



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – MBT**

**TRIAGEM DE FUNGOS DA AMAZÔNIA COMO
POTENCIAIS FORNECEDORES DE LIPASES PARA
APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE**

Mestrando: Israel Paes Romano

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Patrícia Zanotto

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Melchionna Albuquerque

**MANAUS
2009**

	Página
SUMÁRIO	II
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA	1
1.1 BIOCATALISE (BIOTRANSFORMAÇÃO)	4
1.1.1 Conceitos e Origens Históricas	4
1.1.2 Enzimas – Aspectos Gerais	5
1.1.3 Enzimas em Meio Orgânico	8
1.1.4 Vantagens e Limitações	9
1.2 LIPASES	12
1.2.1 Classificação e Estrutura	12
1.2.2 Aplicações Biotecnológicas	15
1.3 FUNGOS	18
1.3.1 Fungos Endofíticos	20
1.3.2 Fungos Fitopatogênicos	21
1.3.3 Fungos Degradadores de Madeira	21
1.4 TRIAGEM DA BIODIVERSIDADE EM BUSCA DE NOVOS BIOCATALISADORES	22
1.4.1 A Extensão da Diversidade Micológica	22
1.4.2 Métodos de Triagem da Biodiversidade	23
1.4.3 Ensaio Enzimático para Detecção de Atividade de Lipase	24
1.4.3.1 Detecção de atividade hidrolítica	24
1.4.3.2 Detecção de atividade sintética em meio orgânico	25
1.4.4 Avaliação Quantitativa e Validação dos Ensaio Enzimáticos por Métodos Analíticos	27

1.4.4.1	Cromatografia líquida de alta performance – CLAE	27
1.4.4.2	Espectrofotometria na região do UV-Vis	29
1.4.4.3	Ressonância magnética nuclear – RMN	31
1.4.5	Avaliação da Enantiosseletividade das Enzimas	32
1.4.5.1	Parâmetros de avaliação	32
1.4.5.2	Cromatografia gasosa com fase estacionária quiral	34
2.	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVO GERAL	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.	METODOLOGIA	38
3.1	OBTENÇÃO DOS FUNGOS	38
3.2	TRIAGEM DA ATIVIDADE SINTÉTICA	38
3.2.1	Cultivo dos Fungos	38
3.2.2	Preparação do Micélio	38
3.2.3	Síntese do Oleato de <i>n</i> -Pentila	39
3.2.4	Síntese do Linoleato de Dodecila	41
3.2.5	Transesterificação entre PpNF e Etanol	42
3.3	ENSAIOS DE ATIVIDADE ENANTIOSSELETIVA	43
3.3.1	Resolução do (<i>R,S</i>)-2-Octanol	43
3.3.2	Resolução do (<i>R,S</i>)-Ibuprofeno	44
3.4	ESTUDO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA	45
3.4.1	Preparação do meio de incubação com substrato óleo de oliva	45
3.4.2	Inoculação, Incubação, e Medição do Halo	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	TRIAGEM DA ATIVIDADE SINTÉTICA	47
4.1.1	Comparação dos resultados obtidos por CLAE e por RMN- ¹ H para síntese do linoleato de dodecila	52

4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENANTIOSSELETIVA	55
4.2.1	Resolução do (<i>R,S</i>)-2-Octanol	55
4.2.2	Resolução do (<i>R,S</i>)-Ibuprofeno	57
4.3	ESTUDO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA – AVALIAÇÃO DO ENSAIO EM PLACA UTILIZANDO ÓLEO DE OLIVA COMO SUBSTRATO	58
4.3.1	Seleção dos Fungos Utilizados	58
4.3.2	Previsões do Ensaio	58
4.3.3	Teste das Formulações	59
5.	CONCLUSÕES	62
6.	SUGESTÕES E PERSPECTIVAS	64
7.	REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Comparação entre o antigo (químico) e o novo (enzimático) processo para hidrólise da penicilina G.	10
Figura 2- Comparação entre o comportamento cinético de esterases (cinética michaelina) e de lipases que possuem ativação interfacial.	13
Figura 3- Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Burkholderia (Pseudomonas) cepacia</i> .	13
Figura 4- Algumas das principais reações catalisadas por lipases que encontram aplicação em biocatálise	16
Figura 5- Alguns dos passos biocatalíticos usando lipases desenvolvidos pela BASF.	17
Figura 6- Cromatograma para uma alíquota da reação do (R,S)-3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila com acetato de vinila, catalisada por lipase de <i>Pseudomonas</i> sp imobilizada em poli(oxi de etileno).	35
Figura 7- Micélios de diferentes isolados, secos e triturados.	39
Figura 8- Esquema da reação biocatalisada de síntese de oleato de n-pentila	40
Figura 9 Equipamento para HPLC da Varian, série Pro Star	40
Figura 10- Esquema da reação biocatalisada de síntese de linoleato de dodecila	41
Figura 11- Espectrômetro para obtenção dos espectros de RMN-1H	42
Figura 12- Esquema da reação biocatalisada de transesterificação entre palmitato de <i>p</i> -nitrofenila e etanol	42
Figura 13- Esquema da reação enantiosseletiva do (R,S)-2- octanol	43
Figura 14- Cromatógrafo à Gás acoplado a Espectrômetro de Massa	44
Figura 15- Esquema da reação enantiosseletiva do (R,S)-ibuprofeno	45
Figura 16- Correlação entre as porcentagens de conversão a éster na síntese do linoleato de dodecila determinadas via CLAE/UV e via RMN-H ¹ .	54
Figura 17- Visualização da formação de halo translúcido em volta do crescimento fúngico no isolado UEA_007 (<i>Aspergillus niger</i>), indicando atividade hidrolítica.	60

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Classificação da enzimas, segundo IUBMB	6
Tabela 2- Uma proposta para triagem de lipases de interesse biotecnológico, com base nas recomendações gerais de Ogawa e Shimizu (1999)	37
Tabela 3- Programação utilizada no CGMS para análise das reações de resolução.	44
Tabela 4- Materiais e quantidades (g/L) usados nas sete formulações do meio para ensaio em placa com óleo de oliva	46
Tabela 5- Isolados fúngicos utilizados nas reações de triagem da atividade sintética	47
Tabela 6 – Resultados da atividade sintética de lípase	49
Tabela 7 – Síntese do linoleato de dodecila – resultados obtidos por RMN- ¹ H e por CLAE.	53
Tabela 8 – Parâmetros de avaliação da atividade enantiosseletiva ($ee_s\%$, $ee_p\%$, $c\%$ e E) obtidos com duas cepas fúngicas que alcançaram $c\% \geq 5$, tendo a enzima comercial 435 como padrão de referência, em três diferentes tempos de reação (24, 48 e 72 h), utilizando 50 mg de micélio/enzima em hexano (28 °C, 180 rpm)	55
Tabela 9 - Parâmetros de avaliação da atividade enantiosseletiva ($ee_s\%$, $ee_p\%$, $c\%$ e E) obtidos com cepas fúngicas após 120 h de reação, tendo a enzima comercial 435 como padrão de referência, utilizando 50 mg de micélio/enzima em hexano (28 °C, 180 rpm)	56
Tabela 10- Enantiosseletividade das reações de resolução do ibuprofeno mediada por fungos amazônicos ao longo do tempo de reação.	57
Tabela 11 - Resultados do ensaio em placa utilizando óleo de oliva, por grupo.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

A	= absorbância
AM	= Estado do Amazonas
ASP	= asparagina
BDA	= batata-dextrose-agar
c	= grau de conversão da reação
CBA	= Centro de Biotecnologia da Amazônia
CG	= cromatografia gasosa
CG-MS	= cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa
CLAE	= cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	= concentração micelar crítica
CNPq	= Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
c%	= porcentagem de conversão
E	= razão enantiomérica
EC	= Enzyme Commission
ee	= excesso enantiomérico
ee _p	= excesso enantiomérico do produto
ee _s	= excesso enantiomérico do substrato
ES	= enzima-substrato
FAPEAM	= Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FE	= Fase Estacionária
FM	= Fase Móvel
GLU	= ácido glutâmico
HPLC	= High Performance Liquid Chromatography (o mesmo que CLAE)
HTS	= High Throughput Screening (Triagem de Alto Desempenho)
<i>I</i>	= número de spin
IUBMB	= União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
INPA	= Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MBL	= mycelium bound lipase
% p/p	= porcentagem peso por peso
pNF	= <i>p</i> -nitrofenol
PpNF	= palmitato de <i>p</i> -nitrofenila

RMN	= Ressonância Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	= Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN-2D ³	= Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
RNA	= ácido ribonucleico
SER	= serina
6-APA	= ácido 6-aminopenicilânico
UEA	= Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	= Universidade Federal do Amazonas
UV	= Ultra-Violeta
UV-Vis	= Ultra-Violeta e Vísivel
WAE	= Wall Associated Enzyme (Enzima Associada à Parede)
ϵ	= coeficiente de extinção molar

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, é crescente a preocupação mundial com o impacto das ações humanas sobre o meio ambiente. A implementação do conceito de desenvolvimento sustentável nas diversas atividades produtivas tornou-se um imperativo na atualidade. Para a indústria, este tema pode definir a sobrevivência ou não de certos setores ligados à química (SANSEVERINO, 2000). Afortunadamente, a biotecnologia oferece um também crescente potencial para atender à demanda global por processos e produtos em maior sintonia com o conceito de sustentabilidade (OECD, 2001; BUCHHOLZ *et al.*, 2005). Neste sentido, uma das ferramentas mais promissoras da biotecnologia é o campo da biocatálise aplicada, também denominada por alguns autores biotransformação ou tecnologia enzimática (BUCHHOLZ *et al.*, 2005; BOMMARIUS e RIEBEL, 2004).

As vantagens do emprego de enzimas como biocatalisadores em processos industriais têm se mostrado cada vez mais evidentes: grande versatilidade de reações catalisadas, condições brandas de reação, natureza régio, quimio e enantiosseletiva são as mais frequentemente citadas na literatura. (CARVALHO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005) Tais características permitem que as enzimas promovam reações que dificilmente poderiam ser realizadas pelas técnicas da síntese orgânica convencional (SILVA *et al.*, 2005). Também oferecem uma alternativa de maior rendimento em comparação a processos tradicionais de catálise química (CASTRO *et al.*, 2004). Do ponto de vista ecológico, o mais importante é que a alta seletividade e eficiência dos catalisadores biológicos proporcionam reações com poucos subprodutos e com menor consumo de energia, tornando as enzimas uma alternativa ambientalmente mais “limpa” à catálise química tradicional (SCHMID *et al.*, 2001). Muitos setores da indústria são fortes candidatos a fazer – e vários já estão fazendo - uso em larga escala destes aspectos vantajosos da biocatálise.

A produção e/ou beneficiamento de alimentos, papel, couro e tecidos se prestam bem ao emprego da biocatálise, pois tanto os produtos como as matérias-primas consistem em biomoléculas, as quais podem ser sintetizadas, degradadas e modificadas por processos enzimáticos. Para estes fins, muitas enzimas já estão disponíveis comercialmente, e numerosas aplicações industriais têm sido descritas

(VAN BEILEN e LI, 2002). De grande interesse para a indústria farmacêutica é a obtenção de drogas enantiomericamente puras, com ação potencializada, as quais evitam também os riscos do uso de misturas racêmicas, tragicamente ilustrados pelo caso da talidomida (PINHEIRO e FERREIRA, 1998). A constatação de que enzimas podem ser ativas em meio orgânico abriu um imenso campo de aplicações, sobretudo para a indústria farmacêutica de química fina. O uso de enzimas (especialmente lipases) para a síntese de drogas quirais, há anos já está bem estabelecido, e biotransformações são agora aceitas como metodologias usuais na preparação de fármacos deste tipo (GOTOR-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). De fato, a aplicação de sistemas biológicos (enzimas ou células-inteiras) é citada como o mais significativo desenvolvimento no campo da síntese química nos anos recentes (OGAWA e SHIMIZU, 2002).

Poderiam ser citados muitos outros campos em que processos de biotransformação já estão em uso ou, pelo menos, em adiantado estado de desenvolvimento: tratamento de águas residuárias, biorremediação, biopolímeros, ensaios para diagnóstico clínico e produção de biocombustíveis estão entre os mais destacados (BUCHHOLZ *et al.*, 2005; VAN BEILEN E LI e LI, 2002). Em alguns setores da indústria, já é possível detectar uma incipiente mudança de paradigma - os processos de catálise química tradicional tendem agora a ser gradualmente substituídos por processos biocatalíticos. Esta mudança vem ao encontro tanto da demanda pelo aproveitamento das características vantajosas das enzimas como da necessidade de atender ao crescente clamor por tecnologias sustentáveis (FESSNER, 2003).

Os processos que utilizam lipases são especialmente atraentes em função da versatilidade de aplicações destas enzimas (GOMES *et al.*, 2006). Entre os vários segmentos tecnológicos que as empregam, incluem-se indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de surfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindo das indústrias de couro e de papel. Merece destaque especial a sua utilização para obtenção de fármacos em suas formas enantiomericamente ativas (CARVALHO *et al.*, 2005). De fato, as lipases têm sido amplamente reconhecidas como o grupo de biocatalisadores mais importante para aplicações biotecnológicas (JAEGER e EGGERT, 2002; HASAN *et al.*, 2006;

GHANEM, 2007). Elas têm catalisado reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, com extrema simplicidade de processo, qualidade superior de produto final e excelente rendimento (GOMES *et al.*, 2006). Elas se tornaram tão atraentes para emprego em biotransformação porque (1) são estáveis em solventes orgânicos; (2) não requerem co-fatores; (3) possuem uma ampla especificidade para substratos e (4) exibem alta enantiosseletividade (JAEGER e REETZ, 1998; JAEGER e EGGERT, 2002; CASTRO *et al.*, 2004) .

Embora animais e plantas também as produzam, a maioria das lipases atualmente empregadas em aplicações biotecnológicas foram isoladas de microrganismos, sobretudo fungos e bactérias (TORRES *et al.*, 2003; JAEGER e REETZ, 1998). Do ponto de vista econômico e industrial, os microrganismos são preferíveis em relação a animais e plantas como fontes de lipases, devido ao alto custo do isolamento de enzimas a partir de organismos superiores (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004). Lipases comerciais de origem fúngica são geralmente enzimas extracelulares, embora haja considerável evidência de atividade de lipases ligadas ao micélio. A pesquisa destas últimas têm merecido atenção em anos recentes. Lipases ligadas à célula, tanto em fungos como em bactérias, também têm grande estabilidade em solventes orgânicos (TORRES *et al.*, 2003; TORRES *et al.*, 2000; GANDOLFI *et al.*, 2000).

A demanda industrial por novas fontes de lipases tem continuado a estimular o isolamento e a triagem de novos microrganismos lipolíticos (TORRES *et al.*, 2003). Considerando a imensa diversidade biológica amazônica e a importância dos fungos como fornecedores de enzimas, justifica-se a busca de novos biocatalisadores com características especiais e passíveis de aplicação em processos biotecnológicos (CARVALHO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2004). O acesso a uma ampla faixa de tipos de lipases torna-se ainda mais desejável por duas razões adicionais: (1) entre o alto número de lipases citadas na literatura, somente enzimas de poucas espécies demonstraram ter estabilidade e capacidade biossintética adequadas o bastante para permitir o uso rotineiro em reações orgânicas; (2) muitos problemas importantes ainda precisam ser resolvidos em determinados processos industriais, tais como na aplicação de lipases para síntese orgânica utilizando substratos não-naturais para a enzima (CARDENAS *et al.*, 2001).

Tendo em vista a necessidade de processos produtivos mais comprometidos com o ideal de sustentabilidade, este trabalho procurou contribuir para ampliação do conhecimento sobre o potencial biotecnológico dos fungos da Amazônia como potenciais fornecedores de lipases para aplicações no campo da biocatálise.

1.1 BIOCATÁLISE (BIOTRANSFORMAÇÃO)

1.1.1 Conceitos e origens históricas

Biocatálise, numa definição rigorosa, é uma conversão enzimaticamente mediada que envolve *um único passo* (BACAS, 2004). O termo biotransformação é usado em sentido estrito para se referir à conversão de um precursor químico específico, *numa série definida de passos*, em um produto-alvo, utilizando-se para isso enzimas – quer isoladas, quer associadas à células inteiras (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004). Na literatura, entretanto, catálises enzimáticas e biotransformações são frequentemente sumarizadas sob o termo “biocatálise”. A expressão “processo biocatalítico” tem sido empregada para transformações com um ou mais passos catalisados por enzimas (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004). Leuerberger (1990) utilizou “biotransformação” para se referir a quaisquer reações químicas catalisadas por microrganismos ou por preparações enzimáticas derivadas da biomassa. No mesmo sentido, Santos (2005) emprega “biocatálise” referindo-se a todos os processos biotecnológicos que usam catalisadores biológicos em etapas de conversão química. Neste trabalho, os termos biocatálise e biotransformação serão empregados intercambiavelmente, de acordo com estas últimas duas definições.

Tanto enzimas isoladas quanto células inteiras podem ser utilizadas como biocatalisadores (JOHANNES *et al.*, 2006). A decisão final quanto a que tipo de biocatalisador utilizar (enzima isolada ou célula inteira) e em que forma (livre ou imobilizada, purificada ou não) depende de muitos fatores, tais como (1) o tipo de reação, (2) se há cofatores a serem reciclados e (3) a escala na qual a biotransformação será realizada (FABER, 2004).

A maioria das enzimas ou células empregadas como biocatalisadores, tanto na pesquisa acadêmica quanto na indústria, são de origem microbiana. A história do uso empírico de microrganismos em biocatálise remonta há milênios, existindo

antigos papiros egípcios quem mencionam o emprego de leveduras na produção de alimentos e bebidas. Foi somente nos últimos duzentos anos, porém, que a biocatálise foi desenvolvida em base mais científica (GHANEM, 2007)

A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no final do século 18 e começo do século 19, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e sobre a digestão do amido pela saliva. Por volta de 1850, Pasteur propôs que a fermentação alcoólica era catalisada por agentes que ele denominou “fermentos”. O cientista postulou que estes fermentos, mais tarde denominados enzimas, seriam inseparáveis da estrutura das células vivas da levedura. Em 1897, por meio de experimentos com extratos de levedura, Buchner provou que as enzimas continuavam promovendo a fermentação alcoólica *mesmo quando removidas das células* (LEHNINGER *et al.*, 2002). Este fato levou muitos cientistas a tentar o isolamento de numerosas enzimas e a examinar suas propriedades catalíticas para processos químicos tradicionalmente conduzidos com catalisadores sintéticos (SAAD, 2005).

Atualmente, mais de 3.000 diferentes enzimas têm sido identificadas e muitas isoladas em sua forma pura. Várias delas têm sido obtidas na forma cristalina, o que permitiu determinar a sua exata sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional através de cristalografia de raios X e RMN-2D³ (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

O isolamento de enzimas e a investigação de suas propriedades contribuíram muito para o progresso da bioquímica. A compreensão dos aspectos gerais da estrutura e do mecanismo de ação destas notáveis biomoléculas foi também fundamental para o desenvolvimento do campo da biocatálise.

1.1.2 Enzimas – aspectos gerais

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas, isto é, cadeias lineares de aminoácidos que se dobram em estruturas tridimensionais bem definidas e únicas (LEHNINGER *et al.*, 2002; ARNOLD, 1996). Esta sequência de aminoácidos determina como a cadeia se enovela, formando uma estrutura singular para um catalisador em particular. Fundamentais para qualquer processo bioquímico, as

enzimas, na sua complexidade, efetuam um papel realmente impressionante no apoio à vida e na criação de vida nova (ARNOLD, 1996).

A função das enzimas, assim como de qualquer catalisador, é diminuir a energia de ativação de uma reação específica e, dessa forma, aumentar a velocidade da reação sem afetar o equilíbrio desta. Como catalisadores, no entanto, as enzimas são tão extraordinariamente efetivas que podem aumentar a velocidade das reações entre 5 e 17 ordens de magnitude. A característica que distingue uma reação catalisada enzimaticamente é que ela acontece sempre no interior de uma cavidade da enzima denominada sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e sofre a ação da enzima é chamada substrato. A superfície do centro ativo é contornada com resíduos de aminoácidos cujos grupos substituintes se ligam ao substrato, formando o complexo enzima-substrato (ES). Na seqüência, o substrato é transformado no produto de interesse para o organismo (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Conforme o tipo de transformação que realizam sobre o(s) substrato(s) em meio aquoso, as enzimas são agrupadas pela Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em seis classes principais, a cada uma delas possuindo diversas subclasses, conforme mostrado na Tabela 1:

Tabela 1 – Classificação da enzimas, segundo IUBMB

Número	Classe	Tipo de Reação Catalisada	Subclasses representativas
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de H)	Hidrogenases, oxidases, peroxidases etc
2	Transferases	Reações de transferências de grupos funcionais (amina, fosfato, acil, carboxil)	Transaldolases, transacetolases etc
3	Hidrolases	Reações de hidrólise de ligações covalentes	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases etc.
4	Liasas	Adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações por meio de remoção de grupos	Descarboxiliasas, cetoadoliasas, hidroliasas etc.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros	Racemases, epimerases etc
6	Ligases	Formação de ligações do tipo C-C, C-S, C-O e C-N por meio de reações de condensação acopladas à quebra de ATP	Sintetases

(Fonte: LEHNINGER *et al.*, 2002; SAAD, 2005)

Cada uma destas classes admite três níveis de subclasses, de tal modo que o nome sistemático de uma enzima é uma seqüência de quatro dígitos. Exemplificando, o nome formal da lipase é EC 3.1.1.3, indicando que se trata de uma hidrolase (3) que quebra ligações do tipo éster (1) originando ácidos carboxílicos (1) ao agir sobre triacilgliceróis na interface água/óleo (3) (SAAD, 2005). Enzimas hidrolíticas, como as lipases, estão muito ligadas ao catabolismo celular e por isso podem ser encontradas em todos os organismos vivos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Além da extraordinária efetividade na aceleração das reações, as enzimas são notáveis por sua especificidade estereoquímica. A teoria dos três pontos, proposta por Ogston em 1948, é amplamente usada para explicar a enantiosseletividade das enzimas. Para que seja possível discriminar entre seus enantiômeros, um substrato quiral deve ficar preso no espaço em três dimensões. As enzimas devem ter, portanto, pelo menos três pontos de ataque ao substrato no sítio ativo (BARALDI e CORRÊA, 2004). Sendo assim, a formação do complexo ES só é possível para um dos enantiômeros, com a configuração correta definida no sítio ativo pelos três pontos diferentes de interação. Os resíduos de aminoácidos da enzimas que interagem com o substrato nestes três pontos compõe a chamada “tríade catalítica”.

A maior parte do poder catalítico das enzimas é derivada, em última instância, da energia livre liberada na formação de múltiplas interações fracas (não-covalentes) no complexo ES. A interação entre o substrato e a enzima neste complexo é mediada pelas mesmas forças que estabilizam a estrutura protéica, incluindo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas. Com efeito, as interações não-covalentes são as responsáveis pela força e especificidade do reconhecimento entre as biomoléculas (LEHNINGER *et al.*, 2002). Nos seres vivos, as enzimas atuam em meio aquoso, e a água participa (direta ou indiretamente) em todas as interações não-covalentes que mantêm a conformação nativa, cataliticamente ativa, das enzimas (ZACKS e KLIBANOV, 1985).

Em razão do papel fundamental que a água possui para a manutenção da atividade enzimática nos seres vivos, com o tempo surgiu a noção de que, fora do ambiente aquoso, uma enzima teria sua conformação nativa drasticamente

distorcida e se tornaria inativa. Segundo esta noção, o uso de enzimas em meio orgânico – o qual é o mais utilizado para as reações de síntese química – seria inviável. A refutação de tal conceito abriu oportunidades totalmente novas para o emprego da biocatálise em processos produtivos (ZACKS e KLIBANOV, 1985).

1.1.3 Enzimas em meio orgânico

Embora enzimas tenham sido usadas em escala industrial desde a década de 1950, e a sua utilização isolada na transformação de compostos orgânicos seja conhecida há mais de 100 anos, a plena aceitação de sua utilidade em biocatálise sintética foi bem mais recente (OECD, 2001; JAEGER e EGGERT, 2002). A idéia de que somente o meio aquoso era propício para manter a conformação cataliticamente ativa restringia drasticamente o uso de enzimas em síntese orgânica, pois os substratos empregados em reações sintéticas são frequentemente hidrofóbicos. Outra desvantagem da utilização do meio aquoso para síntese orgânica é a ocorrência de reações laterais como hidrólise, racemização e polimerização. Ademais, a remoção da água, para recuperação dos produtos da reação, é lenta e onerosa devido ao seu alto ponto de ebulição e grande calor de vaporização. (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; GHANEM, 2007)

Os trabalhos de Zacks e Klibanov, em meados dos anos 1980, demonstraram conclusivamente que enzimas podem ser ativas em meio orgânico, em condições microaquosas (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004). O raciocínio empregado por estes pesquisadores foi notavelmente simples e persuasivo: a questão real não é se a água é necessária para o funcionamento da enzima, mas *de quanta* água ela precisa. Uma molécula enzimática provavelmente só interage com apenas poucas camadas de átomos de água imediatamente à sua volta. Assim, existindo uma camada de solvatação, contribuindo para a manutenção da sua conformação cataliticamente ativa, a enzima não seria forçosamente inativada se todo o restante da água fosse substituído por um solvente orgânico. Experimentos com lipases de três diferentes fontes confirmaram este raciocínio (ZACKS e KLIBANOV, 1985).

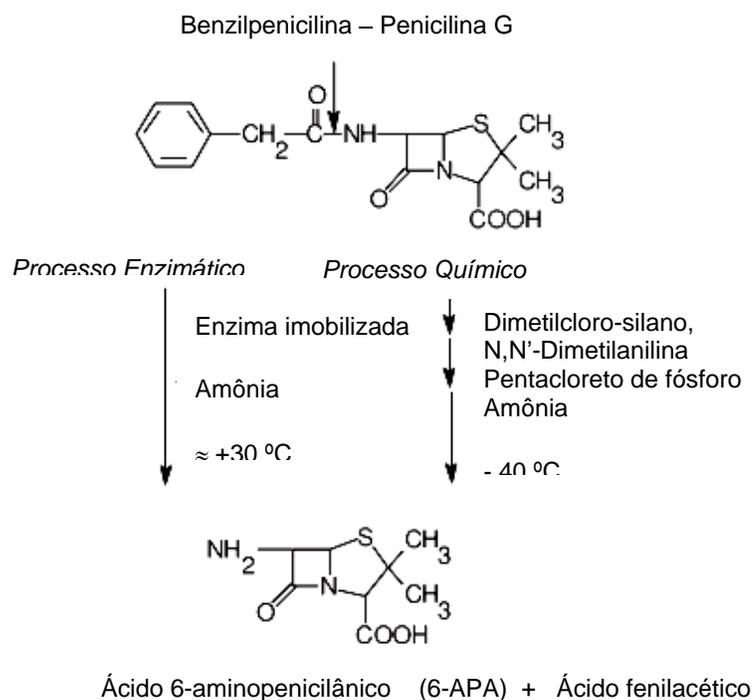
A partir de então, houve um aumento exponencial do interesse na área de biotransformação (SILVA, 2005). Métodos de biotransformação que utilizam enzimas em solventes orgânicos são atualmente bem conhecidos, e bastante úteis em

síntese orgânica (CONTI *et al.*, 2001). A biocatálise amadureceu o bastante para se tornar um padrão tecnológico, fato que se reflete no número de processos de biotransformação funcionando em escala industrial (STRAATHOF *et al.*, 2002). Este número tende a aumentar, ao passo que as vantagens do emprego de enzimas são cada vez mais reconhecidas e suas limitações para aplicação em grande escala vêm sendo superadas.

1.1.4 Vantagens e limitações

A utilização de enzimas em síntese orgânica tem vantagens importantes em relação a muitas reações da química orgânica tradicional. Catalisadores químicos são pouco versáteis e requerem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminada, que requerem uma etapa posterior de purificação (CASTRO *et al.*, 2004). O emprego de catalisadores, reagentes e solventes químicos de elevada toxicidade gera resíduos difíceis de reciclar, comprometendo a sustentabilidade do processo. Em contraste, as enzimas foram projetadas para atuar como catalisadores nas condições brandas existentes no interior dos seres vivos (cerca de 37°C, 1 atm de pressão e pH em torno de 7,0), com excelente balanço energia/eficiência. (SILVA *et al.*, 2005). Uma comparação entre dois processos - um baseado na catálise química tradicional e outro na biocatálise - para a obtenção de um produto de interesse farmacológico (penicilinas semisintéticas) é mostrado na **Figura 1** (pg. 10).

A mais importante vantagem das enzimas como biocatalisadores é a sua inigualável seletividade (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004). Elas são capazes de atuar sobre um grupo funcional específico, discriminando-o dentre outros presentes no substrato, levando a produtos reacionalmente mais “limpos” (quimiosseletividade); podem distinguir entre grupos funcionalmente idênticos que estão na mesma molécula, mas em diferentes posições, agindo preferencialmente sobre um deles (regiosseletividade); numa mistura racêmica, reconhecem a diferença na orientação espacial dos átomos dos enantiômeros e catalisam reações preferencialmente com um deles em detrimento do outro (enantiosseletividade) (LOUGHLIN, 2000).



Na produção de 500 t de 6-APA, são utilizados

Para hidrólise

<i>Processo Enzimático</i>	<i>Processo Químico</i>
1000 t penicilina G	1000 t penicilina G
45 t amônia	160 t amônia
≈ 1 t enzima imobilizada	800 t N,N'-dimetilanilina
10000 m ³ água	600 t pentacloreto de fósforo
	300 t dimetilcloro-silano
	4200 m ³ diclorometano
	4200 m ³ n-butanol

Para recuperação (*downstream*)

<i>Processo Enzimático</i>	<i>Processo Químico</i>
acetona	ácido hidroclórico
bicarbonato de amônia	acetato de butila

Figura 1 – Comparação entre o antigo (químico) e o novo (enzimático) processo para hidrólise da penicilina G. O produto, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), é usado para a síntese de penicilinas semisintéticas que possuem cadeias laterais outras que não sejam o ácido fenilacético. No processo enzimático, o subproduto ácido fenilacético pode ser reciclado na produção de penicilina por fermentação. (fonte: Tischer, 1990, *apud* Bucholz *et al.*, 2005)

Esta refinada especificidade das enzimas vem ao encontro de um dos pilares da chamada “química verde” (ecologicamente correta), o princípio da “economia atômica”: a reação ideal é aquela em que toda a massa dos reagentes é incorporada ao produto. A vantagem desta reação seria a menor geração de resíduos e uma utilização mais efetiva das matérias-primas utilizadas. Além do evidente ganho em termos ambientais, economia atômica significa, do ponto de vista empresarial, aumentar a eficiência do processo e diminuir custos com separação, purificação e tratamento de resíduos (SANSEVERINO, 2000).

É preciso reconhecer, porém, que desenvolver um processo biocatalítico economicamente viável em escala industrial requer a superação de consideráveis obstáculos técnicos. A estabilidade do biocatalisador, ou seja, a capacidade de reter sua atividade através do tempo, é indubitavelmente o fator limitante na maioria dos bioprocessos (ILLANES, 1999). Enzimas são moléculas inerentemente lábeis - uma mudança conformacional de menos de um Angstrom pode causar um declínio abrupto de sua atividade (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004). Sendo geralmente proteínas de alto peso molecular, elas tendem a ser sensíveis à temperatura, pH, oxidação, agitação mecânica e, em sistemas multienzimáticos, ao ataque de outras enzimas, como proteases. Em meio aquoso, elas comumente mantêm sua conformação ativa em uma faixa estreita de temperatura e pH, e oscilações para além desta faixa resultam na sua inativação (KOLBL *et al.*, 1988). Muitas enzimas são também suscetíveis à inibição por excesso de produto ou de substrato (JOHANNES *et al.*, 2006).

O problema da estabilidade das enzimas empregadas em bioprocessos tem sido abordado sob diversas perspectivas. Uma delas é a estabilização operacional do biocatalisador. Várias estratégias tem sido desenvolvidas para aumentar a estabilidade operacional: uso de aditivos estabilizantes, derivatização, modificação química da estrutura enzimática, cristalização, engenharia do meio reacional e imobilização são algumas das estratégias citadas na literatura. Destas, a imobilização é talvez a mais usada (ILLANES, 1999).

Imobilizar uma enzima significa aderi-la a algum tipo de suporte insolúvel (géis ou membranas poliméricos, microcápsulas etc). O uso de enzimas puras, não-imobilizadas, pode ser dispendioso, e seu descarte após o uso é economicamente

inviável. Além disso, a sua recuperação do meio reacional pode ser difícil. A fim de evitar a perda de sua eficiência no decorrer do processo e/ou facilitar sua recuperação e reutilização ao final deste, enzimas isoladas são frequentemente imobilizadas. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Entretanto, têm sido verificado que o processo de imobilização pode aumentar ou diminuir a atividade e a estabilidade da enzima (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Mesmo quando bem-sucedida, a imobilização é sempre um passo adicional que também onera o emprego do biocatalisador, pois é preciso considerar o custo do material usado como suporte (GOMES *et al.*, 2006).

Uma alternativa para contornar estas limitações é o uso de enzimas ligadas à célula ou micélio. Elas atuam no meio extracelular, sendo consideradas enzimas naturalmente imobilizadas. Seu emprego permite o uso direto da biomassa, eliminando assim a necessidade de procedimentos de isolamento, purificação e imobilização, os quais encarecem significativamente a utilização do biocatalisador. Vários trabalhos na literatura têm focado a procura de microrganismos com lipases ligadas à célula, refletindo a importância desta subclasse de enzimas hidrolíticas para o campo da biocatálise (ROMERO, BAIGORI e PERA, 2007; ROMANO *et al.*, 2004; TORRES *et al.*, 2003, TORRES *et al.*, 2000; GANDOLFI *et al.*, 2000).

1.2 LIPASES

1.2.1 Classificação e estrutura

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas entre as hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, sendo consideradas por muitos autores um tipo especial de esterases (EC 3.1.1) (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Estas enzimas são amplamente encontradas em animais, plantas e microrganismos. Nos eucariotos pluricelulares, elas participam em diversas vias metabólicas dos lipídios, em processos de digestão, absorção, reconstituição e metabolismo lipoprotéico (SHARMA *et al.*, 2001).

O critério cinético têm sido tradicionalmente aplicado para discriminar entre esterases genéricas (EC 3.1.1) e as “verdadeiras” lipases (EC 3.1.1.3). Esterases apresentam o clássico comportamento cinético michaeliano, ou seja, o aumento da atividade enzimática é proporcional ao aumento da concentração do substrato, até a saturação. Lipases, por outro lado, frequentemente exibem um comportamento cinético diferenciado, denominado “ativação interfacial”. Este comportamento consiste na ausência de atividade enquanto o substrato está presente em estado monomérico, e súbito aumento desta quando a concentração do substrato ultrapassa o limite de solubilidade e passa a existir uma interface lipídio/água. O aumento da atividade de uma lipase seria, portanto, relacionado primariamente com o aumento da área de interface e dependente de uma concentração mínima de substrato (concentração micelar crítica - CMC) (**Figura 2**).

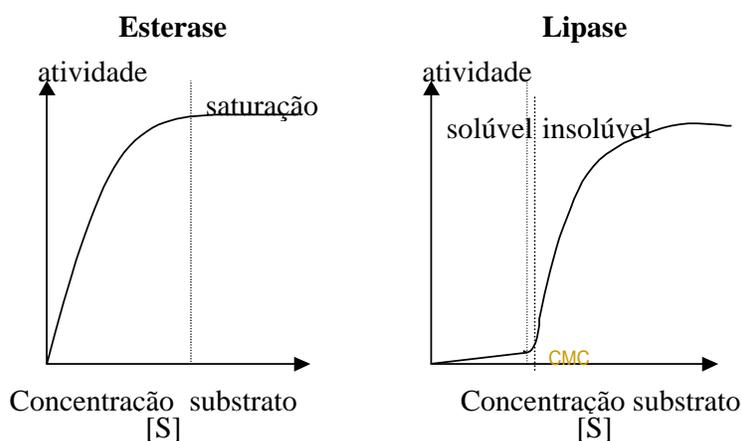


Figura 2 – Comparação entre o comportamento cinético de esterases (cinética michaeliana) e de lipases que possuem ativação interfacial. Adaptado de FABER, 2004

A elucidação das estruturas tridimensionais de algumas lipases por cristalografia de raio X possibilitou uma maior compreensão a respeito do mecanismo de ação destas enzimas. As lipases são α/β -proteínas, formadas por um domínio de folhas β -pregueadas, dispostas paralelamente, interligadas e circundadas por α -hélices. (JAEGER e REETZ, 1998). Os resíduos catalíticos essenciais à atividade enzimática variam entre as espécies, sendo os mais frequentes formados pelas tríades SER-GLU-HIS e SER-ASP-HIS. O resíduo de

serina do sítio catalítico encontra-se localizado na volta entre uma α -hélice e uma folha β , sendo conhecido como “cotovelo” nucleofílico, conforme exemplificado pela lipase de *Burkholderia cepacea* (**Figura 3**) (EGGER *et al.*, 2001 *apud* TICOM, 2003).

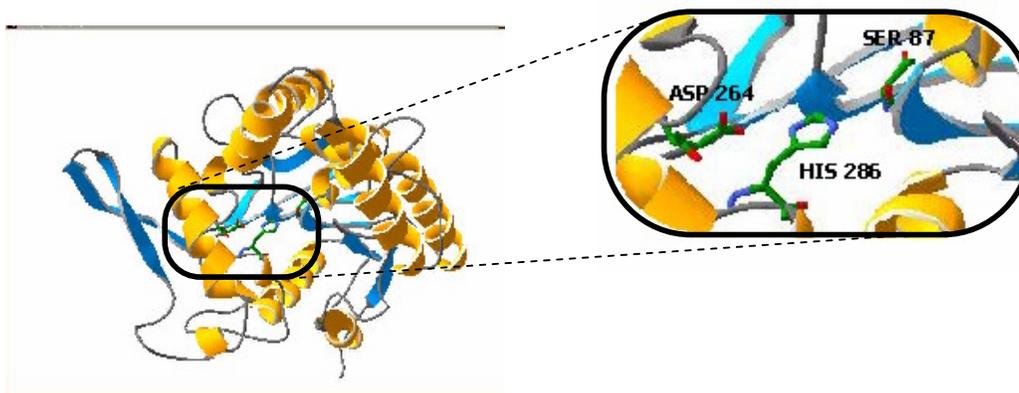


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. (Fonte: LISBOA, 2006)

Nas primeiras estruturas elucidadas, o sítio ativo encontrava-se protegido por uma cadeia polipeptídica similar a uma tampa, formada por resíduos hidrofóbicos, tornando-o inacessível ao substrato. (LAWSON *et al.*, 1994; BRADY *et al.*, 1990). Quando a enzima é submetida a meios aquosos, a exposição do sítio é termodinamicamente desfavorável, permanecendo então na conformação “fechada” ou inativa. No entanto, na presença de substratos hidrofóbicos (interfaces) observa-se uma mudança na estrutura da enzima para a conformação ativa ou “aberta”, tornando o sítio ativo da enzima totalmente acessível ao substrato, explicando assim o fenômeno da ativação interfacial (BRADY *et al.*, 1990) A presença da tampa na estrutura da enzima e a propriedade da ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização das lipases (LIMA, 2004).

Mais recentemente, entretanto, foi observado que a presença da tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Verificou-se que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, todas as quais apresentam a tampa na sua estrutura, não exibem a ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”,

não apresentam tampa e não precisam de interface para exercer sua atividade hidrolítica.

Esta observação levou à conclusão de que a presença da tampa e a ativação interfacial são critérios inadequados para classificar uma enzima como lipase (JAEGER e REETZ, 1998).

Em razão do exposto, trabalhos recentes tem adotado como critério o *tamanho da cadeia acila resultante da hidrólise do acilglicerol* para distinguir entre lipases e esterases. As lipases têm sido caracterizadas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa (com mais de 10 átomos de carbono). Enzimas que hidrolisam apenas acilgliceróis com cadeias de tamanho inferior a 10 átomos de carbono são consideradas genericamente como esterases (LIMA, 2004).

1.2.2 Aplicações biotecnológicas

Tanto a atividade hidrolítica natural das lipases como a sua atividade sintética em meio orgânico tem sido aplicadas em diversos segmentos industriais.

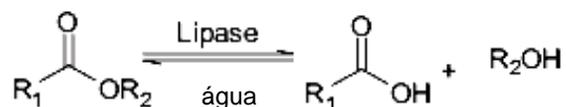
Do ponto de vista comercial, o campo de aplicação mais importante para a atividade hidrolítica das lipases ainda é o seu uso como aditivo em detergentes, tanto domésticos como industriais. Em 1996, estimava-se que mais de 1000 toneladas de lipases eram comercializadas todo ano para emprego na área de detergentes (HASAN *et al.*, 2006).

Entretanto, a capacidade hidrolítica das lipases também tem encontrado aplicações interessantes em vários outros campos, como, por exemplo, o uso de lipases no tratamento de efluentes, para a remoção do óleo presente nas águas residuárias de fábricas, restaurantes e residências, ou originado de indústrias petrolíficas. Os lipídios contidos nestes efluentes interferem negativamente nos sistemas de tratamento, aumentando o tempo de retenção nas lagoas de estabilização e exigindo o uso de maiores quantidades de produtos flocculantes. A utilização de lipases reduz o nível de sólidos suspensos, desobstruindo tubulações e aumentando a vida útil de equipamentos (MENDES e CASTRO, 2005).

Algumas das reações catalisadas por lipases que encontram aplicação em biocatálise são mostradas na **Figura 4**.

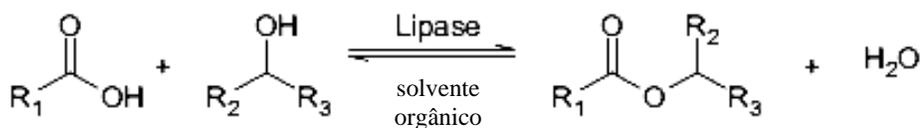
Meio aquoso

1. Hidrólise



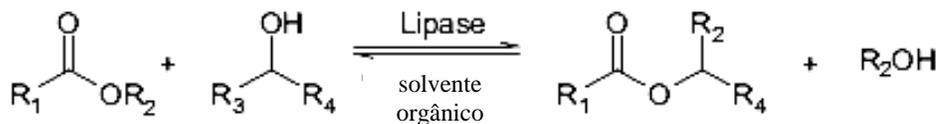
Meio orgânico

2. Esterificação

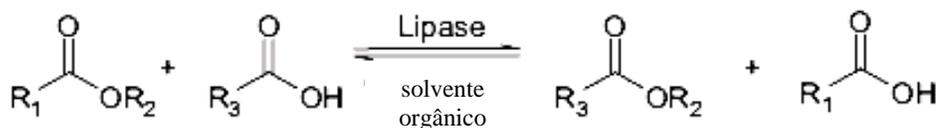


3. Transesterificação

a) alcólise



b) acidólise



4. Interesterificação

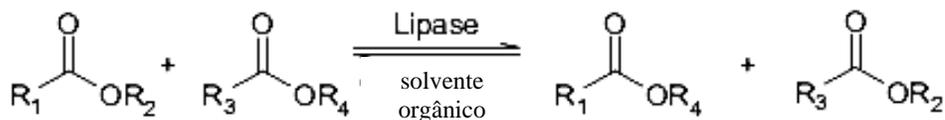


Figura 4 – Algumas das principais reações catalisadas por lipases que encontram aplicação em biocatálise – Fonte: Ghanem, 2007

No setor de alimentos e nutracêuticos, as lipases são as enzimas de escolha para o processamento de óleos e gorduras. O grau de insaturações e a posição destas, além do tamanho da cadeia, influenciam não apenas nas propriedades físico-químicas de um dado triglicerídeo, mas também nos seus valores nutricionais

e sensoriais. O emprego de lipases para a hidrólise seletiva de ácidos graxos, seguida pela síntese de novas ligações éster, possibilita a construção de triacilgliceróis com características distintas das originais e de interesse para um dado alimento. Assim, pela ação de uma ou mais enzimas lipolíticas, um triacilglicerol que inicialmente possuía, por exemplo, resíduos dos ácidos palmítico-oléico-esteárico, pode tornar-se esteárico-oléico-esteárico, com modificação das propriedades nutricionais do produto (JAEGER e REETZ, 1998; PANDEY *et al.*, 1999).

A atividade sintética enantiosseletiva das lipases em meios não-aquosos tem sido cada vez mais empregada em processos das indústrias química e farmacêutica. A síntese de blocos de construção enantiopuros é uma importante tarefa para estas indústrias, e a principal razão para a notável expansão do campo da biocatálise, com as lipases à frente deste desenvolvimento (JAEGER e EGGERT, 2002) .

Lipases podem ser utilizadas para resolver misturas racêmicas e para sintetizar blocos de construção quirais para fármacos, agroquímicos e pesticidas. Um importante processo de resolução racêmica de álcoois por esterificação com lipases em meio orgânico, para a obtenção de intermediários enantiomericamente puros, foi estabelecido pela empresa alemã BASF (**Figura 5**). A produção é da escala de milhares de toneladas por ano e o processo é aplicado a uma ampla variedade de álcoois e aminas (GHANEM, 2007; SCHMID *et al.*, 2001)

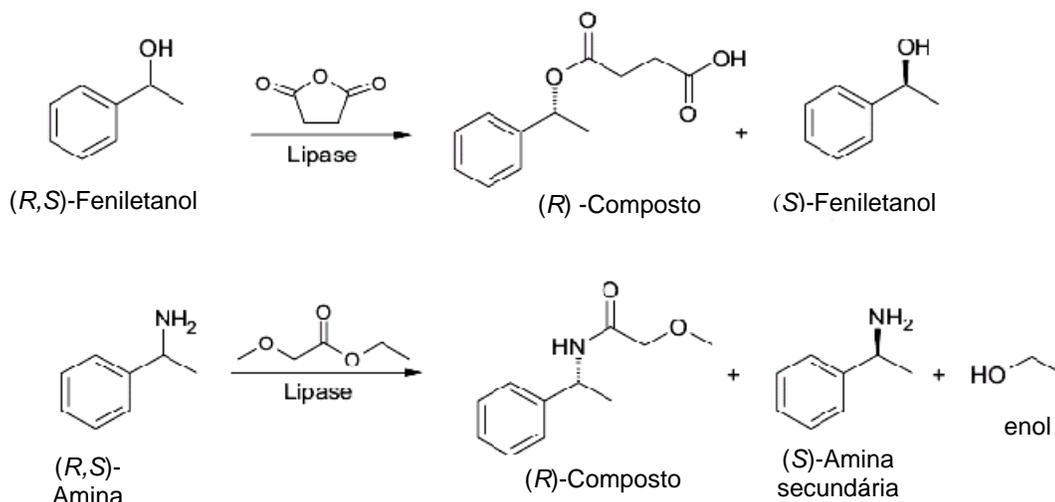


Figura 5 - Alguns dos passos biocatalíticos usando lipases desenvolvidos pela BASF: resolução cinética catalizada por lipase de (a) feniletanol usando anidrido succínico e (b) amina secundária usando metoxi-acetato de etila como doador de acila. Fonte: Ghanem, 2007

A quiralidade é um fator chave na eficácia de muitas drogas. Diversos estudos demonstraram que a atividade farmacológica de drogas racêmicas encontra-se principalmente em um dos enantiômeros (eutômero), enquanto o outro (distômero) pode interagir com diferentes receptores, promovendo efeitos colaterais (PANDEY *et al.*, 1999). Como exemplo, os profenos (ácidos 2-aril-propriônicos) são um importante grupo de antiinflamatórios não-esteroidais, que apresentam atividade farmacológica principalmente na forma de (S)-enantiômero. Membros importantes desta família são o ibuprofeno e o naxopreno. Segundo Pandey *et al.* (1999) a forma S do naxopreno é 28 vezes mais ativa que a forma R. No caso do ibuprofeno, há trabalhos na literatura farmacológica indicando que o (S)-enantiômero é 160 vezes mais ativo na síntese *in vitro* de prostaglandina do que o (R)-enantiômero correspondente (CARVALHO *et al.*, 2005).

Carvalho *et al.* (2005) utilizaram a lipase liofilizada de *Aspergillus niger* para a resolução do (R,S) ibuprofeno com 1-propanol em meio orgânico (isooctano). Embora os valores de excesso enantiomérico de (S)-ibuprofeno obtidos pelo grupo de Carvalho tenham sido baixos (ee = 6,1%), acredita-se que o aumento da oferta de novas lipases pode contribuir para a resolução enantiomérica deste e de outros importantes compostos de interesse farmacológico.

Dentre as lipases disponíveis comercialmente e aplicadas em processos industriais, várias foram originalmente isoladas de fungos tais como *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*. (JAEGER e REETZ, 1998). A bioprospecção deste grupo de organismos continua sendo uma promissora fonte de novas enzimas empregáveis em biocatálise, ressaltando a importância dos fungos para a biotecnologia.

1.3 FUNGOS

Fungos são seres eucarióticos heterotróficos classificados pelos biólogos modernos em um reino próprio, o Reino *Fungi*, baseado sobretudo no seu modo de nutrição absorvitivo. Os fungos secretam uma ampla gama de poderosas enzimas em seu ambiente e então absorvem estes nutrientes “pré-digeridos” para o interior de suas células. A diversidade dos fungos abrange desde bolores e leveduras microscópicos até cogumelos e trufas macroscópicos (BENNET, 1998)

Diferentemente dos outros eucariotos heterotróficos, os fungos apresentam uma parede celular quitinosa envolvendo a membrana plasmática.

Embora no passado a micologia tenha sido considerada um ramo da botânica, a evidência indica que os fungos estão filogeneticamente mais próximos dos animais do que das plantas (GUARRO *et al.*, 1999). Constituem um grupo muito grande e heterogêneo, encontrado virtualmente em qualquer nicho ecológico (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Os fungos podem apresentar sua soma (fase vegetativa) na forma de duas unidades básicas: a levuriforme e a hifal. Nos fungos levuriformes tem-se células únicas, delimitadas e pequenas, ao contrário das hifas que são células extremamente polarizadas, na forma de tubos que continuamente estendem-se em suas extremidades. O conjunto de hifas é denominado micélio, que a olho nu visualiza-se como um emaranhado de fios delgados (filamentos), coloridos ou não, dependendo da espécie (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Desde tempos pré-bíblicos, tanto fungos filamentosos como leveduras têm sido usados pelo homem no preparo de vários produtos, tais como cerveja, vinho, pão e queijo. Atualmente, fungos são usados em muitos processos industriais, tais como a produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, álcoois poliídricos, pigmentos, lipídios e glicolipídios (ADRIO e DEMAIN, 2003).

Os fungos filamentosos sintetizam uma variedade de enzimas hidrolíticas. Várias espécies deles são usadas para a produção de enzimas industrialmente importantes, tais como proteases, carboidrases e lipases (FRIEDRICH *et al.*, 1999). Estes fungos têm um grande potencial para produzir muitos tipos de lipase extracelular, as quais são geralmente usadas como enzimas purificadas. Entretanto, muitas das aplicações práticas destas lipases fúngicas extracelulares são limitadas por desvantagens econômicas causadas por complexos processos de purificação e por sua labelidade (HAMA *et al.*, 2006).

Por outro lado, desde o final da década de 1970, alguns pesquisadores vêm postulando a presença de enzimas funcionalmente relevantes, tanto sintéticas quanto hidrolíticas, associadas à parede celular dos fungos, denominadas por Rast *et al.* (2003) como enzimas associadas à parede (*wall-associated enzymes*, WAEs). A princípio acreditava-se que enzimas detectadas na parede celular eram simplesmente enzimas em rota de secreção para o meio, ou então meros artefatos devido à ruptura da célula. Nas últimas três décadas, trabalhos testando a

atividade catalítica direta de frações de paredes celulares fúngicas relataram a existência de WAEs pertencentes às classes bioquímicas oxidorreductase, hidrolase e transferase (RAST *et al.*, 2003). Gaspar *et al.* (2001), trabalhando com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus mosseae*, encontraram forte evidência bioquímica tanto de atividade hidrolítica quanto de atividade sintética de lipídios no micélio externo deste fungo, o que, segundo os autores, claramente indica a presença de um sistema enzimático ali.

Um revisão da literatura pertinente mostra que há relativamente poucos trabalhos sobre lipases naturalmente imobilizadas, isto é, lipases associadas com o micélio ou parede celular, as quais Loo *et al.* (2007) denominam lipases ligadas ao micélio (*mycelium-bound lipases*, MBLs). A atividade de lipases ligadas ao micélio pode ser diretamente explorada tanto para a síntese quanto para a hidrólise de ésteres (CONVERTI *et al.*, 2005). Para as lipases naturalmente ligadas, a estrutura da célula pode atuar como uma matriz natural capaz de proteger as enzimas da possível ação negativa de agentes externos, propiciando um efeito análogo àquele exercido por uma matriz comum usada para a imobilização de enzimas purificadas, ou seja, a minimização da perda da atividade (ROMERO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007). Ademais, lipases ligadas à célula são mais estáveis em solventes orgânicos (WANG *et al.*, 2007)

Lisboa (2006) avaliou fungos endofíticos, fitopatogênicos e degradadores de madeira da região amazônica como potenciais fornecedores de MBLs. Estes podem vir a ser uma promissora fonte de novas enzimas para aplicações em biocatálise.

1.3.1 Fungos Endofíticos

Fungos endofíticos são capazes de colonizar o interior de tecidos saudáveis da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem lhe causar danos aparentes (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; SOUZA *et al.*, 2004). Sendo considerados inócuos às plantas, à princípio não houve grande interesse em estudá-los. A medida que se verificou que alguns destes microrganismos conferiam vantagens aos seus hospedeiros, eles passaram a ser objeto de pesquisas mais aprofundadas (SERAFINI, BARROS e AZEVEDO, 2002).

Observa-se que esses fungos se associam de forma mutualística com as plantas, recebendo nutrientes e proteção do hospedeiro enquanto que este se torna mais competitivo em ambientes estressados e tem sua resistência a patógenos aumentada pela ativação do seu sistema de defesa. O fato de que muitos fungos endofíticos produzem metabólitos capazes de inibir o desenvolvimento de patógenos e/ou pragas, e de apresentarem propriedades medicinais despertou o interesse de vários laboratórios pela identificação desses compostos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

1.3.2 Fungos Fitopatogênicos

A fim de colonizar a planta hospedeira, o fungo patogênico precisa inicialmente quebrar o seu sistema de defesa. Para isso produz enzimas hidrolíticas (cutinases, celulases, ligninases, etc.) que rompem a cutícula e a parede da célula hospedeira; toxinas que reduzem ou inibem completamente a atividade das células da planta e/ou produzem substâncias específicas de vegetais (ex: hormônios), quebrando o equilíbrio fisiológico da célula e causando distúrbios no crescimento e na diferenciação celular da planta (LISBOA, 2006).

1.3.3 Fungos degradadores de madeira

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos por fungos degradadores de madeira é atribuída à ação de uma série de enzimas e compostos de baixa massa molar extracelulares. Uma das classes envolvidas na biodegradação da madeira são as hidrolases específicas para clivar ligações glicosídicas presentes nos polissacarídeos dos materiais lignocelulósicos (LISBOA, 2006).

1.4 TRIAGEM DA BIODIVERSIDADE MICOLÓGICA DA AMAZÔNIA EM BUSCA DE NOVOS BIOCATALISADORES

1.4.1 A extensão da diversidade micológica

O sucesso dos processos biotecnológicos está diretamente relacionado com a diversidade dos microrganismos e das moléculas que eles produzem como resultado de seu metabolismo primário e secundário. O aumento da diversidade de compostos químicos para os diferentes setores industriais está, assim, associado com a exploração da diversidade microbiana e são muitos os benefícios esperados como resultado desta exploração (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O Brasil detêm cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente na floresta amazônica, a maior floresta tropical do planeta e fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Apesar da imensa biodiversidade da Amazônia, as espécies que a compõe e suas relações filogenéticas são ainda pouco conhecidas, e ainda menos os seus microrganismos e suas interações com outros seres (SOUZA *et al.*, 2004).

Os fungos, em particular, são um grupo de organismos de enorme potencial como fornecedores de enzimas, potencial este ainda amplamente inexplorado. Em 1991, Hawksworth estimou a magnitude da diversidade fúngica nos ecossistemas mundiais em 1,5 milhão de espécies (HAWKSWORTH, 2004). Vários estudiosos do assunto se mostraram céticos em relação a essa previsão, principalmente pela falta de dados sobre a extensão da descoberta de novos fungos nos trópicos. Dreyfuss e Chapela (1994), por exemplo, estimaram em 1,3 milhão o número de espécies fúngicas endófitas nos trópicos ainda para serem descobertas. De acordo com estes autores, *somente* os fungos endofíticos dos trópicos sugerem que a estimativa inicial de 1,5 milhão de espécies subestima a diversidade biológica. Apesar do grande potencial micológico da Amazônia, poucos estudos tem sido feitos na área de enzimas com potencial industrial advindas de fungos amazônicos (CASTRO e SILVA, 2002).

1.4.2 Métodos de triagem da biodiversidade

Dentre toda a diversidade micológica existente, é muito provável que, para um processo biocatalítico em particular, somente uma faixa bem estreita de fungos/enzimas satisfaça os requisitos específicos daquele processo. Em muitos casos, os substratos usados em processos industriais são compostos artificiais, e enzimas capazes de catalisar reações adequadas para estes processos são ainda desconhecidas. Assim, a triagem (*screening*) de novas enzimas que sejam capazes de catalisar reações de interesse biotecnológico é constantemente necessária. Ademais, a descoberta de novas enzimas provê indicações para o planejamento de novos processos enzimáticos (OGAWA e SHIMIZU, 1999).

Em anos recentes, foram desenvolvidos métodos para a triagem de microrganismos não-cultiváveis em laboratório, através da abordagem metagenômica. Nesta abordagem, microrganismos colhidos de um ambiente natural (tal como amostras de solo) são concentrados por filtração, têm seu DNA extraído diretamente (sem passar pela etapa de cultivo) e uma variedade de atividades enzimáticas é testada a partir de uma biblioteca de genes do DNA total na amostra. Esta abordagem pode vir a se tornar um método superior para a descoberta de novas enzimas (OGAWA e SHIMIZU, 1999).

Entretanto, neste tipo de triagem, a enzima é totalmente separada de sua função original no microrganismo. Encontrar uma nova enzima significa encontrar uma nova função microbiana – neste respeito, o *screening* de uma biblioteca de genes perde de vista a função original da enzima no contexto da bioquímica do microrganismo.

Por outro lado, técnicas clássicas de *screening*, as quais incluem estratégias de isolamento e cultivo de microrganismos, permanecem ferramentas importantes justamente por empregarem células vivas que mantêm suas funções originais. Há ainda um grande número de microrganismos que ainda não foram examinados quanto a sua habilidade de catalisar reações específicas, e o leque de reações catalisadas por enzimas obtidas da triagem direta da biodiversidade certamente continuará a se expandir (OGAWA e SHIMIZU, 1999).

O *screening* é um passo-chave no desenvolvimento dos processos de biocatálise. Há três estágios principais na definição de uma estratégia de *screening*

tradicional: 1) planejamento do processo e a definição do tipo de atividade enzimática desejada; 2) definição de quais grupos de microrganismos passarão pela triagem; e 3) planejamento de um apropriado, conveniente e sensível ensaio enzimático que permita a triagem do maior número possível de microrganismos (OGAWA e SHIMIZU, 1999).

1.4.3 Ensaio enzimáticos para a detecção de atividade de lipase

Ensaio enzimáticos são protocolos experimentais que permitem “visualizar” as transformações químicas catalizadas por enzimas (GODDARD e REYMOND, 2004). Estas transformações podem ser reveladas, na prática, mediante um sinal luminoso, mudança na cor da amostra, crescimento microbiano diferenciado devido à seleção biológica, produção de calor ou precipitação do produto da biotransformação, entre outros meios (CHEN, 2006).

Um princípio fundamental para o planejamento de um ensaio enzimático eficiente é que ele deve reproduzir bem de perto a reação catalítica a qual se pretende empregar no processo biotecnológico visado. Independente da aplicação para a qual foi projetado, um ensaio enzimático deve ser simples, robusto e ter baixa ocorrência de erros (falsos-positivos e falsos-negativos). A disponibilidade e o preço dos reagentes necessários são também fatores a considerar na decisão sobre que ensaio utilizar (GODDARD e REYMOND, 2004).

Diferentes métodos de ensaio de lipases tem sido desenvolvidos para vários propósitos. No escopo deste trabalho, são de especial interesse ensaios para atividade hidrolítica em meio aquoso e para atividade sintética em meio orgânico.

1.4.3.1 Detecção de atividade hidrolítica

Trabalhos de triagem de microrganismos como fontes de lipases frequentemente descrevem a realização de uma seleção preliminar da atividade hidrolítica associada às cepas (TORRES *et al.*, 2003; GANDOLFI *et al.*, 2000) A seleção primária tem peso significativo no processo de triagem de microrganismos específicos, permitindo identificar aqueles que possuem a capacidade de produzir o metabólito de interesse. Em geral esta seleção primária é realizada pelo cultivo dos

microrganismos em meio de cultura com ágar grau bacteriológico, em placas de Petri (COLEN, 2006).

Os métodos de observação direta em placa se baseiam frequentemente na formação de zonas claras ou turvas (opacas) em torno das colônias (ou inóculo). O substrato que mais tem sido usado para detecção de atividade de lipases é a tributirina. Ao ser hidrolisada, a tributirina gera dibutirina, monobutirina, glicerol e ácido butírico, todos eles solúveis em água. Sendo usada na forma de emulsão (preparada no ágar ainda fluido), permite a detecção de halo claro em fundo opaco. Apesar dos inconvenientes do uso da tributirina (ela não é substrato específico para lipase, podendo ser hidrolisada também por esterases), alguns autores tem recomendado seu emprego em procedimentos de seleção primária de microrganismos com enzimas lipolíticas, mas com posterior confirmação com outros substratos lipídicos de maior especificidade para lipases (COLEN, 2006).

A trioleína, embora seja um triacilglicerol de cadeia longa e, como tal, um substrato específico para lipases, não tem sido recomendada para detecção lipolítica em placa de Petri, devido à dificuldade de se notar a zona de lipólise. Alternativamente, o óleo de oliva, após ter sido purificado em coluna de alumina neutra para remoção de ácidos graxos livres, pode ser usado como substituto da trioleína. Colen (2006) relatou ter tido êxito em desenvolver um método simples e eficiente, para a detecção de fungos lipolíticos em placa usando óleo de oliva emulsificado com uma mistura de sais biliares de alto grau de pureza.

Beisson *et al.* (2000), após extensa revisão da literatura sobre os métodos para a detecção e ensaio de atividade hidrolítica de lipase, concluíram que não existe um método de aplicação universal para ensaio desta enzima, mas sim uma ampla variedade de diferentes técnicas. Na opinião destes autores, a escolha de um método particular dependerá sobretudo das necessidades e propósitos específicos do pesquisador.

1.4.3.2 Detecção da atividade sintética em meio orgânico

Reações catalizadas por lipases em meios não-aquosos, tais como esterificações e transesterificações, têm recebido cada vez mais atenção nos últimos anos, como ferramentas valiosas para a síntese orgânica. Entretanto, nem todas as

lipases podem catalisar estas reações. Assim, é preciso selecionar enzimas adequadas para tais procedimentos. Métodos de triagem específicos para atividade sintética de lipases são necessários, visto que enzimas identificadas por métodos hidrolíticos nem sempre são adequadas para as desejadas reações sintéticas (TENG e XU, 2007). A literatura mostra que, em geral, não há correlação entre as atividades hidrolítica e sintética das lipases (TORRES *et al.*, 2003).

A triagem de um catalisador “ótimo” para reações em meios não-aquosos torna-se assim um passo crucial. Ensaio de lipase inespecíficos para estes meios podem resultar em falsos positivos (SANDOVAL e MARTY, 2007). Como resultado, vários métodos baseados na atividade de esterificação e de transesterificação têm sido propostos. A maioria destes métodos são baseados em cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta performance (CLAE, também conhecida como *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ou em determinações titulométricas (TENG e XU, 2007). Como exemplo, Torres *et al.* (2003) utilizaram a esterificação de ácido oléico e propanol em oleato de propila, como ensaio para detecção de atividade sintética de lipases ligadas ao micélio de fungos endofíticos. Alíquotas foram retiradas após 3 h e o oleato de pentila foi quantificado por CG. Lisboa (2006) adaptou a metodologia proposta por Torres *et al.* (2003), utilizando pentanol – o qual é menos volátil que o propanol - na esterificação do ácido oléico, aumentando o tempo de monitoramento da reação para até 72 hs. A quantificação do oleato de pentila foi feita por RMN-¹H (LISBOA, 2006).

A fim de obter um ensaio de atividade sintética para lipases que fosse ao mesmo tempo específico, rápido e econômico, Teng e Xu (2007) modificaram o ensaio proposto inicialmente por Pencreach e Baratti, o qual utilizava palmitato de *p*-nitrofenila (PpNF)) como substrato para determinar a atividade hidrolítica de lipase em meio orgânico. A reformulação proposta por Teng e Xu foi baseada em reações de transesterificação catalisadas por lipases entre PpNF e etanol usado heptano como solvente, obtendo como produtos *p*-nitrofenol (*p*NF) e palmitato de etila. O rendimento de *p*NF foi detectado por um simples método colorimétrico (espectrofotometria de UV) e então usado como indicador para determinação da atividade sintética (produção de palmitato de etila). Além de lipases obtidas comercialmente, Teng e Xu utilizaram também lipases ligadas ao micélio de 30 linhagens mutantes de *Rhizopus chinensis* preparadas em seu laboratório.

Visto que transesterificações e esterificações são duas reações tipicamente usadas para avaliar a atividade sintética de lipases em meio orgânico, Teng e Xu testaram as mesmas 30 linhagens em um ensaio de esterificação entre ácido palmítico e etanol. O rendimento de palmitato de etila foi quantificado por titulometria. Quando o percentual de conversão a palmitato de etila dos dois ensaios (transesterificação x esterificação) foi comparado, verificou-se um razoável índice de correlação entre ambos ($r^2 = 0,8287$). Assim, Teng e Xu concluíram que o seu ensaio baseado na reação de transesterificação entre PpNF e etanol, com quantificação do produto feita por espectrofotometria de UV, pode ser usado para avaliar a atividade sintética de lipase em meio orgânico.

1.4.4 Avaliação quantitativa e validação dos ensaios enzimáticos por métodos analíticos

Métodos analíticos desempenham um papel muito importante na maioria dos ensaios de atividade de lipases porque permitem monitorar o progresso da reação biocatalítica, determinando e quantificando os produtos desta. A comparação dos resultados obtidos por diversos métodos analíticos para um mesmo ensaio ou para ensaios semelhantes permite também a validação de novas estratégias de detecção da atividade enzimática (TENG e XU, 2007). Alguns desses métodos mais utilizados são a CLAE associada à espectrofotometria de UV e a RMN (LISBOA, 2006; TORRES *et al.*, 2003)

1.4.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Performance – CLAE

A cromatografia é definida como a separação de dois ou mais compostos devido a diferentes afinidades físico-químicas que causam uma distribuição entre duas fases, uma das quais é estacionária e a outra móvel. Os componentes da mistura são adsorvidos/particionados na fase estacionária, e uma fase móvel arrasta e/ou interage continuamente com os componentes adsorvidos. Pela escolha apropriada da fase estacionária (FE) e da fase móvel (FM), além de outras variáveis, pode-se fazer com que os componentes da mistura sejam arrastados ordenadamente – aqueles que interagem pouco com a FE são arrastados facilmente

e aqueles com maior interação ficam mais retidos (PINTO, 2006). Dependendo da natureza da FM, a cromatografia pode ser classificada como líquida ou gasosa (VOGEL, 1992).

A CLAE é um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma FM que é eluída sobre altas pressões. Este método pode ser usado tanto para a separação e quantificação dos produtos de lipólise (GILHAM e LEHNER, 2005) como para dos produtos da atividade sintética de lipases – neste último caso, faz-se o monitoramento da formação de ésteres e da diminuição de ácidos graxos livres em razão da atuação do biocatalisador (TORRES *et al.*, 2003). Na CLAE, a separação cromatográfica pode ser avaliada por cromatogramas, onde cada pico representa um componente da mistura (PINTO, 2006).

Os componentes de um cromatógrafo líquido típico são: bomba, coluna cromatográfica, detector e registrador (PERES, 2002). Nos equipamentos mais modernos, um computador faz o papel do registrador e permite a operação automatizada dos demais componentes. Podem também estar acomodados ainda outros equipamentos, tais como injetor automatizado de amostras, detector de fluorimétrico etc.

Sistemas de bombas de alta pressão fazem a FM migrar através da coluna, a qual oferece uma grande resistência à vazão. A coluna é fechada e reaproveitável – até centenas de separações individuais podem ser feitas com a mesma coluna. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio. Vários tipos de detectores podem ser colocados na saída da coluna, não existindo um tipo que seja ideal, adequado para todos os tipos de separações. Entretanto, os mais usados são os fotométricos, baseados na absorbância no ultravioleta e no visível (UV-Vis) (CEFET-RJ, 2006).

1.4.4.2 Espectrofotometria na região do UV-Vis

É uma das técnicas analíticas mais empregadas em função de sua robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas (ROCHA e TEIXEIRA, 2004). Quando a radiação eletromagnética nas regiões do UV e do visível passa através de um composto contendo ligações múltiplas (duplas ou triplas), uma parte da radiação geralmente é absorvida pelo composto. Exatamente quanta radiação é absorvida depende do comprimento de onda da radiação e da estrutura do composto. A absorção da radiação na região de UV-Vis é provocada pela subtração da energia do feixe de radiação quando os elétrons nos orbitais de mais baixa energia são excitados para os orbitais de mais alta energia (SOLOMONS e FRYHLE, 2005)

A lei de Lambert-Beer é a base matemática para as medidas de absorção de radiação em espectrofotometria. Para estas medidas, têm-se :

$$A = \log \left[\frac{I_0}{I} \right] = \epsilon bc$$

onde A é a absorbância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide sobre a amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ou coeficiente de extinção molar) ϵ é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação absorvente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b , a distância percorrida pelo feixe através da amostra (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Em um espectrofotômetro de UV-Vis padrão, um feixe de luz (e.g. 190-600 nm) é dividido; uma metade do feixe (o feixe da amostra) é dirigida através de uma célula (recipiente) transparente contendo um a solução do composto sendo analisado e a outra metade (o feixe de referência) é dirigida através de uma célula idêntica que contém não o composto, mas sim o solvente. O instrumento faz uma comparação das intensidades dos feixes à medida que varre a região de comprimentos de onda desejada. Se o composto absorve luz em um comprimento de onda particular, a intensidade do feixe da amostra (I_0) será menor que aquela do feixe de referência (I). O instrumento registra isso produzindo um gráfico – gráfico do comprimento de onda de toda a região *versus* a absorbância de luz de cada comprimento de onda. Tal gráfico é denominado espectro de absorção. O comprimento de onda onde a absorção é máxima é chamado de λ_{\max} . (SOLOMONS e FRYHLE, 2004; SNYDER e KIRKLAND, 1979)

Os compostos cujas moléculas contêm ligações múltiplas conjugadas têm λ_{\max} em comprimentos de onda maiores que 200 nm. Como regra geral, quanto maior o número de ligações múltiplas que um composto contém, maior será o comprimento de onda no qual este absorve luz (SOLOMONS e FRYHLE, 2004).

As informações fornecidas pela análise espectrofotométrica UV-Vis são muito utilizadas na determinação da concentração de uma amostra desconhecida. A relação matemática $A = \epsilon bc$ indica que a quantidade de absorção de uma amostra em determinado comprimento de onda é dependente de sua concentração. Essa relação é normalmente linear em uma faixa de concentrações apropriadas para análise. Para determinar a concentração desconhecida de uma amostra, traçamos um gráfico de absorbância *versus* concentração de um conjunto de padrões de concentração conhecidas. O comprimento de onda utilizado para análise é geralmente o λ_{\max} da amostra. A concentração desta é obtida medindo-se sua absorbância e determinando o valor correspondente da concentração a partir do gráfico de concentrações conhecidas.

A análise quantitativa utilizando-se espectroscopia de UV-Vis é rotineiramente empregada em estudos bioquímicos para medir as velocidades de reações enzimáticas. A concentração de uma espécie envolvida na reação (conforme relacionada à sua absorbância no UV-Vis) é colocada no gráfico *versus* o tempo, para determinar a velocidade de uma reação (SOLOMONS e FRYHLE, 2004).

1.4.4.3 Ressonância Magnética Nuclear – RMN

Sem dúvida, a ressonância magnética nuclear (RMN) tornou-se uma das ferramentas mais úteis disponíveis para análise de compostos orgânicos. A espectrometria de RMN é basicamente uma forma de espectroscopia de absorção: sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências em uma frequência regida pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades.

Todos os núcleos possuem carga e em alguns casos a carga gira em torno do eixo nuclear, gerando um dipolo magnético ao longo do eixo. O momento angular da carga em movimento pode ser descrito em termos do “número de spin” I , que pode assumir os valores 0, 1/2, 1, 3/2, etc. ($I = 0$ corresponde a um núcleo que não gira em torno de seu eixo). A magnitude do dipolo gerado é expressa em termos de momento magnético nuclear. Pode-se obter facilmente o espectro de vários núcleos que possuem um número de spin, I , igual a $\frac{1}{2}$ (por exemplo: ^1H , ^3H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P) e, portanto uma distribuição de carga esférica e uniforme. Dentre estes, os mais amplamente utilizados na espectrometria de RMN são ^1H e ^{13}C . Os núcleos com $I \geq 0$ possuem distribuição de carga não esférica (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Analisando-se os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) para álcool e éster nota-se uma diferença de frequência entre os picos dos hidrogênios do grupamento metileno ($-\text{CH}_2$) ligado ao átomo de oxigênio, presente em ambas as moléculas (RCH_2OH ; $\text{R}'\text{COOCH}_2\text{R}$). Os hidrogênios do grupamento metileno do álcool registram picos em uma frequência mais baixa (mais blindados) do que os do éster (menos blindados) no espectro de RMN- ^1H . Devido a esta peculiaridade, através de integração das áreas dos espectros pode-se calcular a conversão de uma reação de esterificação (LISBOA, 2006; ZANOTTO *et al.* 2009).

1.4.5 Avaliação da enantiosseletividade das lipases

1.4.5.1 Parâmetros de avaliação

Uma amostra de uma substância opticamente ativa que consiste em um único enantiômero é classificada como *enantiomericamente pura*. Se os dois enantiômeros estão presentes em quantidades equimolares na amostra, ela é denominada de *racemato* ou *forma racêmica*. Muitas reações da química orgânica tradicional apresentam como resultado a formação de racematos, ou seja, 50% de rendimento para cada enantiômero. Por outro lado, quando uma amostra apresenta proporções desiguais de enantiômeros, diz-se que há um *excesso enantiomérico* daquele que estiver presente em maior proporção. Se uma reação que leva a formação de enantiômeros produz preponderância de um sobre o outro, diz-se que ela é *enantiosseletiva* (SOLOMONS e FRYHLE, 2001).

Um substrato racêmico, quando submetido à catálise enzimática, sofre discriminação quiral entre os enantiômeros. Devido à quiralidade dos aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no seu sítio ativo é convertido a uma velocidade mais alta. Para assegurar uma alta seletividade, a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível (FABER, 2004). Quanto maior for esta diferença na velocidade de reação, maior é a enantiosseletividade da enzima e a maior a sua aplicabilidade em processos de resolução cinética (separação dos enantiômeros de uma forma racêmica em razão de terem diferentes velocidades de conversão).

Um exemplo interessante é a reação enantiosseletiva catalisada por lipases usada na resolução de profenos. Uma estratégia relativamente simples de obter a forma (S), fisiologicamente ativa, presente na forma racêmica do fármaco, é realizar a uma esterificação utilizando lipase que apresente enantiosseletividade para a forma (R) do ibuprofeno. Desta forma, a enzima catalisa seletivamente a conversão para (R)-éster, discriminando o (S)-ibuprofeno da mistura racêmica. Posteriormente, o ácido discriminado (S)-ibuprofeno pode ser separado do meio através de reação com uma base forte em solução aquosa.

Em alguns casos ideais a velocidade é tão extrema que o enantiômero de interesse é transformado rapidamente e o outro não é convertido. Então, a reação

enzimática cessaria automaticamente em 50% de conversão, quando já não existe o enantiômero reativo. Como consequência, cada enantiômero poderia ser obtido com até 50% de rendimento em uma resolução enzimática (FABER, 2004).

Na prática, a maior parte das resoluções enzimáticas de substratos racêmicos não mostra uma situação ideal e a diferença na razão das velocidades de conversão dos enantiômeros não é infinita, mas mensurável. O que se observa nesses casos, não é uma parada total da reação em 50% de conversão, mas uma acentuada diminuição na velocidade próxima a este valor. O resultado do processo é descrito pelo excesso enantiomérico do produto (ee_p) e do substrato que não reagiu (ee_s), sendo o rendimento fornecido pelo grau de conversão da reação (c). A velocidade de transformação de cada enantiômero varia com o grau de conversão (c), logo, a razão dos dois enantiômeros não permanece constante durante a reação. As equações abaixo, baseadas em Steenkamp e Brady (2003), descrevem como obter os valores de ee_p , ee_s e c (expressos em percentuais).

$$ee_s \% = \frac{[A] - [B]}{[A] + [B]} \times 100$$

Equação 1, onde [A] e [B] são as concentrações dos enantiômeros do substrato

$$ee_p \% = \frac{[P] - [Q]}{[P] + [Q]} \times 100$$

Equação 2, onde [P] e [Q] são as concentrações dos enantiômeros do produto

$$c \% = \frac{ee_s \%}{ee_s \% + ee_p \%}$$

Equação 3

Um tratamento muito útil das resoluções cinéticas enzimáticas, descrevendo a dependência de c , ee_s e ee_p foi desenvolvido por Sih em 1982 sob a base teórica de Sharpless e K. Fajans, conforme mostrado abaixo.

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

Equação 4

$$E = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]}$$

Equação 5

O parâmetro que indica a discriminação de uma enzima entre dois enantiômeros foi introduzido como razão enantiomérica (E) (FABER, 2004). Este parâmetro é adimensional, e permanece constante durante a reação, sendo somente determinado pelo “ambiente” do sistema, ou seja, enquanto o excesso enantiomérico é uma propriedade do produto, a razão enantiomérica é característica do processo.

Para reações irreversíveis, tais como hidrólise biocatalítica ou reações de transferência de acila usando ésteres enólicos ou anidridos ácidos, a conversão e a razão enantiomérica podem ser calculadas a partir dos valores de ee_s e de ee_p , com o uso das equações 3, 4 e 5, mostradas acima.

Um valor elevado de E para um par “enzima-substrato” é essencial para o sucesso de uma resolução cinética, já que isto assegura não apenas um excesso enantiomérico elevado, mas também um rendimento proporcionalmente alto. Os valores de razões enantioméricas menores do que 15 são inaceitáveis para propósitos práticos. Valores de E entre 15 e 30 são considerados de moderados a bons, e acima destes valores são excelentes (FABER, 2004).

Os enantiômeros têm propriedades físicas idênticas (ponto de ebulição e fusão, solubilidade), exceto o sentido da rotação do plano de polarização da luz. Apresentam as mesmas propriedades químicas (comportamento cromatográfico e espectroscópico), com exceção para reações com outros compostos opticamente ativos, ou seja, quando se tem uma influência quiral externa.

O desenvolvimento de métodos não polarimétricos precisos para a determinação da pureza enantiomérica, especialmente os cromatográficos de alta resolução, tem sido fundamental para a evolução da síntese assimétrica, permitindo uma avaliação precisa do grau de seletividade obtido em uma determinada reação (AITKEN e KILÉNYI, 1992).

1.4.5.2 Cromatografia Gasosa com Fase Estacionária Quiral

Um método atrativo para a análise de mistura de enantiômeros é a cromatografia gasosa (CG) com FE quiral. Na CG é necessário apenas que a amostra seja suficientemente volátil a fim de que possa passar em forma de vapor

através da coluna, e termicamente estável o bastante para não se decompor nas condições de separação.

Este método sensível não é afetado por traços de impurezas e é rápido e simples de ser realizado. Está baseado em associações moleculares que podem levar a um reconhecimento quiral suficiente que resulte em uma resolução enantiomérica. A razão dos picos fornece uma medida da composição enantiomérica da amostra de forma precisa e quantitativa. Tais medidas podem ser realizadas com um alto grau de precisão.

O método utiliza uma FE quiral, que contém um agente de resolução auxiliar de alta pureza enantiomérica. O enantiômero a ser analisado é submetido a interações diastereoisoméricas rápidas e reversíveis com a FE, sendo eluído em velocidades diferentes. Por comparação com padrões previamente existentes, pode ser feita a identificação de compostos (AITKEN e KILÉNYI, 1992). **(Figura 6)**

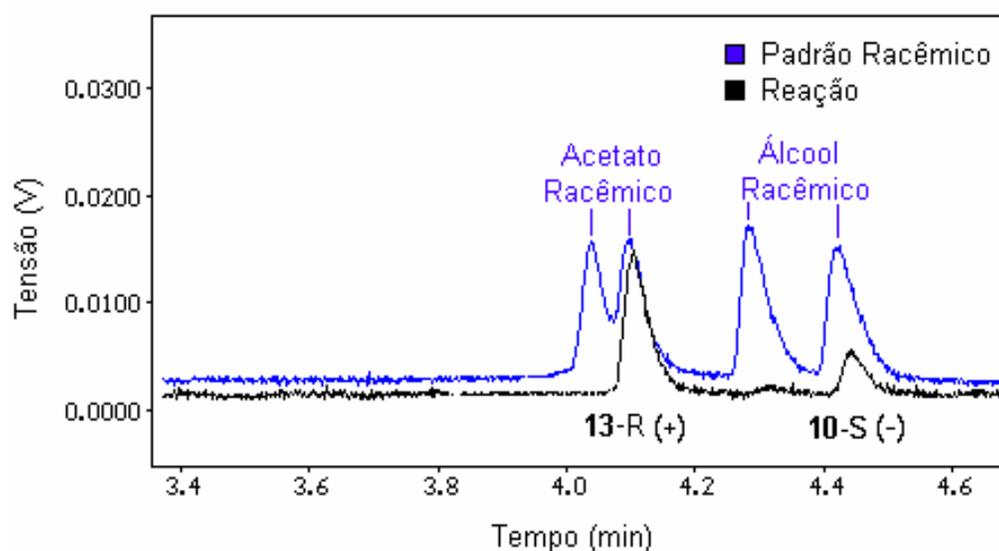


Figura 6 - Cromatograma para uma alíquota da reação do (R,S)-3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila com acetato de vinila, catalisada por lipase de *Pseudomonas sp* imobilizada em poli(oxi de etileno) (ZANOTTO, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar fungos isolados da região amazônica como fonte de novas lipases para aplicações em biocatálise.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a atividade sintética das lipases ligadas ao micélio dos fungos através do monitoramento das reações de esterificação do ácido oléico com n-pentanol e do ácido linoléico com dodecanol, e de transesterificação entre palmitato de para-nitrofenila e etanol, sendo estas reações realizadas em meio orgânico (hexano).
- Selecionar, dentre os fungos que apresentaram atividade sintética verificável através da metodologia empregada, os fungos com maior atividade biocatalítica.
- Avaliar os ensaios enzimáticos utilizados na detecção de atividade sintética de lipases, verificando a correlação entre eles, analisando a confiabilidade, praticidade e viabilidade destes ensaios.
- Verificar a capacidade enantiosseletiva das lipases dos fungos selecionados, através das resoluções do (*R,S*) octanol via esterificação com o acetato de vinila e do fármaco (*R,S*)-ibuprofeno via esterificação com propanol, ambas utilizando hexano como solvente.
- Avaliar a utilização de óleo de oliva como substrato alternativo à triburítina na detecção de atividade hidrolítica de lipases em ensaios em placa, visando aumentar a eficácia da seleção preliminar de fungos produtores de lipases.

Conforme detalhado na **Tabela 2**, o presente trabalho estipulou a seguinte estratégia para atingir seus objetivos: 1) encontrar lipases (EC 3.1.1.3) com significativa atividade sintética em meio orgânico, as quais possuam potencial de emprego, por exemplo, na resolução de racematos de interesse farmacológico. As lipases foram também testadas quanto a sua atividade hidrolítica; 2) selecionar fungos isolados de plantas da região amazônica como potenciais fornecedores deste tipo de lipase; 3) avaliar ensaios enzimáticos descritos na literatura para a detecção das atividades sintética e hidrolítica de lipases, analisando a praticidade e a viabilidade deste ensaios.

Estratégia de triagem de lipases com potencial biotecnológico	
Definição das atividades desejadas para a enzima	<ul style="list-style-type: none"> • Síntese de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e álcoois em meio orgânico. • Enantiosseletividade em meio orgânico • Hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa
Seleção do grupo de organismos a ser triado como potencial fornecedores da enzima	<ul style="list-style-type: none"> • Fungos isolados de plantas da região amazônica: endofíticos, fitopatogênicos e degradadores de madeira
Escolha de ensaios enzimáticos para detectar as atividades desejadas durante a triagem	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade sintética em meio orgânico: <ol style="list-style-type: none"> 1- esterificação de ácido oléico e pentanol em oleato de pentila e de ácido linoléico e dodecanol em linoleato de dodecila (TORRES, 2003) 2- transesterificação entre palmitato de p-nitrofenila e etanol (TENG e XU, 2007) • Enantiosseletividade: <ol style="list-style-type: none"> 1- Resolução do (<i>R,S</i>)-ibuprofeno por reação de esterificação com 1-propanol. 2- Resolução do (<i>R,S</i>)-2-octanol por reação com esterificação com acetato de etila • Atividade hidrolítica: degradação de óleo de oliva emulsificado em placa Petri (COLEN, 2006)

Tabela 2- Proposta para triagem de lipases de interesse biotecnológico, com base nas recomendações gerais de Ogawa e Shimizu (1999).

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS FUNGOS

Os fungos endofíticos, fitopatogênicos e degradadores de madeira utilizados neste trabalho foram previamente isolados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biorgânica do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Estes isolados são mantidos em meio BDA, cultivados em placa de Petri e conservados em câmara científica à 4°C. As cepas cujas espécies ainda não foram identificadas são referenciadas por um código composto da expressão “UEA_” mais um número seqüencial (p. ex, UEA_001, UEA_002 etc). A metodologia para o isolamento destes fungos foi a descrita por Zanotto *et al* (2009).

3.2 TRIAGEM DA ATIVIDADE SINTÉTICA

A atividade sintética das lipases produzidas pelos fungos foi avaliada por monitoramento da síntese oleato de pentila a partir de ácido oléico e n-pentanol, da síntese de linoleato de dodecila a partir de ácido linoléico e dodecanol e da síntese de palmitato de etila pela transesterificação entre palmitato de *p*-nitrofenila (PpNF) e etanol. Nestas reações utilizou-se como biocatalisador o micélio filtrado e seco dos fungos cultivados, como descrito a seguir.

3.2.1 Cultivo dos Fungos

Os fungos testados foram previamente cultivados em placas de Petri com batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos em BOD à 28°C por 5-7 dias. Os microrganismos foram então cultivados em um meio líquido sintético indutor da produção de lipases, constituído de 2 g de asparagina (Vetec), 2 g de glicose (Dinâmica), 1g de K₂HPO₄ (Vetec), 0,5 g de MgSO₄ (Vetec), 5 mg de hidrócloro de tiamina (Sigma), 1,45 mg de Fe(NO₃)₃.7H₂O (Vetec), e 0,235 mg de MnSO₄.H₂O (Vetec) por litro de água destilada. O meio foi aquecido até cerca de 60 °C, até total dissolução dos sais. Após resfriamento o pH do meio foi ajustado a 5,5-6,0 (HCl 1,0

N). O meio foi esterilizado (121°C por 15 min) em alíquotas de 200 mL. Após resfriamento, 2% (v/v) de óleo de girassol (Sigma) em condições assépticas foram adicionados. A seguir inoculou-se o meio com quatro discos cortados da placa com BDA, cada um com aproximadamente 7 mm de diâmetro. O meio foi então incubado a 28 °C por 9 dias em um agitador orbital a 200 rpm (ZANOTTO *et al*, 2009).

3.2.2 Preparação do micélio

O micélio foi coletado do meio de cultura por filtração à vácuo em um funil de Buchner e lavado com água destilada e depois com acetona (TORRES *et al.*, 2000). O micélio foi seco por 48 h (dessecador) até alcançar peso constante e triturado a pó, conforme mostrado na **Figura 7**..

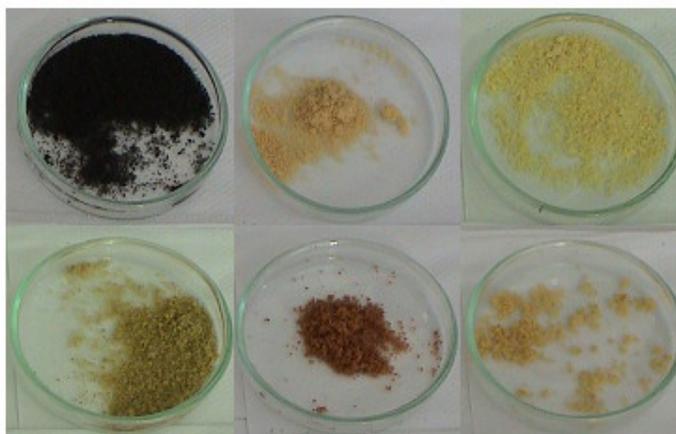


Figura 7 – Micélios de diferentes isolados, secos e triturados.

3.2.3 – Síntese de oleato de *n*-pentila

Para estudar a atividade da lipase ligada ao micélio, 50 mg de micélio seco sob vácuo e triturado foram suspensos em 10 mL de uma solução de ácido oléico (50 mM) e *n*-pentanol (250 mM), utilizando-se hexano como solvente. Esta suspensão foi incubada por 72 h em agitador termoestatizado, a 28 °C e 200 rpm

(ZANOTTO *et al.*, 2009). Os experimentos foram realizados em duplicata. O esquema desta reação é mostrado na **Figura 8**.

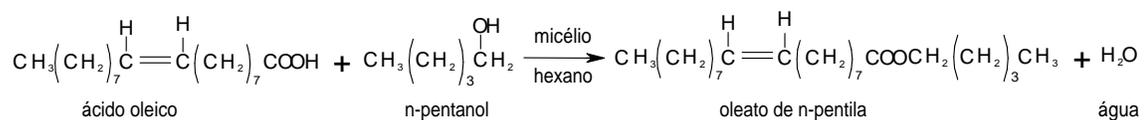


Figura 8 - Esquema da reação biocatalisada de síntese de oleato de n-pentila

A conversão em oleato de n-pentila foi quantificada por CLAE em fase reversa, em um equipamento da marca Varian, série ProStar, com um sistema de bombeamento ProStar 240, injetor automatizado de amostra ProStar 400 e detector UV ProStar 310 em 210 nm (**Figura 9**). Para a quantificação, foram preparadas amostras de cada reação mediada por micélio, como segue: 50 µL da reação incubada por 72 h foram adicionados a 1,5 mL de acetronitrila grau HPLC. Vinte microlitros de cada amostra foram injetados na coluna C₄ marca Microsorb 300-5, 25 cm. O eluente utilizado foi um gradiente água/acetronitrila (v/v). Os picos cromatográficos foram registrados e integrados com o software fornecido pela Varian (Star Chromatography Workstation). As percentagens de conversão (%c) a produto foram determinadas a partir da comparação da área do pico do éster nas reações mediadas pelos fungos com a área do pico do éster nas reações mediadas pela enzima comercial Novozym 435 (100%c).



Figura 9 – Equipamento para HPLC da Varian, série Pro Star (em primeiro plano), composto de (1) sistema de bombeamento, (2) coluna, (3) detector UV, (4) injetor automático de amostra e (5) detector fluorimétrico

3.2.4 Síntese de linoleato de dodecila

Na continuidade do estudo a atividade sintética da lipase ligada ao micélio, visando avaliar uma metodologia alternativa ao ensaio descrito no item anterior, 50 mg de micélio seco sob vácuo foram suspensos em 10 mL de uma solução equimolar (50 mM:50 mM) de ácido linoléico e 1-dodecanol, em solvente hexano. Essa suspensão foi incubada por 72 h em agitador termostatzado, a 28 °C e 200 rpm (ZANOTTO *et al.*, 2009). Os experimentos foram realizados em duplicata.

A conversão em linoleato de dodecila, cujo esquema é mostrado na **Figura 10**, foi quantificada por CLAE em fase reversa, no mesmo equipamento e nas mesmas condições descritas para a quantificação do oleato de n-pentila. A preparação das amostras e a determinação da porcentagem de conversão a produto também foram realizadas conforme descrito na seção 3.2.3.

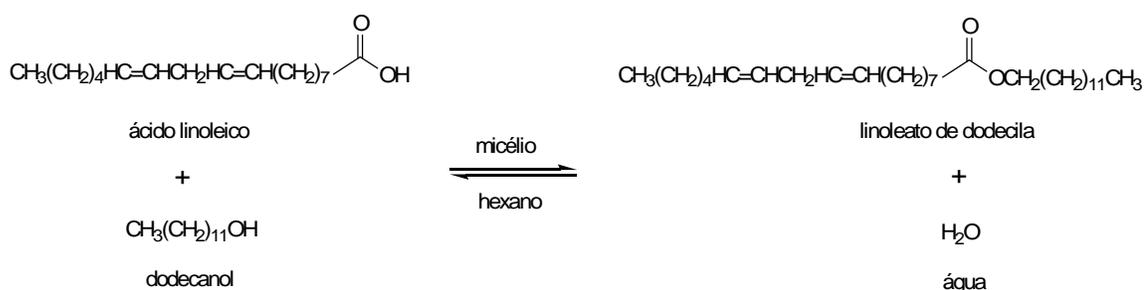


Figura 10 - Esquema da reação biocatalisada de síntese de linoleato de dodecila

Para fins de comparação de resultado e validação da técnica, a conversão em linoleato de dodecila foi adicionalmente determinada por Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN-¹H) em um espectrômetro da Varian (Unity Inova) AC 500 MHz (**Figura 11**), utilizando como referência interna o próprio solvente empregado, clorofórmio deuterado (CDCl₃, δ=0,00 ppm). As conversões a éster foram calculadas comparando-se a área das integrais dos singletos referentes aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono da hidroxila do álcool (centrado em 3,5 ppm) com a dos hidrogênios metilênicos do carbono ligado ao oxigênio da carbonila do éster (centrado em 4,1 ppm para os ésteres alifáticos) (SEBRÃO *et al.*, 2007).



Figura 11 – Espectrômetro para obtenção dos espectros de RMN-¹H

3.2.5 Transesterificação entre PpNF e etanol

Na execução deste ensaio, 50 mg de micélio foram suspensos em 10 mL de uma solução de PpNF (1,25 mM) em hexano. Para iniciar a reação, 50 μ L de etanol 1,5 M foram adicionados à suspensão. A mistura foi incubada a 28 °C e 200 rpm em agitador termoestabilizado por 72 h (ZANOTTO *et al.*, 2009). Os experimentos foram realizados em duplicata. O esquema desta reação é mostrado na **Figura 12**.

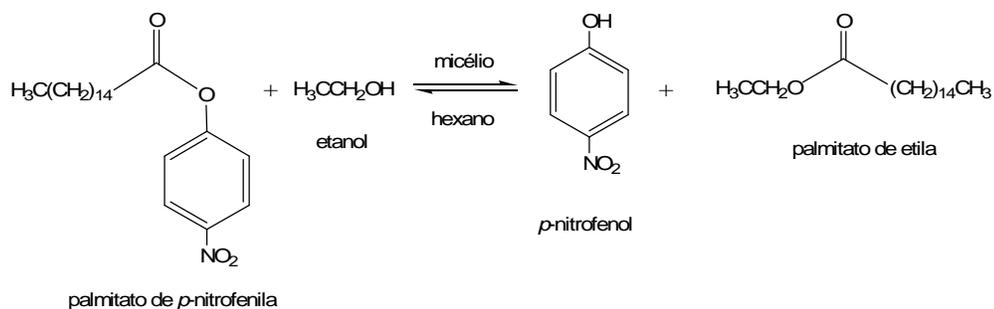


Figura 12 - Esquema da reação biocatalisada de transesterificação entre palmitato de *p*-nitrofenila e etanol

A conversão em palmitato de etila também foi quantificada por CLAE em fase reversa, no mesmo equipamento e nas mesmas condições das reações descritas anteriormente, tendo sido modificada apenas a detecção UV para 254 nm. A

preparação das amostras e a determinação da porcentagem de conversão a produto foram mais uma vez realizadas conforme descrito na seção 3.2.3.

3.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENANTIOSSELETIVA

Para estudar a atividade enantiosseletiva da lipase ligada ao micélio foram realizadas as resoluções do (*R,S*) 2- octanol e do (*R,S*)-ibuprofeno. Foram utilizados neste ensaio os fungos que obtiverem os melhores percentuais de conversão nos ensaios de atividade sintética de lipases, descritos anteriormente. Para obtenção do micélio utilizado nestas reações, estes fungos foram cultivados conforme descrito na seção 3.2.1 deste trabalho. A preparação da massa micelial se deu conforme descrito na seção 3.2.2.

3.3.1 Resolução do (*R,S*) 2- octanol

Para a resolução do álcool, 50 mg de micélio seco foram suspensos em 20 mL de hexano contendo 2 mmoles de (*R,S*) 2-octanol, e 6 mmoles do agente acilante (acetato de vinila). Esta reação, cujo esquema é mostrado na **Figura 13**, foi realizada em agitador termostatizado (200 rpm e 28 °C). Amostras foram retiradas e filtradas de acordo com o tempo da reação (de 72 até 120 h).

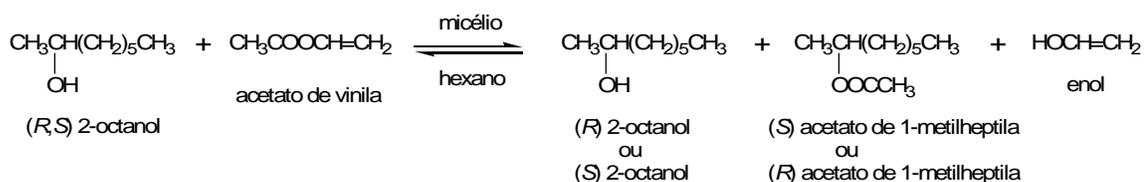


Figura 13 - Esquema da reação enantiosseletiva do (*R,S*) octanol

Para este ensaio de resolução, as medidas de excesso enantiomérico (ee) foram calculadas a partir das áreas dos picos dos enantiômeros obtidas nos cromatogramas do cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa da Shimadzu (GCMS-QP2010, **Figura 14**), com uma coluna capilar de fase estacionária quiral da Chrompack, (Chirasil – Dex CB 25m x 0,25mm ID x 0,25 µm).



Figura 14 – Cromatógrafo à Gás acomplado a Espectrômetro de Massa

A programação utilizada para separar os enantiômeros dos substratos e produtos das reações de resolução está mostrada na Tabela

Tabela 3 - Programação utilizada no CGMS para análise das reações de resolução.

Parâmetros	Resolução do (<i>R,S</i>)2-octanol
Temperatura Inicial	80°C
Temperatura Final	80°C
Taxa de Aquecimento	
Temperatura de Injeção	220°C
Razão de Split	50
Velocidade Linear	35,0 cm/s
Pressão do Gás Carreador (He)	56,9 kPa

3.3.1 Resolução do (*R,S*)-ibuprofeno

O (*R,S*)-ibuprofeno utilizado neste ensaio foi obtido do fármaco comercial Lomalgina®, do qual é o princípio ativo. Comprimidos do fármaco foram triturados a fim de se preparar uma solução 66mM de ibuprofeno em hexano, sendo o excipiente insolúvel em meio orgânico separado por filtração simples.

A fim de resolver o (*R,S*)-ibuprofeno, foi adicionado 0,1 g de micélio em 10 mL de uma solução equimolar (66mM:66mM) de ibuprofeno e 1-propanol.

(CARVALHO *et al.*, 2005, adaptado). O esquema desta reação é mostrado na **Figura 15**. A reação foi conduzida a 40 °C em agitador rotativo com 180 rpm. Em diferentes intervalos de tempo (48 h a 144 h) foram retirados 100 μ L da solução e adicionados a 1,4 mL de hexano para análise por CLAE com coluna quiral (ASTEC CYCLOBOND I 2000).

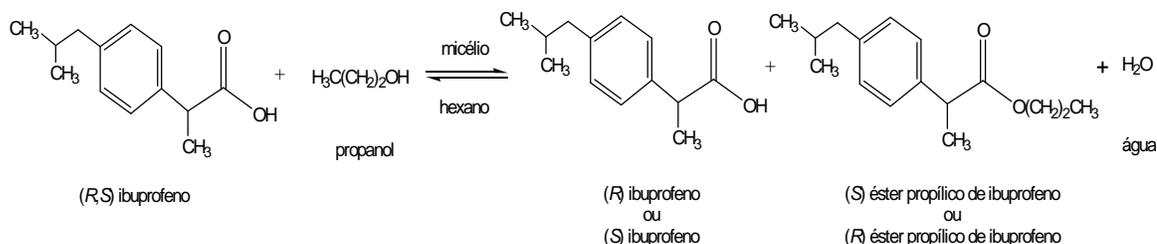


Figura 15 - Esquema da reação enantiosseletiva do (R,S)-ibuprofeno

3.4 ESTUDO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA

3.4.1 Preparação do meio de incubação com substrato óleo de oliva

Foram preparadas sete formulações diferentes para este meio. A primeira formulação testada seguiu a metodologia empregada por Colen (2006). A partir desta formulação, foram testadas seis modificações visando melhorar a homogeneidade e/ou a consistência do meio.

Os materiais e as quantidades utilizados para preparação de 1 L de meio de cada uma das sete formulações testadas são listados na **Tabela 4** (pg. 46).

Tabela 4 - Materiais e quantidades (g/L) utilizados nas sete formulações do meio de incubação com substrato óleo de oliva

Material	Colen (2006)	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Teste 6
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
$(\text{NH}_2)_2 \text{CO}$	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Mg SO_4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
NaCl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Extrato de levedura	0,5	0,5	0,5	0,5	5	0,5	0,5
Agar micológico	15,0	25,0	15,0	20,0	15,0	30,0	30,0
Sais biliares	2,0	3,0	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0
Agar padrão	-	2,5	-	-	-	-	-
Óleo de oliva	10,0	10,0	10,0	10,0	5,0	1,0	1,5

Em todas as formulações, o meio foi aquecido para fusão do ágar e depois homogeneizado em liquidificador por 1 min, para a obtenção de uma emulsão estável, e em seguida, autoclavado por 121°C por 15 min. Após resfriamento a aproximadamente 60°C o meio foi colocado em placas de Petri e resfriado rapidamente.

3.4.2 Inoculação, Incubação, e Medição do Halo

O inóculo testado foi previamente cultivado em placas de Petri com batata-dextrose-ágar (BDA) por 5-7 dias a 28°C em BOD. Um disco do meio sólido contendo o inóculo, com aproximadamente 10mm de diâmetro, foi retirado desta placa com espátula esterilizada e colocado no meio de uma placa de Petri com ágar contendo o meio de incubação com óleo de oliva. As placas foram incubadas a 25°C até a formação do halo indicativo de lipólise, ou por no máximo 4 dias. Cada cepa foi inoculada em duplicata.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TRIAGEM DA ATIVIDADE SINTÉTICA

Foram selecionados aleatoriamente 62 isolados para a triagem da atividade sintética. Destes, 57 obtiveram crescimento no meio líquido sintético com indutor da produção de lipases, alcançando, após nove dias de cultivo, massa micelial suficiente para mediar pelo menos uma das três reações desta triagem (síntese do oleato de n-pentila, síntese do linoleato de dodecila e transesterificação entre PpNF e etanol). Quarenta e três isolados alcançaram massa micelial para serem empregados como biocatalisadores em pelo menos duas das três reações, e quinze isolados produziram micélio o bastante para serem empregados em todas elas.

As reações de síntese de linoleato de dodecila e de transesterificação entre PpNF e etanol, nesta ordem, receberam prioridade, pois até então nenhuma das cepas do Laboratório de Biorgânica havia sido usada para mediar estas duas reações. Quanto a reação de síntese de oleato de n-pentila, 26 isolados fúngicos do Laboratório já haviam sido anteriormente testados por Lisboa (LISBOA, 2006).

Os 57 isolados utilizados nesta triagem são listados na **tabela 5**.

Tabela 5 – Isolados fúngicos utilizados nas reações de triagem da atividade sintética (Legenda: FP – fitopatogênico; DM - degradador de madeira; EF – endofítico; ND – não determinado).

Código UEA	Espécie	Tipo	Origem do explante	Planta de origem (nome popular)
001	<i>Aspergillus flavus</i>	FP	Semente	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)
002	<i>Aspergillus flavus</i>	FP	Fruto	<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)
005	<i>Trametes</i> sp.	DM	Madeira	ND
006	<i>Trichoderma</i> sp.	FP	Fruto	<i>Theobroma cacao</i> (cacau)
007	<i>Aspergillus niger</i>	FP	Fruto	<i>Theobroma cacao</i> (cacau)
008	ND	FP	Fruto	<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)
010	ND	FP	Fruto	<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)
011	ND	FP	Folha	<i>Aloe vera</i> (babosa)
012	ND	FP	Folha	<i>Aloe vera</i> (babosa)
013	ND	FP	Fruto	<i>Theobroma cacao</i> (cacau)
014	ND	FP	Semente	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)

Continua...

Continuação.

Código UEA	Espécie	Tipo	Origem do explante	Planta de origem (nome popular)
015	ND	FP	Fruto	<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)
016	ND	FP	Fruto	<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)
017	ND	FP	Fruto	<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)
018	<i>Aspergillus flavus</i>	FP	Folha	<i>Aloe vera</i> (babosa)
019	ND	FP	Folha	<i>Aloe vera</i> (babosa)
020	ND	FP	Semente	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)
021	ND	FP	Semente	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)
022	ND	FP	Fruto	<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)
023	<i>Aspergillus niger</i>	FP	Fruto	<i>Theobroma cacao</i> (cacau)
024	<i>Aspergillus sp.</i>	FP	fruto	<i>Theobroma cacao</i> (cacau)
025	ND	FP	folha	<i>Aloe vera</i> (babosa)
026	ND	FP	fruto	<i>Theobroma cacao</i> (cacau)
027	<i>Aspergillus flavus</i>	FP	semente	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)
028	<i>Aspergillus niger</i>	FP	fruto	<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)
029	ND	FP	semente	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)
030	ND	FP	fruto	<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)
031	<i>Aspergillus sp.</i>	FP	semente	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)
032	ND	FP	fruto	<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)
033	ND	FP	fruto	<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)
034	ND	FP	fruto	<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)
035	ND	FP	fruto	<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)
037	ND	FP	fruto	<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)
040	ND	EF	raiz	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
041	ND	EF	folha	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
042	<i>Aspergillus sp.</i>	EF	semente	<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)
044	ND	EF	caule	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
045	ND	EF	raiz	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
046	ND	EF	folha	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
047	<i>Guignardia sp.</i>	EF	folha	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)
049	ND	EF	ND	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
050	ND	EF	caule	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)
051	ND	EF	semente	<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)
052	ND	EF	caule	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
053	ND	EF	polpa	<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)
055	ND	EF	caule	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
057	ND	EF	raiz	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
059	ND	EF	raiz	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
060	ND	EF	raiz	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
062	ND	EF	caule	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
063	ND	EF	semente	<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)

Continua...

Continuação.

Código UEA	Espécie	Tipo	Origem do explante	Planta de origem (nome popular)
064	ND	EF	raiz	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
067	ND	EF	raiz	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
068	ND	EF	folha	<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)
071	ND	EF	semente	<i>Theobroma cacao</i> (cacau)
105	ND	DM	madeira	ND
115	ND	DM	madeira	ND

Embora existam muitos métodos para detecção de lipases baseados na atividade de hidrólise (BEISSON *et al.*, 2000), enzimas avaliadas por ensaios hidrolíticos não são necessariamente adequadas para reações de síntese em meio orgânico (TENG e XU, 2007). Como resultado, recentemente vários métodos baseados na atividade de esterificação e transesterificação em meios não-aquosos têm sido propostos. A triagem da atividade sintética em meio orgânico permite a seleção de enzimas com características específicas para a reação de interesse (TORRES *et al.*, 2004). Os resultados da triagem da atividade sintética são apresentados na **Tabela 6**. Foram incluídos apenas os resultados das cepas que apresentaram conversão acima de 10% em pelo menos uma das três reações.

Tabela 6 – Resultados da atividade sintética de lipase

Código UEA	Oleato de pentila %	Linoleato de dodecila %	Palmitato de etila %
001	85	43	79
006	***	68	0
007	***	98	87
012	***	8	51
014	25	38	***
015	***	50	4
016	0	16	29
017	16	1	13
021	***	6	15
022	***	1	57
023	4	34	***
027	21	19	67
028	37	50	52
041	45	78	18
047	4	2	12
049	***	10	0
053	24	38	15
115	91	94	24

Na síntese do oleato de pentila, 8 fungos apresentaram conversões acima de 10% sendo que dois acima de 50%. As cepas UEA_115 e UEA_001 destacaram-se nesta reação, apresentando 91% e 85% de conversão, respectivamente. Na síntese do linoleato de dodecila, 13 fungos apresentaram conversões acima de 10% sendo que seis acima de 50%. Os isolados UEA_007, UEA_115 e UEA_041 foram os mais eficientes nesta reação, apresentando 98%, 94% e 78% de conversão, respectivamente. Na síntese do palmitato de etila, 13 fungos apresentaram conversões acima de 10%, e destes, 6 acima de 50%. Os fungos UEA_007 e UEA_001 apresentaram os melhores resultados nesta reação, com 87% e 79% de conversão, respectivamente. A partir destes resultados, percebe-se que alguns dos isolados fúngicos amazônicos avaliados produziram lipases com pronunciada atividade sintética, sendo capazes de atuar eficientemente sobre os substratos utilizados.

Algumas cepas apresentaram boa atividade biocatalítica para mais de um tipo de substrato. A cepa UEA_001, por exemplo, obteve 85% de conversão a oleato de pentila e 79% de conversão a palmitato de etila. Comportamento similar foi observado para o fungo UEA_007 que apresentou 98% de conversão a linoleato de dodecila e 87% de conversão a palmitato de etila. Estes dois isolados apresentaram excelente desempenho tanto para a reação de esterificação como para a de transesterificação, pois obtiveram percentagens de conversão comparáveis as da enzima comercial Novozym 435 (100% de conversão). Estes resultados sugerem duas possibilidades: os fungos UEA_001 e UEA_007 possuem lipases ligadas ao micélio capazes de promover excelentes conversões a produto, atuando sobre substratos com estruturas químicas diferentes; ou estas cepas produzem diferentes lipases, específicas para cada um dos substratos.

Utilizando o isolado UEA_115 também foram observadas excelentes percentagens de conversão a produto nas duas reações de esterificação avaliadas. A cepa apresentou 91% de conversão a oleato de pentila e 94% de conversão a linoleato de dodecila. As pequenas diferenças estruturais dos substratos não limitaram a atuação das lipases ligadas ao micélio. Neste caso, nota-se uma preferência das lipases produzidas por este fungo para as reações de esterificação, já que para a reação de transesterificação do PpNF o valor de conversão foi de 24%.

Sabe-se que as lipases podem converter uma grande variedade de substratos não-naturais, indicando que elas não são enzimas completamente “rígidas”, mas apresentam pequenas mudanças conformacionais durante a formação do complexo enzima-substrato. Esta característica confere as lipases grande versatilidade para a catálise de diferentes reações. Além disso, o mecanismo “ajuste induzido” desenvolvido por Koshland Jr. no final dos anos 60 (KOSHLAND Jr., 1968), descreve que a enzima pode mudar sua conformação sob a influência da estrutura do substrato, e segundo Faber “as mais típicas enzimas de ‘ajuste induzido’ são as lipases” (FABER, 2004).

Por outro lado, reações realizadas em solvente orgânico, em geral, conferem maior rigidez às enzimas, visto que em meio aquoso a quebra e a formação das ligações de hidrogênio envolvidas durante a formação do complexo enzima-substrato são assistidas pela água, o que não ocorre em solventes hidrofóbicos (BROOS *et al*, 1995).

Outro fator que pode influenciar a seletividade dos biocatalisadores é a imobilização (FABER, 2004). Nascimento *et al.* (2003) reportaram que o uso de lipase imobilizada aumentou a enantiosseletividade e a percentagem de conversão na resolução de α -metileno- β -hidroxi ésteres quando comparada à reação com a enzima livre (NASCIMENTO *et al.*, 2003). Nas enzimas aderidas ao micélio, a estrutura formada pelo conjunto de hifas atua como uma matriz natural e produz um efeito similar ao exercido pelos suportes utilizados na imobilização de biocatalisadores (ROMERO *et al* 2007), ou seja, as lipases ligadas ao micélio podem estar com sua conformação tridimensional menos flexível, e dessa forma, apenas substratos mais específicos serão transformados.

As lipases ligadas ao micélio das cepas UEA_027 e UEA_041 apresentaram menor flexibilidade em relação aos diferentes substratos utilizados nas reações de síntese, pois diferentemente das cepas UEA_001, UEA_007 e UEA_115, apenas um dos substratos obteve percentuais elevados (acima de 60%) de biotransformação. Com o isolado UEA_027 obteve-se 67% de conversão a palmitato de etila e com o isolado UEA_041 obteve-se 78% de conversão a linoleato de dodecila. Estes dois fungos não tiveram um bom desempenho nas demais reações biocatalíticas (conversões abaixo de 45%) nas condições experimentais empregadas.

Quatro outras cepas obtiveram percentuais de conversão significativos (entre 50 e 60 %) em pelo menos uma das reações. Para a transesterificação entre PpNF e etanol, as cepas UEA_012 e UEA_022 obtiveram 51% e 57% de conversão, respectivamente. A síntese de linoleato de dodecila mediada pelo isolado UEA_015 alcançou 50% de conversão. A cepa UEA_028 obteve percentuais próximos nestas duas reações (52% e 50%, respectivamente). Os resultados sugerem que as lipases ligadas ao micélio destas cepas, após otimização das condições reacionais, podem melhorar seu desempenho nestas reações.

4.1.1 Comparação dos resultados obtidos por CLAE e por RMN-H¹ para síntese do linoleato de dodecila

A fim de avaliar o desempenho de reações biocatalíticas, torna-se fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e precisos. Sendo o meio reacional constituído por uma mistura de compostos, especialmente quando células íntegras de microrganismos são utilizadas como biocatalisadores, faz-se necessária a separação destas moléculas e posterior quantificação. Técnicas cromatográficas acopladas a detectores UV-Vis, por exemplo, vêm ao encontro da resolução deste problema (TENG e XU, 2007). A determinação da conversão de reações de esterificação por RMN-H¹ vem também sendo reportada em estudos biocatalíticos, pois se trata de uma técnica extremamente útil na determinação de compostos orgânicos (LISBOA 2006, SEBRÃO 2007, ZANOTTO *et al.*, 2009).

Visando confirmar os resultados obtidos por CLAE e contribuir para a validação da metodologia empregada neste trabalho na triagem de fungos amazônicos para aplicação em biocatálise, a percentagem de conversão a ésteres na reação de esterificação do ácido linoléico com dodecanol em n-hexano foi também determinada por RMN-H¹. Os resultados obtidos pelos dois métodos analíticos para cada uma das 30 cepas utilizada na reação de síntese do linoleato de dodecila estão apresentados na **Tabela 7** (pag. 53).

Tabela 7 – Síntese do linoleato de dodecila – resultados obtidos por RMN-H¹ e por CLAE

Código UEA	Linoleato de dodecila %	
	RMN-H ¹	CLAE
001	48	43
002	20	6
005	7	1
006	78	68
007	74	98
010	2	0
011	11	1
012	15	8
013	12	1
014	35	38
015	54	50
016	30	16
018	12	0
019	2	0
023	37	34
025	24	14
026	6	6
027	30	19
035	3	0
044	7	0
049	4	10
050	3	1
057	7	0
059	6	1
060	6	0
063	4	0
064	10	1
068	8	1
071	4	1
115	94	94

Observa-se nesta tabela que os valores obtidos pelas duas técnicas são, via de regra, próximos. Os valores obtidos por RMN-H¹ são em geral um pouco maiores, pois nessa técnica quantificam-se todos os ésteres formados, enquanto que por CLAE, apenas o linoleato de dodecila é considerado.

Teng e Xu (2007) realizaram uma análise de tendência a fim de estabelecer a correlação entre os métodos de colorimetria (UV-Vis) e de titulação na determinação da atividade sintética de lipases ligadas à célula de 30 linhagens mutantes de *Rizhopus chinensis*, obtendo 0,8287 como valor de R². A **Figura 16** mostra uma

análise de tendência semelhante feita com os resultados obtidos pelas duas técnicas (CLAE/UV e RMN) utilizadas na determinação da atividade sintética das lipases ligadas à célula de 30 cepas de fungos amazônicos.

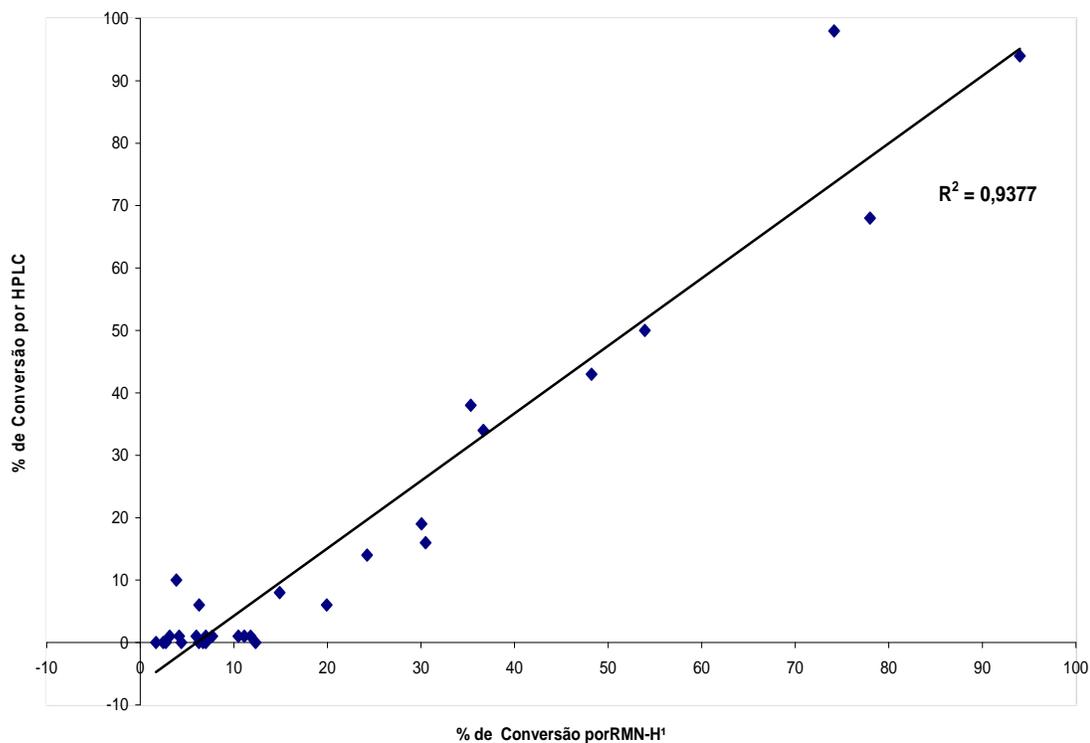


Figura 16 - Correlação entre as porcentagens de conversão a éster na síntese do linoleato de dodecila determinadas via CLAE/UV e via RMN-H¹.

O valor de R^2 (0,9377) indica a correlação existente entre as duas variáveis, o que pode ser considerado um bom indicativo da confiabilidade dos resultados obtidos e da validade da metodologia empregada na quantificação via CLAE/UV.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENANTIOSSELETIVA

4.2.1 Resolução do (*R,S*)-2-octanol

Logo no início dos experimentos da triagem de atividade sintética, quatro cepas (UEA_001, UEA_007, UEA_027 e UEA_115) que apresentaram altos percentuais de conversão a éster foram as primeiras a serem avaliadas quanto à atividade enantiosseletiva através do ensaio de resolução do (*R,S*) 2-octanol via transesterificação com acetato de vinila. Alíquotas foram coletadas em três tempos de reação (24h, 48h e 72h). Neste ensaio, duas cepas (UEA_001 e UEA_115) alcançaram $c \geq 5$. Os valores de ee_s , ee_p , c e E obtidos nas reações mediadas por estas cepas são mostrados na **Tabela 8**. A enzima comercial Novozym 435 foi usada como padrão de referência.

Tabela 8 – Parâmetros de avaliação da atividade enantiosseletiva ($ee_s\%$, $ee_p\%$, $c\%$ e E) obtidos com duas cepas fúngicas que alcançaram $c\% \geq 5$, tendo a enzima comercial 435 como padrão de referência, em três diferentes tempos de reação (24, 48 e 72 h), utilizando 50 mg de micélio/enzima em hexano (28 °C, 180 rpm)

biocatalisador	tempo (h)	$ee_s\%$ ^a	$ee_p\%$ ^b	$c\%$ ^c	E^d
435	24	99	91	52	104
UEA_115	24	4	63	5	4
435	48	99	89	52	87
435	72	76	69	52	12
UEA_001	72	5	87	5	15
UEA_115	72	19	86	17	15

^a calculado com base na equação 1, a partir de concentrações determinadas por CGMS; ^b calculado com base na equação 2, a partir de concentrações determinadas por CGMS; ^c calculado com base na equação 3; ^d calculado com base no software disponível em <http://www.orgc.tugraz.at/eseite1.HTM>

Os valores dos parâmetros de avaliação da atividade enantiosseletiva apresentados na **Tabela 8** mostram que mesmo as cepas fúngicas com melhor desempenho exibiram uma capacidade de resolução significativamente inferior a da enzima comercial 435. Entretanto, observou-se que houve aumento destes valores com o decorrer do tempo. Em razão disso, o ensaio de atividade enantiosseletiva foi

repetido nas mesmas condições, sendo as alíquotas coletadas após 120h de reação.

Neste segundo ensaio, além das quatro cepas anteriormente avaliadas, foram incluídas mais cinco que, no decorrer da triagem da atividade sintética, apresentaram também altos percentuais de conversão, as quais foram: UEA_006, UEA_014, UEA_023, UEA_041 e UEA_053. Os resultados deste terceiro experimento de atividade enantiosseletiva são mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Parâmetros de avaliação da atividade enantiosseletiva ($ee_s\%$, $ee_p\%$, $c\%$ e E) obtidos com cepas fúngicas após 120 h de reação, tendo a enzima comercial 435 como padrão de referência, utilizando 50 mg de micélio/enzima em hexano (28 °C, 180 rpm)

biocatalisador	$ee_s\%$ ^a	$ee_p\%$ ^b	$c\%$ ^c	E ^d
435	99	44	69	11
UEA_001	0	0	0	0
UEA_006	6	99	5	>200
UEA_007	9	99	8	>200
UEA_014	6	99	5	>200
UEA_023	3	99	2	>200
UEA_027	8	99	7	>200
UEA_041	9	99	8	>200
UEA_053	22	99	18	>200
UEA_115	29	99	22	>200

^a calculado com base na equação 1, a partir de concentrações determinadas por CGMS; ^b calculado com base na equação 2, a partir de concentrações determinadas por CGMS; ^c calculado com base na equação 3; ^d calculado com base no software disponível em <http://www.orgc.tugraz.at/eseite1.HTM>

A **Tabela 9** mostra um expressiva melhora nos parâmetros de avaliação da enantiosseletividade para as reações mediadas por cepas após 120h, quando comparadas com os valores do experimento anterior. Os isolados UEA_115 e 053 foram os que se mostraram mais promissores, pois obtiveram os maiores percentuais de conversão (22% e 18%, respectivamente), além de terem alcançado excelentes valores de ee_p (99%) e de E (>200). Segundo Faber (2004), os valores de E menores do que 15 são inaceitáveis para propósitos práticos. Valores de E entre 15 e 30 são considerados de moderados a bons, e acima destes valores são excelentes, sendo o valor 200 o limite de acurácia da técnica, visto que, a partir

deste valor, mesmo uma variação extremamente pequena do ee_s ou do ee_p causa uma mudança significativa no valor numérico de E.

Assim, estes resultados indicam o potencial das cepas UEA_115 e UEA_053 na obtenção de álcoois opticamente ativos. Conseqüentemente, a otimização das condições reacionais será de fundamental importância para o aumento das conversões a produto.

4.2.2 Resolução do (R,S)-ibuprofeno

As cepas UEA_015, UEA_053, e UEA_006 foram avaliadas quanto à capacidade de resolução do (R,S)-ibuprofeno. Os resultados são apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Enantiosseletividade das reações de resolução do ibuprofeno mediada por fungos amazônicos ao longo do tempo de reação.

Biocatalisador	ee (%) ^a			
	48h	96h	120h	168h
UEA_006	8,5	8,5	7,7	6,8
UEA_053	8,1	8,4	8,3	6,1
UEA_115	9	9,5	7,7	5,1
controle	7	8,3	5,7	7,5
Novozym 435	36	48	43	8

^a Valores obtidos por comparação entre as áreas dos picos referentes ao (R) e ao (S)-ibuprofeno

Os resultados demonstram que, com a metodologia empregada neste trabalho, os isolados fúngicos avaliados não foram eficientes na resolução do (R,S)-ibuprofeno. Os excessos enantioméricos foram baixos, indicando a necessidade da otimização das condições reacionais. É possível também que tempo de reação (até 168 h) não tenha sido suficiente, pois Carvalho *et al* (2005), ao avaliar a capacidade enantiosselitiva de três lipases microbianas via esterificação do ibuprofeno, verificaram que esterificação mediada pelas lipases de *Aspergillus niger* e de *Geotrichum candidum* iniciou somente após 250 h.

4.3 ESTUDO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA – AVALIAÇÃO DO ENSAIO EM PLACA UTILIZANDO ÓLEO DE OLIVA COMO SUBSTRATO

4.3.1 Seleção dos fungos utilizados

Foram selecionados dois grupos de dez cepas. O grupo I foi formado por cepas que haviam obtidos percentuais de conversão expressivos nas reações de síntese de linoleato de dodecila, as quais foram UEA_007, UEA_115, UEA_041, UEA_006, UEA_028, UEA_001, UEA_014, UEA_053, UEA_023 e UEA_027. O grupo II foi formado por oito cepas que tiveram percentual de conversão igual ou próximo a zero para esta reação, a saber, as cepas UEA_064, UEA_059, UEA_017, UEA_005, UEA_060, UEA_057, UEA_055 e UEA_046. Todas as cepas selecionadas já haviam sido previamente avaliadas, em trabalhos anteriores, no ensaio com o substrato tributirina, obtendo resultado positivo.

4.3.2 Previsões do ensaio

Os expressivos percentuais de conversão alcançados na triagem de atividade sintética pelas cepas do grupo I foram considerados evidência segura da presença de lipases ligadas ao micélio nestes isolados. Por sua vez, a ausência de atividade de síntese em meio orgânico das cepas do grupo II foi tomada como uma indicação de que estes isolados talvez não apresentassem lipases ligadas ao micélio em quantidade significativa. O resultado positivo que as cepas do grupo II obtiveram no ensaio com tributirina poderia ser explicado como tendo sido devido à ação de esterases em vez de lipases, visto que este substrato pode ser degradado por ambas as classes de enzimas. .

Partindo dessas premissas, esperava-se confirmar no decorrer deste ensaio as seguintes previsões:

A - Haveria pelo menos algumas cepas que não apresentariam halo indicativo de atividade hidrolítica, visto que o óleo de oliva é um substrato mais específico para lipases do que a tributirina.

B – Todas as cepas do grupo I, que seguramente possuem lipases ligadas ao micélio, apresentariam halo.

C - Todas ou a maioria das cepas do grupo II não apresentariam halo, pois sua baixa atividade de síntese em meio orgânico poderia indicar ausência de lipases ligadas ao micélio. A eventual presença de halo em alguma das placas inoculadas com cepas do grupo II poderia indicar que aquela cepa específica produz lipases com boa atividade de hidrólise mas com baixa ou nula atividade de síntese em meio orgânico.

4.3.3 Teste das formulações

Conforme descrito no item 3.4.1 deste trabalho, foram testadas sete formulações diferentes para preparação do meio de cultura no qual seriam inoculados os fungos. A primeira formulação foi a proposta por Colen (2006). Utilizando-se a formulação e a metodologia descrita por este autor não se conseguiu obter um meio com adequadas homogeneidade e consistência para a inoculação dos fungos. Ao contrário, o meio obtido resultou ser heterogêneo e de consistência pastosa, com solidificação inadequada, não se prestando ao uso.

Foram então testadas seis variações da formulação de Colen. Duas delas (Teste 2 e Teste 6) alcançaram homogeneidade e consistência adequadas para a inoculação e foram efetivamente utilizadas no ensaio com as 18 cepas. Dentre estas duas formulações, somente nas placas contendo a formulação Teste 2 foi observada a formação de halo indicador de atividade lipolítica_ (**Figura 17**, pg 60).



Figura 17 - Visualização da formação de halo translúcido em volta do crescimento fúngico no isolado UEA_007 (*Aspergillus niger*), indicando atividade hidrolítica.

Os resultados obtidos com o uso da formulação Teste 2 são apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Resultados do ensaio em placa utilizando óleo de oliva, por grupo.

grupo	cepa	% de conversão	presença de halo após 96 h	
I	UEA_007	98	Positivo	
	UEA_115	94	Positivo	
	UEA_041	78	Negativo	
	UEA_006	68	Negativo	
	UEA_028	50	Positivo	
	UEA_001	43	Positivo	
	UEA_014	38	Positivo	
	UEA_053	38	Negativo	
	UEA_023	34	Positivo	
	UEA_027	12	Positivo	
	II	UEA_064	1	Negativo
		UEA_059	1	Positivo
		UEA_017	1	Positivo
UEA_005		1	Positivo	
UEA_060		0	Positivo	
UEA_057		0	Positivo	
UEA_055		0	Negativo	
UEA_046		0	Positivo	

Conforme observamos dos resultados da **Tabela 11**, apenas uma das três previsões feitas a respeito deste ensaio se confirmou. Em harmonia com a Previsão A, cinco cepas não apresentaram halo nas placas em que foram inoculadas. Levando-se em conta que todas as cepas testadas neste ensaio haviam apresentado halo indicador de hidrólise frente ao substrato tributirina, observa-se que o ensaio com óleo de oliva mostrou-se mais seletivo. A Previsão B era de que todas as placas inoculadas com cepas do grupo I apresentassem halo indicativo de atividade hidrolítica após 96 h de inoculação, entretanto, as placas inoculadas com as cepas UEA_041, UEA_006 e UEA_053 não exibiram o halo. É possível que o tempo de observação tenha sido curto para estes isolados, cujo metabolismo é provavelmente mais lento do que o dos demais deste grupo. Quanto ao grupo II, o resultado foi exatamente o oposto da Previsão B: a maioria das placas inoculadas com cepas deste grupo, as quais tiveram percentuais de conversão nulos nas reações de síntese, apresentaram atividade de hidrólise frente ao substrato óleo de oliva. Das oito cepas, somente os isolados UEA_064 e UEA_055 não apresentaram halo nas placas em que foram inoculados. Isto pode ser explicado pelo fato de que, como é amplamente mencionado na literatura, não há correlação entre a atividade de síntese em meio orgânico e a atividade hidrolítica das lipases (TENG e XU, 2007; TORRES *et al*, 2003; CARDENAS *et al*, 2001). Assim sendo, as cepas que mediarão reações com percentuais nulos de conversão na síntese do linoleato e que, ainda assim, exibiram halo de atividade de hidrólise no ensaio com óleo de oliva, são possivelmente detentoras de lipases com maior capacidade de atuação para hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa em meio aquoso do que para sintetizar ésteres em meio orgânico.

Estes resultados sugerem que o ensaio hidrolítico com o substrato óleo de oliva, como método alternativo ao ensaio com tributirina na triagem preliminar de lipases, apresenta dois inconvenientes: 1) maior dificuldade em se obter um meio homogêneo e de consistência adequada, provavelmente em razão da difícil emulsificação do óleo de oliva; 2) a possibilidade de ocorrência de falsos negativos quanto se testam isolados com metabolismo mais lento. Este segundo inconveniente é especialmente preocupante, pois poderia levar a eliminação, no decorrer da triagem, de isolados produtores de lipases com expressiva atividade sintética em meio orgânico, como teria sido o caso das cepas UEA_041, UEA_006 e UEA_053.

5.0 CONCLUSÕES

1 - Isolados fúngicos de plantas da região amazônica avaliados neste trabalho apresentaram grande potencial como fornecedores de lipases para aplicação em biocatálise, pois:

- Comparando a atuação destes isolados na triagem de atividade sintética com a atuação enzima comercial Novozym 435, que foi utilizada como padrão de referência (100 % de conversão), percebe-se que as lipases ligadas ao micélio não purificadas apresentam excelente potencial biocatalítico. Na síntese de linoleato de dodecila, as cepas UEA_007 e UEA_115 chegaram muito perto do percentual de conversão do padrão de referência (98% e 94%, respectivamente). A UEA_115 obteve ainda um excelente percentual de conversão na síntese do oleato de pentila (91%), assim como a UEA_001 (85%), nesta mesma reação. O isolado UEA_007, por sua vez, obteve 87% de conversão na reação de transesterificação entre palmitato de p-nitrofenila e etanol.
- Quanto a atividade enantiosseletiva, os isolados UEA_115 e UEA_053 também apresentaram potencial para a resolução do álcool racêmico 2-octanol, obtendo os maiores percentuais de conversão entre as cepas testadas (22% e 18%, respectivamente), além de terem estas duas cepas alcançado excelentes valores de excesso enantiomérico do produto (99%) e de razão enantiomérica (>200).

2 - Os ensaios utilizados na triagem da atividade sintética permitiram identificar cepas produtoras de lipases com alta capacidade para mediar tanto reações de esterificação como reações de transesterificação, como as cepas UEA_001 e UEA_007. Com a realização destes ensaios foi possível identificar também cepas que possuem lipases com atuação mais específica para um destes tipos de reação. O isolado UEA_115, por exemplo, obteve altos percentuais de conversão para as esterificações dos ácidos oléico e linoléico (91% e 94%, respectivamente) e baixos percentuais para a transesterificação do palmitato de p-nitrofenila (24%). O isolado UEA_27, por sua vez, teve bom desempenho na transesterificação (67%) e

performance inferior nas sínteses dos ésteres oleato de pentila e linoleato de dodecila (21% e 19%).

3 - A comparação dos valores obtidos por CLAE e por RMN para o ensaio de síntese do linoleato de dodecila revelou uma alta correlação entre estes valores ($r^2 = 0,9377$), o que pode ser considerado um bom indicativo da confiabilidade dos resultados obtidos e da validade da metodologia empregada para quantificação da conversão via CLAE.

4 - Com a metodologia empregada neste trabalho, os isolados fúngicos amazônicos UEA_115 e UEA_053 não apresentaram capacidade de resolução para o (R,S)-ibuprofeno.

5 - O ensaio de atividade hidrolítica utilizando óleo de oliva como substrato, apesar de mais seletivo do que o ensaio usando tributirina, apresentou dois sérios inconvenientes: a) maior dificuldade em se obter um meio homogêneo e de consistência adequada, provavelmente em razão da maior dificuldade para emulsificar o óleo de oliva; b) a possibilidade de ocorrência de falsos negativos quanto se testam isolados com metabolismo mais lento. Assim sendo, nas condições em que foi empregado neste trabalho, não se recomenda o uso deste ensaio para a triagem preliminar de fungos produtores de lipase.

6.0 SUGESTÕES E PERSPECTIVAS

Prosseguir com a identificação taxonômica e molecular dos isolados fúngios UEA_001, UEA_006, UEA_007, UEA_014, UEA_023, UEA_027, UEA_041, UEA_053 e UEA_115, os quais obtiveram melhor desempenho nas reações de síntese e de enantiosseletividade.

Testar os isolados acima citados como biocatalisadores frente a outros substratos passíveis de esterificação e/ou transesterificação enantiosseletiva, a fim de ampliar a possível gama de aplicações destes isolados.

Modificar as condições da reação do ibuprofeno (solvente, tempo de reação, massa micelial) visando melhorar os percentuais de conversão e assim poder avaliar melhor a capacidade de resolução das lipases ligadas ao micélio para este fármaco.

Avaliar novas metodologias de cultivo e obtenção de massa micelial, visando aumentar a quantidade de biomassa disponível, possibilitando assim testar a influência de fatores tais como o tempo decorrido desde o cultivo e as condições de armazenagem no desempenho das lipases ligadas ao micélio.

7.0 REFERÊNCIAS

ADRIO, L. J; DEMAIN, L. A.; Fungal Biotechnology. **Internacional Microbiology**, 6, p.191-199, 2003.

AITKEN, R. A. : KILENYI, S. N. **Asymmetric Synthesis**, London; Blackie Academic & Professional, 1992, 233p.

ARNOLD, F. H.; Directed Evolution: Creating Biocatalysts for the Future. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n.. 23, p. 5091-5102, 1996

ARNOLD, F. H.; Combinatorial and computacional challenges for biocatalyst design. **Nature**, 409, p. 253-257, 2001

BACAS (Belgian Academy Council of Applied Science) Industrial Biotechnology and Sustainable Chemistry. Bruxelas, Belgique, 2004, 69p. Disponível em www.europabio.org/documents/150104/bacas_report_en.pdf Acessado em 22/05/2007

BARALDI, P.T.; CORRÊA, A. G. O emprego do fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae*, na síntese de feromônios. **Química Nova**, v.27, n.3, p.421-431, 2004.

BEISSON, F.; TISS, A; RIVIERE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay; a critical review. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**, p.133-153, 2000.

BENNETT, W. J. Mycotechnology – The role of fungi in Biotechnology. **Journal of Biotechnology**, 66, p.101-107, 1998.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. Introduction to Biocatalysis. **Biocatalysis and Enzyme Technology**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA, Weinheim, 2004, 18p.

BRADY, L.; BZRZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGEJENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, V. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. **Nature**, 343, p.767-770, 1990.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. Introduction to enzyme technology. **Biocatalysis and Enzyme Technology**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA, Weinheim, 2005, 26p.

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; DE CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, W. S.; SINISTERRA, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 14, p.111-123, 2001.

CARVALHO, O. P.; CALAFATTI, A. P. S.; MARASSI, M.; DA SILVA, M. D.; CONTESINI, J. F.; BIZACO, R. Potencial de Biocatálise enantiosseletiva de lípases microbianas. **Química Nova**, v.28, n.4, p.614-621, 2005.

CASTRO e SILVA, A; SILVA, M. B. C.; CAVALCANTI, M. A. Fungos: o inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica. Disponível em http://www.geocities.com/biodiversidade_2002/fungos.htm. Acessado em 20/09/2007.

CASTRO, F. H.; MENDES, A A; DOS SANTOS, C. J. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

CEFET/RJ. **Análise instrumental – Cromatografia Líquida de Alta Resolução**, Apostila, p.1-28, 2006. Disponível em www.cefeteq.br/aluno/arquivos/apostilas/instrumental/CLAE.pdf. Acessado em 01/11/07

CHEN, L. S. Triagem de alto desempenho na detecção de atividade de epóxido-hidrolases e monooxigenases utilizando células integras. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 2006, 214p.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, G. R.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 22, p.881-885, 2006.

CONTI, R.; RODRIGUES, R. J. A; MORAN, S. J. P. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, v.24, n.5, p.672-675, 2001.

CONVERTI, A.; ZILLI, G. R.; MOLINARI, F. Synthesis of ethyl phenylacetate by lyophilized mycelium of *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, 67, p. 637-640, 2005.

COSTAS, M.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2109–2114, 2004.

DALLA-VECHIA, R. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4 p.623-630, 2004.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, H.I. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: V, P. Gullo (ed), **The discovery of natural products with therapeutic potential**, Butterworth-Heinemann, London, United Kingdom, 1994, 31p.

EGGERT, T.; VAN POUDEROYEN, G.; DIJKSTRA, B. W.; JAEGER, K. Lipolytic enzymes Lip A and Lip B from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. **FEBS. Lett**, 502, p.89-92, 2001.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**, Ed. EDUCS, Caxias do Sul, RS, 2004, 510p.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**, Berlin:Springer-Verlag, 2004, 454p.

FESSNER, W.D. Are paradigms changing in favor of Biocatalysis? **Adv.Synth.Catal**, p.32-37, 2003.

FRIEDRICH, J.; GRADISAR, M.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J. P. Screening fungi for synthesis of Keratolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, 28, p.127-130, 1999.

GANDOLFI, R.; MARINELLI, F.; LAZZARINI, A.; MOLINARI, F. Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. **Journal of Applied Microbiology**, 89, p.870-875, 2000.

GASPAR, L. M.; POLLERO, R.; CABELLO, M. Biosynthesis and degradation of glycerides in external mycelium of *Glomus mosseae*. **Mycorrhiza**, 11, p.257-261, 2001.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedrom**, v.63, n.786, p.1721-1754, 2007.

GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Methods**, 36, p.139-147, 2005.

GODDARD, J. P.; REYMOND, J. L. Recent Advances in enzyme assays. **Trends in Biotechnology**, v.22, n.7, p. 363-370, 2004.

GOMES, M. F.; DE PAULA, V. A.; SILVA, S. G.; CASTRO, F. H. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Cândida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonilnidazol. **Química Nova**, v.29, n.4, p.710-718, 2006.

GOTOR-FERNANDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lípases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 40, p.111-120, 2006.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, M. A. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.3, p.454-500, 1999.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Lípases localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel fuel production. **J. Biosci. Bioeng**, 101, p.328-333, 2006.

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

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology** 50, p.9-18, 2004.

ILLANES, A. Stability of biocatalysts. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v.2, n.1, p.1-7, 1999.

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

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, 13, p.390-397, 2002.

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

JENSEN, R. G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, 18, p.650-657, 1983.

JOHANNES, T.; SIMURDIK, R. M.; ZHAO, H. Biocatalysis. **Encyclopedia of Chemical Processing**, Taylor & Francis, 2006, 9p.

KOLBZ, H. K.; HILDEBRAND, H.; PIEL, N.; SCHRODER, S.; ZITZMANN, W. Biotechnology in the chemical industry. **Pure and Applied Chemistry**, v.60, n.6, p.825-831, 1988.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.1, p.211-213, 1987.

LAWSON, D. M.; BRZOZWSKI, A. M.; RETY, S.; VERMA, C.; DODSON, G. G. **Protein. Eng**, 7, p.543-548, 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas, cap.8. **Principios de Bioquímica**, Sarvier, 3.ed, São Paulo, 2002, 975p.

LEUERBERGER, H. G. W. Biotransformation – A useful tool in organic chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.62, n.4, p.753-768, 1990.

LIMA, G. M. V. Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, 2004, 151p.

LISBÔA, L. U. S. Seleção de fungos isolados da região amazônica como fornecedores de lipases para biotransformações. **Dissertação de Mestrado**, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2006, 45p.

LOO, L.J.; LAI, M. O.; LONG, K.; GHAZALI, M. H. Fatty acid preference of mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Geotrichum candidum*. **World. J. Microbiol. Biotechnol.** p.1-9, 2007.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformation in organic synthesis. **Bioresource Technology**, v.74, p.49-62, 2000.

MENDES, A.A.; CASTRO, F. H. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios. **Química Nova**, v.28, n.2, p.296-305, 2005.

OECD. **The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability**, cap.2, Paris, France, 2001, OECD.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Industrial microbial enzymes: their Discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.367-375, 2002.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. **Tibtech January**, v.17, p.13-20, 1999.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, S. Preservação e prospecção dos recursos microbianos. **Construindo a história dos produtos naturais**, outubro de 2006, 19p.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, R. C.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOLS, T. V. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 29, p.119-131, 1999.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, 64, n. 2, p.227-229, 2002.

PINHEIRO, S.; FERREIRA, F. V. Abordagens em síntese assimétrica. **Química Nova**, v.21, n.3, p.312-317, 1998.

PINTO, G.M.F. **Química Orgânica Prática – Análise de Compostos Orgânicos**, Apostila, p.1-48, 2006. Disponível em www.protimu.com.br/edu/QOPAC.pdf Acessado em 14/10/2007.

RAST, M. D.; BAUMGARTNER, D.; MAYER, C.; HOLLENSTEIN, O. G. Cell wall-associated enzymes in fungi. **Phytochemistry**, 64, p.339-366, 2003.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento da sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, 27, n.5, p.807-812, 2004.

ROMERO, M. C.; BAIGORI, M. D.; PERA, M. L. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied. Microbiology. Biotechnology**, p.1067-1069, 2007.

SAAD, E. B. Etanolise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, 2005, 99p.

SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 40, p.390-393, 2007.

SANSEVERINO, M. A Síntese orgânica limpa. **Química Nova**, 23(1), p.102-107, 2000.

SANTOS, M. M. Utilização da mutagênese aleatória para obtenção da lipase de *Burkholderia cepacia* com variação nas propriedades catalíticas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005, 120p.

SCHMID, A.; DORDICK, S. J.; HAUER, B.; KIENERS, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v.409, n.11, january, p.258-267, 2001.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria**, Editora da Universidade de Caxias do Sul, RS, 2002, EDUCS, 433p.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERGEY, V. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19, p.627-662, 2001.

SILVA, M. F.; BERGO DE LACERDA, P. S.; JUNIOR, J. J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, v.28, n.1, p.103-110, 2005.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ed, John Wiley & Sons, Inc, Rio de Janeiro, 2000, 460p.

SMITH, J.L.; HAAS, M. J. Lipolytic microorganisms. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, eds. Vanderzant. C. & Splittstoesser. D. F, 3rd edn, Washington DC: American Public Health Association, 1992, 8p.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, John Wiley & Sons Inc., New York, 1979, 863p.

SOLOMON, T.W.G; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v.1, 8ed, Rio de Janeiro, 2005, 715p.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFFI FILHO, S.; BELEM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia *Paulicourea longiflora* (aubl) rich e *Strychnos cogens* Benthem. **Acta Amazônia**, v.34, n.2, p.185-195, 2004.

STRAATHOF, J. J. A.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.548-556, 2002.

TENG, Y.; XU, Y. A modified para-nitrophenol assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, 363, p. 297-299, 2007.

TICOM, S. T. T. Otimização de parâmetros para obtenção de ácido mandélico a partir de mandelato de etila utilizando lipases. **Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, RJ**, 2003, 10p.

TORRES, M.; BARBOSA, E.; LOSCOS, V.; CANELA, R. Lipase activity of resting cells of *Aspergillus flavus* after solvent washing; memory effects from endogenous substrate arising from the original growth medium. **Biotechnol. Lett.**, v.22, p.1265-1268, 2000.

TORRES, M.; DOLCET, M. M.; SALA, N.; CANELA, R. Endophytic fungi associated with mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. **J. Agric. Food. Chem.**, v.51, p.3328-3333, 2003.

VAN BELIEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.338-334, 2002.

VOGEL, A.I., **Análise química quantitativa**. 5ed., LTC, Rio de Janeiro, 1992, 712p.

WANG, D. Synthetic activity enhancement of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* by pretreatment with isooctane. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p.1-8, 2007.

ZAKS, A.; KLIBANOV, M. A. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p.3192-3196, 1985.

ZANOTTO, S.P. Utilização de enzimas e microorganismos para a obtenção de compostos óticamente ativos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003, 100 pgs.

ZANOTTO, S. P.; ROMANO, I. P.; LISBOA, L. U. S.; DUVOISIN JR, S.; MARTINS, M. K.; LIMA, F. A.; SILVA, S, F.; ALBUQUERQUE, P. M.. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from amazonian fungi. **J. Braz. Chem Soc.**, Vol. 00, N. 00, 1-14, 2009

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.