

SELEÇÃO DE FUNGOS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE E ESTERIFICAÇÃO

**Wesle Silva Gama¹; Heiddy Marquez Alvarez²; Angélica Maria Lucchese³, Tássia
Caires Ramos⁴; Tereza Simonne Mascarenhas Santos⁵, Alini Tinoco Fricks⁶.**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Farmacêuticas, UEFS, e-mail: wes_gama@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Exatas, UEFS, e-mail: marquezheiddy@gmail.com
3. Co-Orientadora, Departamento de Ciências Exatas, UEFS, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com
4. Participante do projeto, Curso de Pós graduação de Biotecnologia, UEFS, e-mail: cairesramos@hotmail.com
5. Departamento de Ciências Exatas, UEFS, e-mail: terezasilmonne@gmail.com
6. Participante do projeto, Universidade Tiradentes. Instituto de Pesquisa e Tecnologia-ITP, Laboratório de Engenharia de Bioprocessos LEB. Aracaju. SE. E-mail: alinitf@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Fungos, Lipases, Esterificação, hidrólise.

INTRODUÇÃO

A biotransformação tem sido bastante utilizada porque possibilita a obtenção de produtos de alto valor agregado com bons rendimentos de reação (CARVALHO, 2005). Este processo envolve a utilização de catalisadores biológicos. Neste contexto as enzimas ganham grande destaque. Sendo assim, torna-se necessário frisar determinado tipo de enzima, as lipases. As lipases são catalisadores biológicos que podem ser isoladas de fungos, bactérias ou leveduras (WOODWARD *et al.*, 1984). As principais razões para utilização das lipases na biotecnologia são a utilização de condições reacionais brandas, resultando em produtos de melhor qualidade, menores custos de energia e a seletividade das lipases. Além disso, a exploração da especificidade dessas enzimas possibilita a síntese de produtos que não poderiam ser obtidos por rota química convencional. Cabe ainda ressaltar que, do ponto de vista ambiental, o processo é tecnicamente limpo e seguro (FREITAS *et. al.*, 2009).

As lipases podem catalisar reações de hidrólise e/ou esterificação. Nestas reações são utilizadas condições reacionais mais brandas (temperaturas moderadas 30-60⁰C), levando a produtos com elevado grau de pureza.

Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (VULFSON, 1994). As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel. Uma aplicação que tem merecido destaque é sua utilização na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica (FABER, 2000).

A região do semi-árido baiano apresenta uma diversidade biológica pouco explorada no Brasil e possui as características para apresentar microrganismos resistentes a condições extremas, além de enorme potencial para aplicação industrial.

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar e quantificar a produção de lipases extracelulares de fungos endofíticos e basidiomicetos isolados do semi-árido baiano pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB) pela metodologia do *Cup Plate* e avaliação das metodologias de obtenção do extrato bruto enzimático nas reações de hidrólise e avaliar a atuação das lipases em reações envolvendo ácido oleico e álcool isoamílico em reações de esterificação.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de microrganismos secretores de enzimas pelo método “Cup Plate”

Reações de hidrólise

Os fungos estudados (40 fungos) foram cultivados em meio PDA (Potato Dextrose Agar) numa temperatura de 28 °C por um período de 7 dias. Para a secreção de enzimas, os fungos foram transferidos para reatores de 250 mL contendo 25 mL do meio líquido de indução, composto de 0,7% de fosfato de amônio, 0,15% fosfato dibásico de potássio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,03% de cloreto de cálcio, 0,25% de soluções de traços de sais (preparado a partir de 0,1% de cloreto manganoso, 0,1% de sulfato de zinco e 0,1% de água destilada), tampão fosfato pH= 7 e substrato (125µL de óleo de soja para cada reator), sendo mantidos em estufa bacteriológica (B.O.D) a 28°C por 72 horas.

A caracterização da secreção de lipases hidrolíticas foi realizada em meio sólido composto de 1,0% de óleo de soja, 2,0% de ágar, água destilada e revelador Rodamina B. Em seguida foram realizadas 3 (três) perfurações (“cups”) para favorecer o crescimento do micro-organismo, com diâmetro de 6mm, na superfície do ágar e adicionou-se 150µL do filtrado. As placas foram incubadas a 28°C e verificou-se a formação de halos após 24, 48 e 72h. O tamanho do halo formado foi medido com uma régua graduada em milímetros. O fungo com maior tamanho de halo foi selecionado para quantificação de enzimas.

Obtenção de Extrato Bruto Enzimático

Para obtenção do extrato bruto enzimático, os fungos com as maiores secreções enzimáticas foram incubados em PDA por 72h e 10 discos de 6 mm dos mesmos foram transferidos para o meio de indução onde permaneceram por 24h. Filtrou-se a amostra para separação da massa celular.

Determinação da Atividade Hidrolítica das lipases

Para avaliação quantitativa da atividade hidrolítica de lipases os extratos brutos foram submetidos ao método titulométrico no qual uma alíquota de 3 mL do filtrado contendo a enzima foi adicionado a 7mL de emulsão (solução tampão fosfato pH=7, óleo de soja e goma arábica). Em seguida, o meio reacional foi submetido a banho de agitação a 40°C por 5 minutos e titulado com solução KOH alcoólico (0,1 mol/L) na presença de fenolftaleína. A reação foi paralisada com a adição de 3mL de solução acetona: etanol:água.

Reações de esterificação

Para a realização deste experimento, foram selecionados os fungos que apresentaram as melhores secreções enzimáticas pelas reações de hidrólise. Ou seja, os fungos que apresentaram os maiores tamanhos de halos pela metodologia do *Cup Plate*. Realizou-se o mesmo procedimento realizado nas reações de hidrólise para a seleção dos micro-organismos, porém, como substrato foi utilizado quantidades equimolares de ácido oléico e o álcool isoamílico (0,25mmol). Neste experimento não foi utilizado nenhum tipo de emulsificante. As reações foram realizadas em duplicata e os reatores foram colocados em estufa bacteriológica (B.O.D) a 28°C e as amostras foram retiradas após 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas.

2.4. Determinação da atividade Hidrolítica das lipases

A quantificação da secreção enzimática de lipases realizou-se através do método titulométrico utilizando-se como titulante NaOH (hidróxido de sódio padronizado de concentração molar 0,0166 mol/L). As amostras foram filtradas e adicionadas de 5 mL de éter etílico: álcool

etílico (1:1 v/v). Em seguida foram retiradas duas alíquotas de 5 mL desta solução e acrescidas de 5 mL de éter etílico: álcool etílico, adicionando-se em seguida 3 gotas do indicador ácido-base fenolftaleína e submeteu-se a titulação (esta fração que foi utilizada para obtenção da taxa de conversão em produtos por meio da equação 1). Utilizou-se como titulante o NaOH de concentração molar de 0,0166mol/L. Foi realizado também o teste branco das amostras.

$$\% \text{ conversão} = (V_{\text{branco}} - V_{\text{amostra}} / V_{\text{branco}}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reações de Hidrólise

Na figura 1 está apresentado uma fotografia dos halos das enzimas secretadas pelos fungos basidiomicetos 413, 368 e 401.



Figura 1. Visualização dos halos das enzimas secretadas pelos fungos basidiomicetos 413, 368 e 401.

Dos fungos estudados apenas o 404 e 413 apresentaram halo visível. Os valores das medidas dos halos em relação a cada tipo de fungo em função do tempo podem ser visualizados na tabela 1:

Tabela 1. Halos (cm) obtidos pela ação das enzimas secretadas pelos fungos Basidiomicetos 404 e 413.

<i>Fungos</i>	<i>Halo (cm)</i>		
	<i>24h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>
404	0	0	1,3
413	0	0	1,5

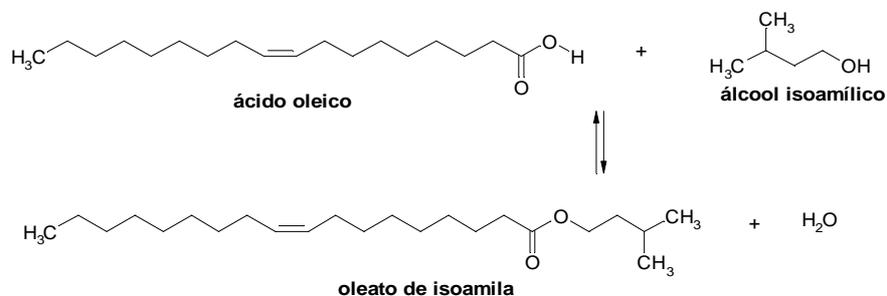
No método titulométrico, verificou-se a ação das enzimas na hidrólise do óleo vegetal de soja em ácidos graxos pelos fungos 404 e 413. Contudo o fungo 413 apresentou maior quantidade de ácidos graxos liberados, ou seja, maior volume de hidróxido consumido (4,13 mL) enquanto que o fungo 404 consumiu apenas 2,9 mL. Novos testes serão realizados aumentando o tempo de obtenção dos extratos brutos enzimáticos para 48 e 72h.

Reações de esterificação

Na tabela 2, se apresentam os resultados obtidos na esterificação do ácido oléico com álcool isoamílico. A reação foi realizada em diferentes tempos reacionais mantendo a temperatura constante 28^oC. A conversão da reação foi determinada a partir do volume de NaOH obtido na titulação de cada mistura reacional através da equação:

$$\text{Conversão (\%)} = (V_{\text{branco}} - V_{\text{amostra}} / V_{\text{branco}}) \times 100$$

Tabela 2: Conversão (%) obtida na esterificação de ácido oléico utilizando álcool isoamílico em relação molar (1:1) a 28^oC e vários tempos reacionais.



Fungos	Conversão (%)				
	24h	48h	72h	96h	120h
-	0	0	0	0	0
413	0	2,5	16,7	0	5,7
29/07	10,3	0	11,1	0	0
26/07	9,4	13,5	24,1	3,1	0
88/06	0	6,7	0	1,2	0
404	6,3	0	8,3	0	18,7

Foi observado que o fungo 26/07 apresentou um maior potencial de esterificação com uma taxa de 24,10% de conversão do éster as 72 horas de reação. O fungo basidiomiceto 404 apresentou um maior potencial de esterificação no tempo de 120 horas, com uma taxa de conversão no valor de 18,73%.

Nas reações de hidrólise os fungos 404 e 413 apresentaram grande expressão para lipases no método qualitativo do *Cup Plate*. Contudo, o fungo 413 apresentou melhor eficiência na quantificação da secreção enzimática. Nas reações de esterificação, verificou-se que o fungo 26/07 apresentou um maior potencial de esterificação para o tempo de reação de 72 horas, Já o fungo basidiomiceto 404 apresentou um maior potencial de esterificação no tempo de 120 horas. Novos experimentos devem ser realizados com o objetivo de identificar biocatalisadores que possam levar ao produto de esterificação com conversões mais elevadas e/ou em menores tempo de reação, bem como estudos de otimização de meio reacional e parâmetros como pH, temperatura, entre outros, que possam elevar a conversão obtida no sistema estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, Patrícia de O. *et al.* Potencial de Biocatálise Enantiosseletiva de Lipases Microbianas. *Química Nova*, Campinas, SP, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n4/25107.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2010.
- FABER, K. 2000. *Biotransformation in Organic Chemistry*. 4^a ed.; Springer-Verlag: Berlin.
- FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; BAREZA, M. V.; DE CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento de glicerol gerado na produção de biodiesel: síntese enzimática de monoacilaurina por esterificação. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 9, 2277-2281, 2009.

VULFSON, E. N. 1994. *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*; Wooley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Great Britain.

WOODWARD, J.; ALLEN, B.F. & SCOTT, M. 1984. *Sixth Symp. on Biotechnol. for Fuels and Chemicals*, 16, p. 435-438.