.

ZHANG, N.; DONNELL, K.O.; SUTTON, D. A.; AMEENA, F.; SUMMERBELL, R. C.; PADHYE, A.A.; GEISER, M.; NALIM, F. A.; GEISER, D.M. Members of the *Fusarium solani* Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.6, p. 2186-2190, 2006.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO ISOLADO DE ABACATE

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS <b>RELATÓRIO TÉCNICO</b>	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
--	--	--

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM

PÁGINA: 6 de 8

filogenética construída a partir da sequência da amostra **CPQBA 515-12 DRM 02** e das sequências recuperadas no GenBank está apresentada na **Figura 2**.

- Os resultados de identificação para a amostra estão apresentados na tabela abaixo:

Amostra	Descrição do Serviço/Amostra	Identificação
CPQBA 515-12 DRM 02	10b	<i>Fusarium solani</i>

#### 5. Comentários

- CPQBA 515-12 DRM 02 (10b):** A sequência de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 apresentou 100% de similaridade com as sequências da mesma região do *operon* ribossomal da espécie *Fusarium solani*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. Na árvore filogenética (Figura 2) a amostra **CPQBA 515-12 DRM 02 (10b)** se agrupou com *F. solani*, com bootstrap de 100%, suficiente para uma identificação em nível específico. Assim, o fungo pode ser identificado como *F. solani*.

#### Referências Bibliográficas

- Kimura, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120, 1980
- Raeder, J.; Broda, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v. 1, p. 17-20, 1985.
- Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425, 1987.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson, J.D. Higgins, D.G. Gibson, T.J. Clustal, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680, 1994.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



FMQ-07  
Emissão: GGG

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM

PÁGINA: 5 de 8

**II - Identificação de fungos filamentosos**

**1. Objetivos**

Identificação de uma linhagem de fungo filamentosos utilizando sequenciamento e análise filogenética de fragmentos de genes do *operon* ribossomal.

**2. Amostra recebida**

REGISTRO	AMOSTRA
CPQBA 515-12 DRM 02	10b

**3. Metodologia utilizada**

- **Extração de DNA genômico.** O DNA genômico das amostras foi extraído de acordo com o protocolo descrito por de Raeder & Broda (1985).
- **Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2.** A metodologia consistiu na amplificação pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram ITS-1 e ITS-4 (para a amplificação da região ITS) para a amostra **CPQBA 515-12 DRM 02**.
- **Sequenciamento.** Os fragmentos amplificados foram a seguir purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram ITS-1 e ITS-4.
- **Análise filogenética.** As sequências parciais da região ITS obtidas foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparada com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl>). As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas, foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no MEGA 4.0.

**4. Resultados**

- Fragmentos da região ITS da amostra **CPQBA 515-12 DRM 02** foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído das amostras. O material foi purificado em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetido ao sequenciamento automático no sistema ABI3500XL Series (Applied Biosystem).
- A sequência de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 obtida para a amostra **CPQBA 515-12 DRM 02** está apresentada no **Anexo I**. Esta sequência foi analisada usando a rotina BLAST do GenBank e o banco de dados do CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre*). A árvore

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



UNICAMP  
FMQ-07  
Emissão: GGQ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO

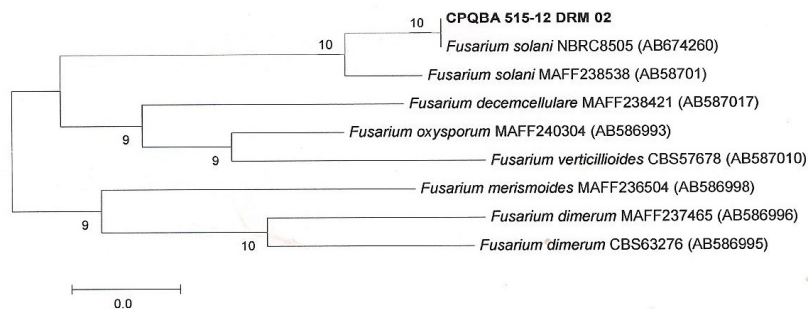


CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM

PÁGINA: 7 de 8



**Figura 2.** Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais dos genes ribossômicos da amostra CPQBA 515-12 DRM 02 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



FMQ-07  
Emissão: GGQ

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

**RELATÓRIO TÉCNICO**



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM

PÁGINA: 8 de 8

**Anexo I.** Sequências parciais do RNAr 16S da amostra de bactéria e da região ITS do operon ribossomal da amostra de fungo analisada.

>CPQBA 515-12 DRM 01  
CGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTAT  
AGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGCGGACGATC  
AGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCG  
TGTGTGAAGAAGGCTTCGGGTGTAAGCACTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGCTCT  
AATACAGTCGGGGATGACGGTACCGGAAAGAAATAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
CCCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTCCGAG  
GCGGTTTGTAGACCGATGTGAAATCCCAGGGCTCAACTGGGAACCTGCATTGGTGACT  
GGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGAGCAGTGAATGCGGTAGA  
GATGTGGAGGAATACCGATGCCAAGGACGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCAC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCA  
ACTAGTTTGGGGATTCATTCCTTAGTAACGTAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTG  
GGGATACGGTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG  
ATGATGTGGATTAAT

*Handwritten signature*

>CPQBA 515-12 DRM 02  
CTCATCAACCCTGTGAACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGGCCCGTAA  
CAGGGCCGCCCCGCCAGAGGCCCTACTCTGTTTATATATGTTTTCTGAGTAA  
ACAAGCAAATAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCGCATCGATGAAGAA  
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA  
ACGCATTTGCGCCCGCCAGTATCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCCTCATACAAACC  
TCAGCCCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGCGGAAAGCCCTGTGGGCATACGCCGTC  
CCCTAAATACAGTGGCGGTCGCCCGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAA  
CTGGAGAGCGCGGCCAAGCCGTAACCCCAACTTCTGAATGT



Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

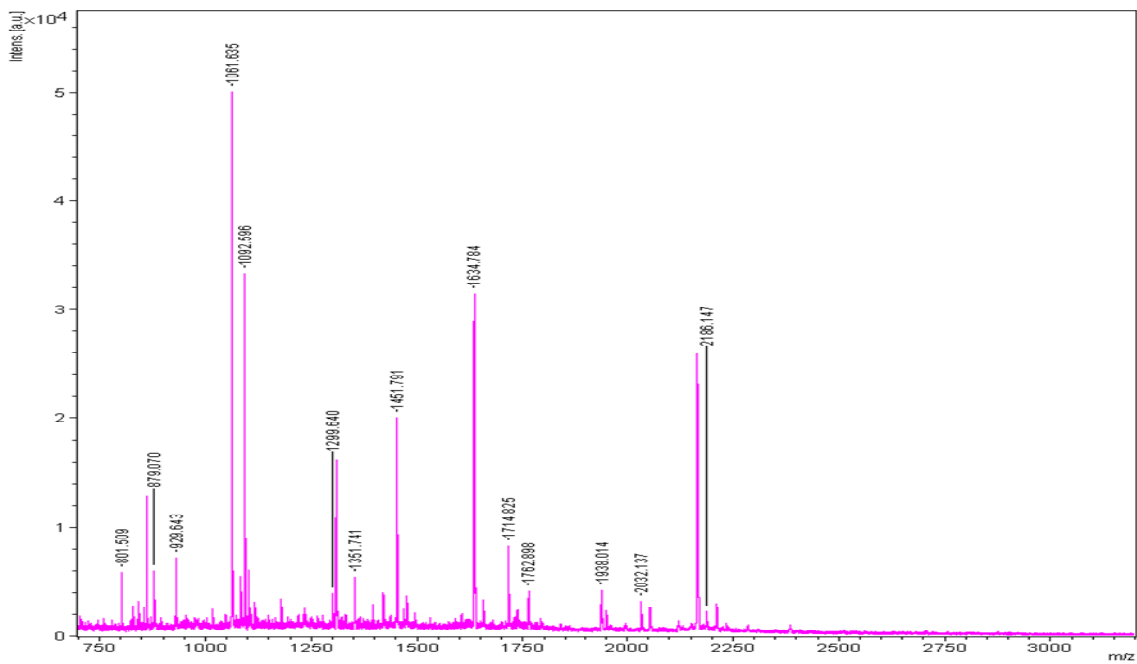
e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

Observação: o resultado referente à cepa *Fusarium solani* CPQBA 515-12 DRM 02, utilizada neste trabalho, está indicado pela seta.



## ANEXO 2 - ESPECTROS DE MASSA DAS PROTEÍNAS DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

### 1. Espectro referente à banda de 33,4 kDa do gel SDS-PAGE



### 2. Espectro referente à banda de 63,2 kDa do gel SDS-PAGE

