

SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO

Wesle Silva Gama¹; Tereza Simonne Mascarenhas Santos²; Angélica Maria Lucchese³; Heiddy Marquez Alvarez⁴; Tássia Caires Ramos⁵; Alexia Matos⁶.

1. Bolsista FAPESB/CNPq, Graduado em Ciências Farmacêuticas, UEFS, e-mail: wes_gama@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Exatas, UEFS, e-mail: terezasimonne@gmail.com
3. Co-Orientadora, Departamento de Ciências Exatas, UEFS, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Exatas, UEFS, e-mail: marquezheiddy@gmail.com
5. Departamento de Ciências Exatas, Curso de Pós graduação de Biotecnologia, UEFS, e-mail: cairesramos@hotmail.com
6. Participante do projeto, Graduanda em Farmácia, UEFS, e-mail: alexiadobravo@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias, Lipases, Hidrólise, Esterificação.

INTRODUÇÃO

A área multidisciplinar da Biocatálise (ou biotransformação) encontra-se atualmente em amplo desenvolvimento. Pesquisas realizadas em vários ramos da química e da biologia têm como principal objetivo o desenvolvimento de novos catalisadores para uso industrial (CONTI, 2001). 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 elevada 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 30-60^oC), levando a produtos com elevado grau de pureza.

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 micro-organismos 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 actinobactérias e bactérias isolados do semi-árido baiano pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB) pela metodologia do *Cup Plate* e avaliação da atividade lipolítica frente as reações de esterificação.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos micro-organismos

Os micro-organismos, actinobactérias e bactérias, foram obtidos da Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia localizada na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Metodologia 1 – Actinobactérias

Detecção de enzimas hidrolíticas pelo método *Cup Plate*

Inicialmente, as actinobactérias foram cultivadas em meio amido-caseína- ágar (ACA). Para a produção de enzimas pelo método *Cup Plate*, dois discos de 6 mm de diâmetro das actinobactérias foram transferidos para reatores (Shots) de 250 mL que continham 25 mL do meio líquido de indução, contendo azeite de oliva como substrato. A incubação ocorreu em estufa bacteriológica (B.O.D) a uma temperatura de 28°C por um período de 48 horas (KOBELITZ, 2003).

O meio sólido de caracterização que objetivava a visualização de halos para a confirmação de enzimas utilizou os seguintes reagentes e nas seguintes proporções: Amido 1%, Caseína 0,03%, nitrato de potássio (KNO_3) 0,2%, cloreto de sódio (NaCl) 0,2%, K_2HPO_4 0,2%, sulfato de magnésio ($MgSO_4$) 0,005%, Sulfato ferroso ($FeSO_4$) 0,001%, carbonato de cálcio ($CaCO_3$) 0,2%, Ágar 2%, azeite de oliva 1% e revelador Rodhamina B na proporção de 1%. Em seguida foram realizadas 3 (três) perfurações (“cups”) para favorecer o crescimento dos micro-organismos, e adicionou-se 150µL do filtrado do meio de indução. As placas foram incubadas a 30°C e verificou-se a formação de halos em transiluminador de luz ultra-violeta a 365 nm após 24, 48 e 72 horas de reação. A atividade enzimática obtida pela reação em placa foi estimada qualitativamente através da média do diâmetro dos halos degradativos mensurados com o auxílio de uma régua milimetrada.

Metodologia 2 – Bactérias

Seleção de micro-organismos secretores de enzimas pelo método *Cup Plate*

As 92 bactérias selecionadas foram cultivadas em meio Ágar nutriente a uma temperatura de 28 °C por um período de 48 horas. Para a secreção de enzimas (lipases), duas alças de cada bactéria foi transferida para reatores de 250mL (Shots), onde continha 25mL do meio líquido de indução (devidamente auto-clavados), e substrato 125µl de azeite de oliva para cada reator (substrato), sendo mantidos em estufa bacteriológica (B.O.D) a 28°C por 24 horas (KOBELITZ, 2008). A caracterização da secreção de lipases foi realizada em meio sólido composto de 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura, 0,2% de azeite de oliva (substrato), 1,5% de ágar nutriente e 0,0007% de solução de revelador Rhodamina B. Em seguida, com auxílio de uma alça de platina foram realizadas estrias de cada micro-organismo contido no meio de indução sobre as placas de caracterização. As placas foram incubadas a 28°C e verificou-se a formação de halos em transiluminador de luz ultra-violeta a 365 nm após 24, 48 e 72 horas de reação.

Metodologia 3 – bactérias

Seleção de micro-organismos secretores de enzimas pelo método *Cup Plate*

Foram selecionadas 3 bactérias para a realização desta metodologia. Inicialmente as bactérias foram reativadas em meio Ágar nutriente e submetidas à estufa bacteriológica a uma temperatura de 28 °C por um período de 48 horas. Após a reativação das bactérias, as mesmas foram submetidas a testes no aparelho. Aproximadamente duas alças de cada bactéria foram inseridas a cada tubo de colorímetro e em seguida foi registrada a absorbância presente em cada amostra. Após esta etapa, realizou-se dois métodos diferentes de se inserir as bactérias

no meio de indução. Retirou-se 0,5 e 1 mL de cada amostra presente nos tubos de colorímetro e inseriu no meio líquido de indução, igualmente descrito anteriormente. O meio de indução foi preparado da mesma forma como descrito anteriormente e submetido à estufa bacteriológica por um período de 24 horas.

A caracterização da secreção de lipases foi realizada em meio sólido de caracterização. As placas foram incubadas a 28°C e verificou-se a formação de halos em transiluminador de luz ultra-violeta a 365 nm após 24, 48 e 72 horas de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados obtidos pela metodologia 1 – Actinobactérias

Após realizar o procedimento inicial, detecção de enzimas hidrolíticas pelo método *Cup Plate*, para todas as actinobactérias selecionadas (FS 23, FS 27, MC 27, MC 30, FS 21, FS 26, FS 35, FS 37, MC 43 e MC 37), verificou-se que não houve a formação de halos de inibição, ou seja, de acordo com a metodologia utilizada não foi detectada a secreção de enzimas (lipases) por parte dos micro-organismos. A Figura 1 demonstra uma placa de caracterização sem a presença de halos de inibição.



Figura 1: Placa de caracterização das actinobactérias FS35 e MC43 sem a presença de halos de inibição.

Desta forma, como não foi identificada a presença de lipases através da reação de hidrólise. As actinobactérias não foram submetidas a reações de esterificação.

Uma possível hipótese para a não detecção de enzimas (lipases) nos testes pode ser atribuída a que as actinobactérias já estavam desgastadas, por ter sido submetidas a várias reativações, o que diminui sua atividade catalítica frente às reações de estudo.

Novos testes devem ser realizados com cepas novas de actinobactérias com o intuito de se obter a secreção enzimática de lipases, para que desta forma a reação de esterificação seja realizada e comparada à atividade das diferentes actinobactérias para este tipo de reação.

Resultados obtidos pela metodologia 2 – Bactérias

Neste experimento observou-se que nenhuma bactéria apresentou secreção enzimática, ou seja, secreção de lipases pela metodologia do *Cup Plate* adotada. Este fato pode ser explicado pela saturação de secreção de enzimas por parte dos micro-organismos, devido a não condições favoráveis do meio.

Resultados obtidos pela metodologia 3 – Bactérias

Neste outro experimento observou-se que as bactérias identificadas como 29, 248 e 110 não apresentaram secreção enzimática, ou seja, secreção de lipases pela metodologia do *Cup Plate* adotada. Este fato pode ser explicado pela saturação de secreção de enzimas por parte dos micro-organismos, devido a não condições favoráveis do meio.

No procedimento em que foi utilizado o colorímetro (o aparelho foi calibrado com o comprimento de onda de 580 nm). É de se esperar de acordo com a literatura que para as bactérias as absorvâncias fiquem em valores na faixa de 0,08 a 0,10. A Tabela 1 apresenta os valores das absorvâncias registrados para as bactérias estudadas.

Tabela 1: Bactérias e seus respectivos valores de absorvâncias.

<i>Identificação da bactéria</i>	<i>Absorvâncias</i>
29	0,10
248	0,09
110	0,09

Nesta metodologia também só foi observado o crescimento dos micro-organismos nas placas de caracterização, porém não foram detectados a secreção de lipases pelos mesmos, pois não foram visualizados mudanças de coloração nas placas de caracterização ao redor do ponto de aplicação dos micro-organismos.

De forma geral, todos os resultados obtidos reforçam a ideia da repetição destes testes e realização de testes com novos micro-organismos, pois permitirá afirmar de forma mais conclusiva se estes micro-organismos estudados apresentam ou não capacidade de atuarem em reações orgânicas, como reações de hidrólise e esterificação.

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.
- CONTI, Roseli de.; RODRIGUES, José Augusto R.; MORAN, Paulo J. S. Biocatálise: avanços recentes. *Química Nova*, Campinas, SP, v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v24n5/a14v24n5.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2012.
- FABER, K. 2000. *Biotransformation in Organic Chemistry*. 4ª 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.
- KOBLITZ, MARIA GABRIELA BELLO. **Purificação e caracterização de lipases produzidas por *Rhizopus sp* e sua aplicação na síntese de monoacilgliceróis**. 2003. Tese de doutorado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) pela Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- WOODWARD, J.; ALLEN, B.F. & SCOTT, M. 1984. Sixth Symp. on Biotechnol. for Fuels and Chemicals, 16, p. 435-438.