



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

**SELEÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE PLANTAS DA REGIÃO
AMAZÔNICA COMO FORNECEDORES DE LIPASES PARA
BIOTRANSFORMAÇÕES**

LÍLIAM URURAHY DE SOUZA LISBÔA

MANAUS

2006

LÍLIAM URURAHY DE SOUZA LISBÔA

**SELEÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE PLANTAS DA REGIÃO
AMAZÔNICA COMO FORNECEDORES DE LIPASES PARA
BIOTRANSFORMAÇÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. SANDRA PATRICIA ZANOTTO**

MANAUS

2006

LÍLIAM URURAHY DE SOUZA LISBÔA

**SELEÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE PLANTAS DA REGIÃO
AMAZÔNICA COMO FORNECEDORES DE LIPASES PARA
BIOTRANSFORMAÇÕES**

Dissertação de Mestrado

Área de Concentração: Biocatálise

Data da Aprovação: 15 de dezembro de 2006

Banca Examinadora:

Dr. José Odair Pereira

Dr. Alberto dos Santos Marques

*Às minhas filhas, que nunca
desistam da busca pelo saber.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família: Alexandre, Juliana, Mariana e Gabriela, pelo amor, carinho, incentivo e apoio constantes.

Aos meus pais pela sabedoria transmitida, confiança no meu trabalho, crença no meu sucesso e amor incondicional.

Aos meus irmãos, cunhado, cunhadas, sobrinhos e sogros pelo incentivo, carinho e torcida.

À minha amiga Edna, pelo suporte logístico sem o qual não teria conseguido terminar o curso, pela amizade e compreensão em todos os momentos.

À minha orientadora Prof^ª Sandra Patricia Zanotto, pelos ensinamentos, paciência, confiança, dedicação e grande amizade, minha enorme gratidão.

Ao Prof José Odair Pereira e à Prof^ª Jania Lilia Bentes, pelo acolhimento no laboratório de bioativos da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM, pelos ensinamentos e incentivos; aos seus orientandos pela ajuda.

À Prof^ª Maria da Graça Nascimento, pelo acolhimento no laboratório de biocatálise do Departamento de Química da UFSC, pelas sugestões, interesse, e apoio nesse trabalho; aos seus orientandos pela ajuda.

Ao Prof Ademir Castro e Silva pelas dicas e sugestões e aos demais companheiros de laboratório: Ernesto e Emerson pelas conversas, experiências trocadas, suporte e amizade.

À Aline Rondon e Rafael Oliveira por cederem os fungos endofíticos de mandioca e pimenta-de-macaco, resultados de suas pesquisas.

À Elisângela pelos ensinamentos práticos e companheirismo.

À Cristiane, Patrícia, Ângelo, Roque, Junior e Laura pelo apoio e ajuda nas análises na UFSC e no CBA.

Aos colegas da “turma de mestrado de 2004”, por me fazerem lembrar os bons tempos de faculdade, em especial à Renata, Helio Leonardo e Lyana, pela amizade e carinho.

Aos alunos de Iniciação Científica: Elton, Elelsonluz e Luiza Fernanda pela ajuda no laboratório e experiências trocadas.

À Mayra K. Martins pela ajuda e identificação dos fungos utilizados.

Às bibliotecárias do INPA, Yeda e Wanda, responsáveis pelo COMUT, pela ajuda.

À Prof^ª Maria de Fátima Bigi por me incentivar a entrar no curso de mestrado.

Ao Prof Massayoshi Yoshida e seus colaboradores pela ajuda nas análises de ressonância e cromatográficas, e em especial ao CBA, pelo suporte em sua Central Analítica.

Aos professores da banca examinadora.

Ao CNPq e FAPESAM pelo suporte financeiro, e à UEA pela infra-estrutura.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA	1
1.1 MICRORGANISMOS	3
1.2 FUNGOS	3
1.2.1 Fungos Endofíticos	4
1.2.2 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	4
1.2.3 FUNGOS DEGRADADORES DE MADEIRA	5
1.3 ENZIMAS	5
1.4 LIPASES	7
1.4.1 Lipases em Biotransformações	13
1.5 ACOMPANHAMENTO DAS REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO	14
1.5.1 Cromatografia de Camada Delgada	14
1.5.2 Ressonância Magnética Nuclear	15
1.6 PARÂMETROS QUANTITATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DA ENANTIOSSELETIVIDADE DE REAÇÕES BIOCATALISADAS	15
1.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA PUREZA ENANTIOMÉRICA	17
1.7.1 Cromatografia Gasosa	17

2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. METODOLOGIA	20
3.1 OBTENÇÃO DOS FUNGOS	20
3.1.1 Isolamento dos Fungos Endofíticos	20
3.1.2 Isolamento dos Fungos Fitopatogênicos	21
3.1.3 Fungos Degradadores de Madeira	21
3.2 TRIAGEM PRELIMINAR DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DOS FUNGOS	21
3.2.1 Preparação do Meio de Incubação	21
3.2.2 Inoculação, Incubação, e Medição do Halo	22
3.3 TRIAGEM DA ATIVIDADE BIOCATALÍTICA DOS FUNGOS SELECIONADOS	22
3.3.1 Cultivo dos Microrganismos	22
3.3.2 Preparação das Células em Repouso	23
3.3.3 Ensaio da Atividade Biocatalítica	23
3.3.4 Influência do Teor de Água na Atividade Biocatalítica	24
3.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ENANTIOSSELETIVA	24
3.4.1 Síntese do Padrão Racêmico de Acetato	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 TRIAGEM DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DOS FUNGOS	27
4.1.1 Fungos Endofíticos	27
4.1.2 Fungos Fitopatogênicos	29
4.1.3 Fungos Degradadores de Madeira	33
4.1.4 Potencial dos Fungos Amazônicos	33
4.2 ATIVIDADE BIOCATALÍTICA DOS FUNGOS SELECIONADOS	34
4.2.1 Influência do Teor de Água na Atividade Biocatalítica	37
4.2.2 Porcentagem de Água no Micélio Seco	38
4.3 ATIVIDADE ENANTIOSSELETIVA	39
5. CONCLUSÕES	43
6. SUGESTÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Crescimento de fungos fitopatogênicos isolados de <i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil) e <i>Aloe vera</i> (babosa).	4
Figura 2- Fungo degradador de madeira.	5
Figura 3- Orientação dos pontos de interação no sítio ativo da enzima.	6
Figura 4- Comportamento catalítico das lipases.	8
Figura 5- Representação esquemática das reações catalisadas por lipases.	9
Figura 6- Representação das ligações de éster potencialmente hidrolisáveis em uma molécula de triacilglicerol.	9
Figura 7- Rota biossintética que pode ser empregada na resolução enantiomérica de álcoois.	10
Figura 8- Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Burkholderia (Pseudomonas) cepacia</i> .	11
Figura 9- Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação catalisada por lipase de <i>Humicola lanuginosa</i> .	12
Figura 10- 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 sp</i> imobilizada em poli(oxi de etileno).	18
Figura 11- Espectrômetro utilizado na obtenção dos espectros de RMN- ¹ H.	24
Figura 12- CGMS utilizado para análise da reação enantiosseletiva.	25
Figura 13- Crescimento de fungos fitopatogênicos: 1 e 4 isolados de <i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã); 2 isolado de <i>Bactris gasipaes</i> (pupunha); e 3 isolado de <i>Theobroma cacao</i> (cacau).	31
Figura 14- Visualização da formação do halo translúcido em volta do crescimento fúngico em isolados fitopatogênicos de <i>Bactris gasipaes</i> (pupunha) e <i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã), indicando atividade hidrolítica.	31
Figura 15- Micélios de diferentes isolados, secos e triturados.	34
Figura 16- Espectro de RMN- ¹ H para uma alíquota (72 h) da reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol catalisada pela lipase comercial CAL-B.	36
Figura 17- Espectro de RMN- ¹ H para uma alíquota (72 h) da reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol catalisada pelo isoladoUEA_001.	36

Figura 18-	Espectro de RMN- ¹ H para uma alíquota (72 h) da reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol catalisada pelo isolado UEA_027.	36
Figura 19-	Relação entre a quantidade de água e a porcentagem de conversão a éster na reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol em hexano, catalisada pelo isolado UEA_027, em 24 e 96 h de reação – dados obtidos por RMN ¹ H.	37
Figura 20-	Aparelho Karl-Fischer.	39
Figura 21-	Cromatograma para uma alíquota (48 h) da reação de resolução do (R,S)-2-hexanol com acetato de vinila, catalisada pela lipase comercial de <i>Candida antarctica</i> (CAL-B).	40
Figura 22-	Cromatograma para uma alíquota (48 h) da reação de resolução do (R,S)-2-hexanol com acetato de vinila, catalisada pelo micélio do isolado UEA_027.	40
Figura 23-	Cromatograma para uma alíquota (72 h) da reação de resolução do (R,S)-2-octanol com acetato de vinila, catalisada pela lipase comercial de <i>Candida antarctica</i> (CAL-B).	41
Figura 24-	Cromatograma para uma alíquota (72 h) da reação de resolução do (R,S)-2-octanol com acetato de vinila, catalisada pelo micélio do isolado UEA_027.	41

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Programação utilizada no CGMS para análise das reações de resolução.	26
Tabela 2- Origem e código de identificação dos isolados endofíticos.	27
Tabela 3- Porcentagem de aparecimento de halo dos isolados endofíticos.	29
Tabela 4- Origem e código de identificação dos isolados fitopatogênicos.	29
Tabela 5- Porcentagem de aparecimento de halo dos isolados fitopatogênicos.	32
Tabela 6- Medida dos halos de alguns isolados fitopatogênicos.	32
Tabela 7- Porcentagem total dos isolados que apresentaram halo.	33
Tabela 8- Porcentagem de conversão a éster na reação do ácido oléico com n-pentanol, catalisada por micélios de diferentes origens.	35
Tabela 9- Porcentagem de água presente nos micélios secos.	38
Tabela 10- Conversão a éster (c), excesso enantiomérico do substrato (ee_s), excesso enantiomérico do produto (ee_p) e razão enantiomérica (E) obtidos com a lipase do isolado UEA_027 e a lipase comercial CAL-B na reação do (R,S)-2-octanol com acetato de vinila.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	= acetato
AM	= Estado do Amazonas
BDA	= batata-dextrose-agar
c	= grau de conversão da reação
CBA	= Centro de Biotecnologia da Amazônia
CCD	= cromatografia de camada delgada
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
COMUT	= Programa de Comutação Bibliográfica
%c	= porcentagem de conversão
Dex CB	= β -ciclodextrina
E	= razão enantiomérica
EC	= Enzyme Commission
ee	= excesso enantiomérico
ee _p	= excesso enantiomérico do produto
ee _s	= excesso enantiomérico do substrato
FAPEAM	= Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FCA	= Faculdade de Ciências Agrárias
<i>I</i>	= número de spin
IUBMB	= União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
ID	= diâmetro interno
INPA	= Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
% p/p	= porcentagem peso por peso
RMN	= Ressonância Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	= Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
UEA	= Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	= Universidade Federal do Amazonas
UFSC	= Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

LISBÔA, Líliam Ururahy de Souza. Seleção de fungos isolados de plantas da Região Amazônica como fornecedores de lipases para biotransformações. Manaus, 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UEA, 2006.

Neste trabalho foram cultivados 95 fungos da região amazônica: endofíticos e fitopatogênicos isolados de plantas, e degradadores da madeira. Quando submetidos ao ensaio com o substrato tributirina, 79 isolados apresentaram indicativo de atividade hidrolítica. Dos 79 isolados selecionados, os 26 que mostraram melhores desempenhos de crescimento em meio líquido foram submetidos à avaliação biocatalítica. Das 26 lipases ligadas ao micélio avaliadas como catalisadores na esterificação do ácido oléico com n-pentanol em hexano, a do isolado UEA_027, apresentou conversão de 72% em 72 horas de reação. A capacidade enantiosseletiva da lipase do isolado UEA_027 foi verificada através da resolução do (*R,S*)-2-hexanol e do (*R,S*)-2-octanol via transesterificação com acetato de vinila e hexano como solvente. O fungo selecionado resolveu o álcool (*R,S*)-2-octanol com excesso enantiomérico do produto acima de 88% e uma razão enantiomérica acima de 20.

Palavras-chave: Fungos, lipase, biotransformação, enantiosseletividade, região amazônica.

ABSTRACT

LISBÔA, Líliam Ururahy de Souza. Selection of isolated fungi from plants of the Amazon region as suppliers of lipases for biotransformations. Manaus, 2006. 60s. Dissertation (Master Degree in Biotechnology and Natural Resources) – Graduation Program in Biotechnology, UEA, 2006.

In this work 95 fungi of the Amazon region have been studied: endophytic and phytopathogenic isolated from plants, and wood degrading. When submitted to the assay with tributyrin, 79 isolates presented indicative hydrolytic activity. Of the 79 isolates, 26 that showed better performances of growth in liquid cultures have been submitted to the biocatalytic evaluation. Among the 26 mycelium-bound lipases that were evaluated as catalysts of esterification of oleic acid with n-pentanol in hexane, isolated UEA_027 presented conversions of 72% in 72 hours of reaction. The lipase enantioselective capacity of the isolated UEA_027 was verified through the resolution of (*R,S*)-2-hexanol and of (*R,S*)-2-octanol by transesterification with vinyl acetate and hexane as solvent. The selected fungus resolved the alcohol (*R,S*)-2-octanol with enantiomeric excess of product above 88% and enantiomeric ratio above 20.

Key words: Fungi, lipase, biotransformation, enantioselectivity, amazon region.

1. INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

A biotecnologia é um dos principais setores em desenvolvimento deste século. O caminho para o avanço dos processos biotecnológicos vem sendo pavimentado pela crescente necessidade de abordagens mais seletivas e menos imediatistas do uso dos recursos naturais do planeta (BON; PEREIRA JR., 1999).

Na base de todos os processos biotecnológicos encontra-se a biodiversidade genética que se constitui na mais valiosa alternativa para um desenvolvimento sustentado. Estima-se que o Brasil detenha cerca de 20% da biodiversidade mundial, sendo os ecossistemas amazônicos considerados como o maior potencial natural de matérias-primas nos mais variados setores, no mundo contemporâneo (BARBOSA, 2000, 2001). Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres (SOUZA *et al.*, 2004).

Microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos, leveduras e microalgas são fontes inesgotáveis de compostos úteis. Um número cada vez maior de produtos de química fina, compostos agro-ativos, enzimas e biofármacos é produzido com base na biotecnologia microbiana via biossíntese ou processos de bioconversão (VANDAMME, 1994). Produtos microbianos geralmente apresentam a quiralidade desejada, são biodegradáveis e são produzidos de (agro-) substratos renováveis.

As reações de bioconversões, baseadas no uso de biocatalisadores (células ou enzimas), produzem moléculas com régio e enantiosseletividade interessantes sob condições brandas (VANDAMME, 1994). Essas características das moléculas são particularmente desejadas pela indústria farmacêutica, pois os alvos dos compostos farmacêuticos, como receptores de superfície celular ou enzimas, são biomoléculas quirais. Assim, não é de se admirar que somente um enantiômero da droga quiral tenha a atividade biológica desejada, enquanto outros isômeros apresentam nenhuma ou indesejada atividade (MURALIDHAR *et al.*, 2002; VAN BEILEN; LI, 2002). A fim de melhorar a segurança e eficácia de suas drogas, muitos fabricantes irão aumentar a utilização de ingredientes ativos oticamente puros (VAN BEILEN; LI, 2002), levando a um aumento da necessidade de pesquisas nessa área. Além disso, esses bioprocessos têm impacto ambiental positivo representando uma alternativa aos processos tradicionais da indústria química, que lançam mão de compostos químicos muitas vezes tóxicos, como matérias-primas ou insumos de sua cadeia produtiva (BON; PEREIRA JR., 1999).

Engenhosos procedimentos de seleção de novos metabólitos microbianos primários e secundários, peptídeos bioativos, proteínas e enzimas revelam que somente a ponta do *iceberg* foi explorada. Exemplos de tais novos produtos pertencem a enzimas, inibidores de enzimas, bio-plásticos, toxinas, alcalóides, antibióticos, biopesticidas, aminoácidos e açúcares especiais, polióis e ácidos orgânicos, bioaromatizantes e biopigmentos (VANDAMME, 1994).

As enzimas catalisam reações químicas com grande especificidade e alta taxa de conversão. Estas reações são as bases do metabolismo de todos os organismos vivos, e proporcionam extraordinárias oportunidades para a indústria efetuar conversões biocatalíticas distintas, eficientes e econômicas (VAN BEILEN; LI, 2002). O ciclo da biocatálise começa com a identificação da reação alvo (para estabelecer as especificações do catalisador desejado) ou do processo industrial existente que possa se beneficiar do uso da tecnologia enzimática. O passo seguinte é a seleção do biocatalisador apropriado. Em desenvolvimento de processos tradicionais, as características da enzima frequentemente reprimem os limites operacionais do processo. Entretanto, novos progressos em triagem tornaram possíveis começar os processos com parâmetros ótimos, e peneirar da biodiversidade natural o catalisador ideal (VAN BEILEN; LI, 2002).

Enzimas hidrolíticas (proteases, esterases e lipases) são usualmente empregadas para clivar ligações éster ou amidas e também para sintetizar essas ligações quando há baixas ou nulas concentrações de água combinadas com solventes orgânicos (MURALIDHAR *et al.*, 2002). Até o presente, um grande número de lipases de fungos filamentosos foi extensivamente estudado por ambos os pontos de vista: bioquímico e genético. Entre o número alto de lipases citadas na literatura, somente enzimas pertencentes a poucas espécies têm demonstrado ter estabilidade adequada e capacidade biossintética para permitir o uso rotineiro em reações orgânicas, e então serem consideradas enzimas de relevância industrial (CARDENAS *et al.*, 2001).

A aplicação de diferentes técnicas de imobilização de enzimas produziu consideráveis progressos na eficiência de certos processos (NASCIMENTO *et al.*, 2002). Entretanto, apesar dos avanços na modificação e melhoramento da atividade enzimática, problemas importantes pertinentes à seletividade da enzima e rendimento da reação, ainda permanecem sem solução na aplicação de lipases em processos industriais (CARDENAS *et al.*, 2001). Assim sendo, o acesso a uma faixa ampla de tipos de lipases seria benéfico para solução desses problemas (CIHANGIR; SARIKAYA, 2004; ROBERTSON; STEER, 2004; WAHLER *et al.*, 2004).

Considerando a extraordinária diversidade microbiana e a importância dos fungos como produtores de enzimas, justifica-se a busca de novos biocatalisadores com características especiais e passíveis de aplicação em biocatálise (CARVALHO *et al.*, 2005).

1.1 MICRORGANISMOS

Pertencem a uma classe de organismos visível apenas ao microscópio, que inclui certas algas, bactérias, fungos, protozoários e vírus (BORÉM; VIEIRA, 2005).

Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, as enzimas industriais são geralmente obtidas de microrganismos (bactérias, fungos), pois a grande diversidade e facilidade de manuseio dos microrganismos compensam alguma vantagem que as enzimas de outras fontes possam apresentar. Portanto, as pesquisas para a busca de novas enzimas começam pela análise de solo, água, ar, madeira, frutas em decomposição e outros materiais, fazendo uso das tradicionais culturas de micróbios (ZANOTTO, 2003). A adaptação aos ambientes mais adversos faz com que ocorram espécies de microrganismos com extraordinária plasticidade nutricional e que podem mudar seu conjunto de enzimas para sobreviverem nas mais diversas condições (CARDOSO *et al.*, 1992).

Os microrganismos ou as enzimas isoladas podem ser usados como catalisadores para gerar altas conversões régio e estereosseletivas (MURALIDHAR *et al.*, 2002). As enzimas utilizadas nestas aplicações derivam de uma gama de culturas de organismos, principalmente fungos (ROBERTSON; STEER, 2004).

1.2 FUNGOS

Os fungos são seres eucarióticos e, excluindo-se os insetos, constituem os mais numerosos seres vivos existentes. São responsáveis pela produção de importantes substâncias químicas (ácido cítrico, etanol), pela produção de fármacos (antibióticos), pela produção de enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômico e pelo controle de pragas e moléstias na agricultura. A produção de enzimas hidrolíticas (entre elas as lipases) por fungos é muito explorada tecnologicamente (ÂNGELO, 2004).

Os fungos podem apresentar seu 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 (coloridos ou não dependendo da espécie) (LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2004).

As lipases comerciais de fungos são geralmente enzimas extracelulares, apesar de haver evidências consideráveis de atividade de lipases ligadas ao micélio, o que poderia levar ao uso de células inteiras, eliminando etapas no processo de purificação e minimizando perdas da atividade enzimática (MOLINARI *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2003).

Neste trabalho os fungos foram avaliados, numa seleção inicial, quanto à produção de lipases. Foram investigados os fungos endofíticos e fitopatogênicos isolados de plantas da região amazônica (babosa, cacau, castanha-do-brasil, mandioca, pimenta-de-macaco, pupunha, tucumã e uxi); e fungos degradadores de madeira.

1.2.1 Fungos Endofíticos

Os 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 (SOUZA *et al.*, 2004). 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. Devido ao 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 (MACCHERONI JR *et al.*, 2004).

1.2.2 Fungos Fitopatogênicos

A fim de colonizar a planta hospedeira, o fungo patogênico (**Figura 1**) precisa inicialmente quebrar o seu sistema de defesa. Para isso produz enzimas hidrolíticas (cutinases, celulasas, 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.



Figura 1 – Crescimento de fungos fitopatogênicos isolados de *Bertholletia excelsa* (castanha-do-brasil) e *Aloe vera* (babosa).

1.2.3 Fungos Degradadores de Madeira

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos por fungos degradadores de madeira (**Figura 2**) 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.

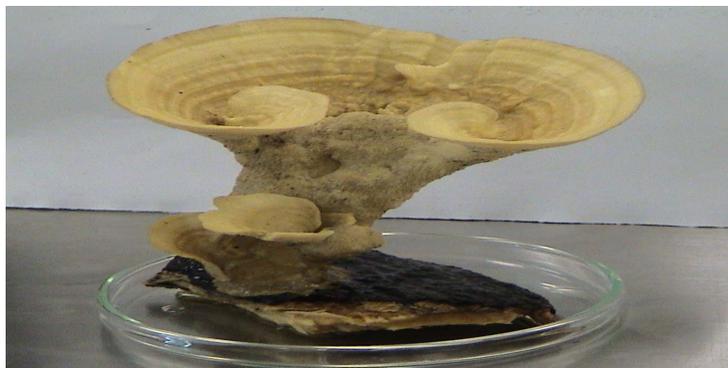


Figura 2 - Fungo degradador de madeira.

1.3 ENZIMAS

As enzimas, conhecidas industrialmente como biocatalisadores, são geralmente proteínas, isto é, formadas por cadeias lineares de centenas de aminoácidos que se doam em estruturas tridimensionais bem definidas e únicas. Esta seqüência de aminoácidos determina como a cadeia se enovela, formando uma estrutura singular para um catalisador em particular. As enzimas têm eficiência catalítica extraordinária, em geral muito maior que aquela dos catalisadores sintéticos; têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e, ainda, funcionam em soluções aquosas e em condições suaves de temperatura e pH (LEHNINGER *et al.*, 1995).

O substrato, composto inicial da reação a ser catalisada, se encaixa comodamente na cavidade de ligação do substrato existente na enzima. A enzima posiciona específicos aminoácidos catalíticos das cadeias laterais, em lugares em que possam auxiliar o processamento da reação química. A área da enzima onde a reação é processada é denominada de sítio ativo. Para explicar a especificidade estereoquímica das enzimas, A. G. Ogston formulou a chamada "teoria dos três pontos", onde sugere que a formação do complexo enzima-substrato só é possível para um dos enantiômeros, com a configuração correta definida no sítio ativo por três pontos diferentes de interação (**Figura 3**). Os sítios A'' e A''' podem representar sítios de ligação para R'' e R''', respectivamente, e A' um sítio catalítico para uma reação envolvendo R'. Assim, mesmo que R' e R'' sejam quimicamente

idênticos, a assimetria do complexo enzima-substrato mostra que somente R' pode reagir, contando que o sítio de ligação A''' seja específico para R''' (FABER, 2004).

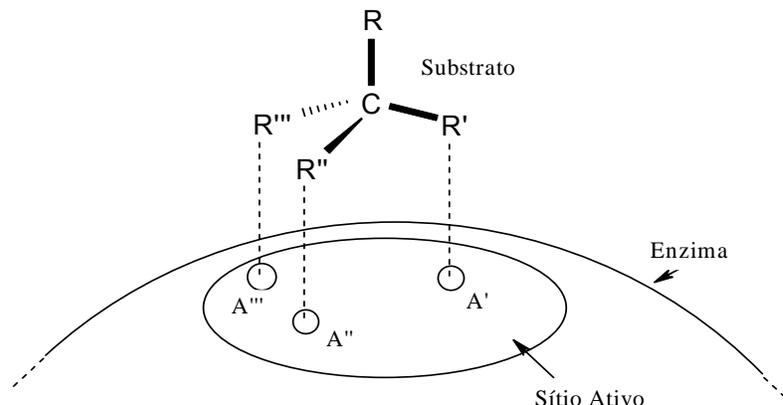


Figura 3 - Orientação dos pontos de interação no sítio ativo da enzima.

A complexidade das enzimas, é que permite efetuar funções realmente impressionantes que apóiam a vida e criam vida nova. Resultado de uma considerável sintonia fina por eras de evolução, esta complexidade também dificulta a manipulação dessas estruturas para obtenção de novas e interessantes propriedades (ARNOLD, 1996).

A classificação sistemática das enzimas pelo sistema *Enzyme Commission* (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) permitiu seu agrupamento em seis grandes grupos ou classes (FABER, 2004; MOSS, 1992):

1. Oxido-redutases: catalisam reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons.
Subclasses: hidrogenases, peroxidases, etc.
2. Transferases: mediam a transferência de grupos funcionais como metila, fosfato, acil, glicosil.
Subclasses: transaldolases, transcetolases, etc.
3. Hidrolases: catalisam reações de hidrólise-formação de ésteres, amidas, lactonas, epóxidos, nitrilas, anidridos.
Subclasses: esterases, lipases, peptidases, etc.
4. Liases: catalisam a quebra de ligações C-C, C-O, C-N e outras por outros meios do que pela hidrólise ou pela oxidação.
Subclasses: descarboxilases, desidratases, etc.
5. Isomerases: mediam reações de mudanças dentro de uma molécula..
Subclasses: epimerases, racemases, etc.
6. Ligases: catalisam a junção de duas moléculas com concomitante clivagem de trifosfato.
Subclasses: sintetases, ciclo-ligases, etc.

As enzimas hidrolíticas constituem uma grande classe de enzimas responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de diversos substratos (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios, aminoácidos, ésteres e fosfatos orgânicos). A produção dessas enzimas é vital para as células, uma vez que estão muito ligadas ao catabolismo celular e, por essa razão, podem ser encontradas em todos os organismos vivos (ÂNGELO, 2004).

As enzimas podem ser modificadas por meios químicos, introduzindo metais ou cofatores modificados, que resultam em novas atividades catalíticas. Enzimas artificiais e quimocatalisadores projetados a partir da base de conhecimento adquirido na catálise enzimática estão evoluindo rapidamente, e talvez no futuro complementem ou substituam as enzimas naturais. A nível de organismo, o conhecimento da seqüência e da estrutura pode ser combinado com a análise e engenharia da rota metabólica para construir linhagens que direcionem seu fluxo carbônico para um composto específico objetivando a produção industrial de substâncias químicas (VAN BEILEN; LI, 2002).

Muitas enzimas estão disponíveis no comércio, e inúmeras aplicações industriais têm sido descritas (ROBERTSON; STEER, 2004; VAN BEILEN; LI, 2002). A tecnologia enzimática entrou numa fase em que novas tecnologias, uma maior compreensão de biologia fundamental, e a bioinformática, estão começando a modelar o descobrimento, o desenvolvimento, a purificação, e a aplicação de biocatalisadores de uma forma muito mais ampla. Este desenvolvimento está levando a novas aplicações enzimáticas e aumentando o impacto da tecnologia enzimática na indústria (VAN BEILEN; LI, 2002).

Embora, atualmente, as aplicações industriais das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais. As lipases vêm, deste modo conquistando uma faixa crescente do mercado das enzimas industriais (CASTRO *et al.*, 2004).

1.4 LIPASES

As lipases (EC 3.1.1.3, Triacilglicerol Lipases) são enzimas hidrolíticas que catalisam reversivelmente a hidrólise de triacilgliceróis sob condições naturais. São distintas das esterases, pois atuam de forma singular em substratos insolúveis em água na interface óleo-água ou água-óleo de soluções emulsionadas. Esterases apresentam comportamento cinético michaeliano (aumento da atividade enzimática com o aumento da concentração do substrato até a saturação), já as lipases não apresentam atividade enquanto os substratos estão presentes na solução em seu estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa seu limite de solubilidade, ocorre um rápido

aumento na atividade (**Figura 4**). Este fenômeno é chamado de ativação interfacial e necessita de uma concentração mínima de substrato (concentração micelar crítica – CMC) para ocorrer (FABER, 2004).

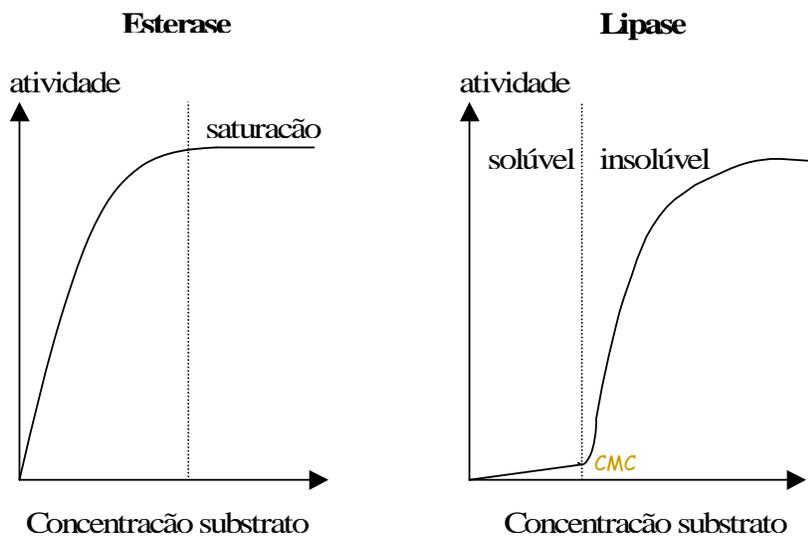


Figura 4 - Comportamento catalítico das lipases (adaptado de FABER, 2004).

Lipases são enzimas extremamente versáteis, podendo catalisar uma série de diferentes reações em um grande número de substratos, sempre com atuação específica (ÂNGELO, 2004). Lipases de diferentes fontes mostram diferentes especificidades de substrato (MURALIDHAR *et al.*, 2002).

Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (**Figura 5**). Outros compostos, além de água e álcool, podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem participar de reações como aminólises, tiotransesterificações e oximólises, em solventes orgânicos, com elevada seletividade (CASTRO *et al.*, 2004).

Em termos da química enzima-substrato, a atividade da lipase pode se dividir em tiposseletividade (habilidade de hidrolisar um tipo particular de éster de ácido graxo), regiosseletividade (habilidade de hidrolisar grupos carboxílicos de éster nas posições sn-1 e sn-3 quando comparadas com a posição sn-2) (**Figura 6**) e estereosseletividade (habilidade de diferenciar entre dois enantiômeros em um substrato racêmico) (MURALIDHAR *et al.*, 2002). Estereoisômeros são moléculas com mesma estrutura, mas com diferentes arranjos

especiais dos átomos. Enantiômeros são isômeros óticos cujas imagens especulares não se sobrepõem, por este fato são ditos quirais (MORRISON; BOYD, 1996).

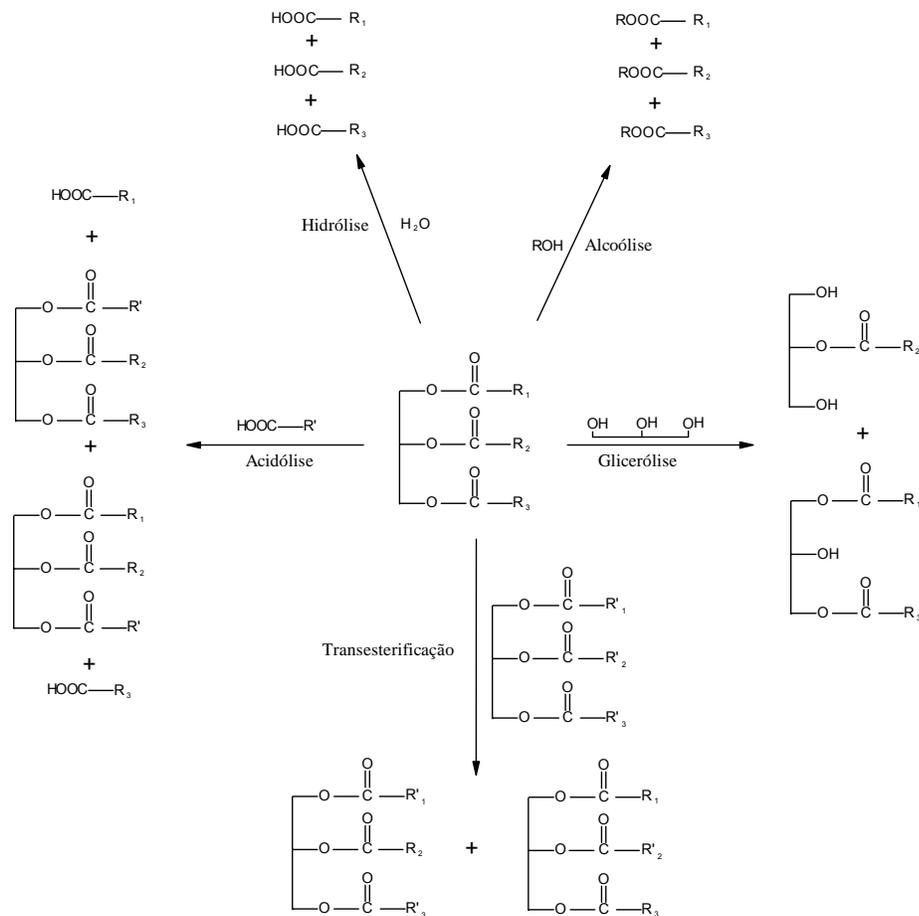


Figura 5 - Representação esquemática das reações catalisadas por lipases (CASTRO *et al.*, 2004).

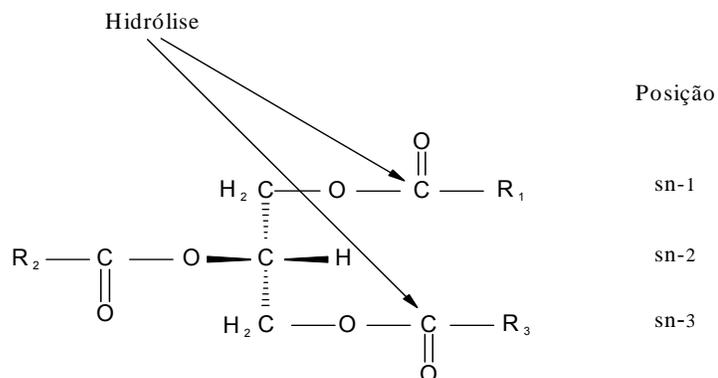


Figura 6 - Representação das ligações de éster potencialmente hidrolisáveis em uma molécula de triacilglicerol (adaptado de MURALIDHAR *et al.*, 2002).

tríade catalítica (constituída dos aminoácidos serina-histidina-ácido aspártico ou glutâmico). Elas têm uma arquitetura comum composta de uma seqüência de α -hélice e β -pregueada.

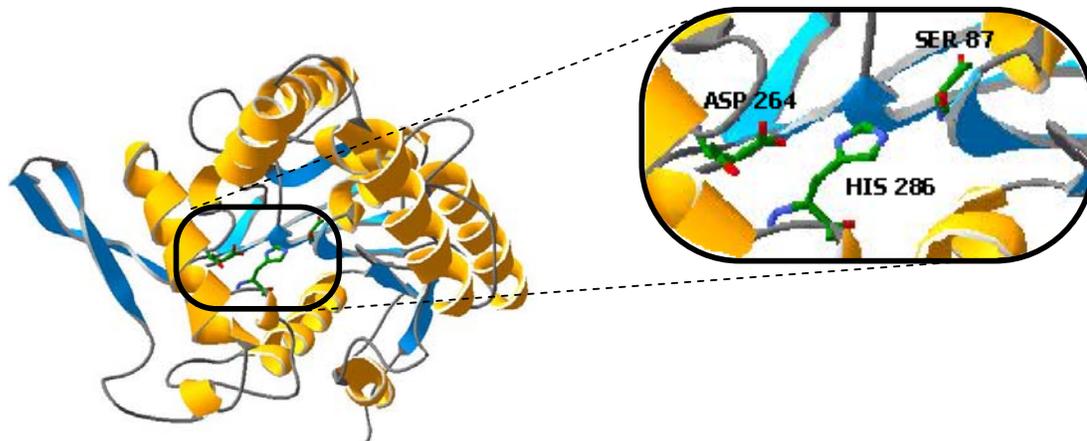


Figura 8 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (GUEX; PEITSCH, 1997).

Na **Figura 8**, pode-se observar a representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* na ausência de uma ligação inibitória usando difração de raios-X. A estrutura mostra a lipase contendo uma prega α/β -hidrolase e uma tríade catalítica compreendendo os resíduos Ser87, His286 e Asp264.

Pode-se observar na **Figura 9** o mecanismo de uma reação de transesterificação catalisada por lipase, através da tríade catalítica. A reação inicia-se com o ataque nucleofílico pelo oxigênio da serina ao átomo de carbono carbonílico na ligação éster (acilação), levando a formação de um intermediário tetraédrico (**I**). Um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase. Este complexo é então atacado pelo substrato com a formação de outro intermediário tetraédrico (**II**) e posterior liberação do produto e regeneração da enzima (desacilação). Nos estados de transição **I** e **II**, a carga negativa gerada sobre o oxigênio após o ataque nucleofílico, é estabilizada através das ligações de hidrogênio pelos resíduos de Ser83 e Leu147, que formam o bolsão do oxianion na lipase.

Normalmente, na etapa de acilação, são empregados ésteres vinílicos como doadores de acila. Nestes casos, o enol formado após a acilação do resíduo reativo da tríade catalítica é rapidamente transformado em seu tautômero (acetaldeído), que é mais estável e volátil. Esta estratégia desloca o equilíbrio da reação na direção dos produtos por impedir uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa e o substrato (COSTA; AMORIM, 1999). Reações de transesterificação realizadas com excesso de doador acila (éster vinílico) e em solventes orgânicos anidros são irreversíveis.

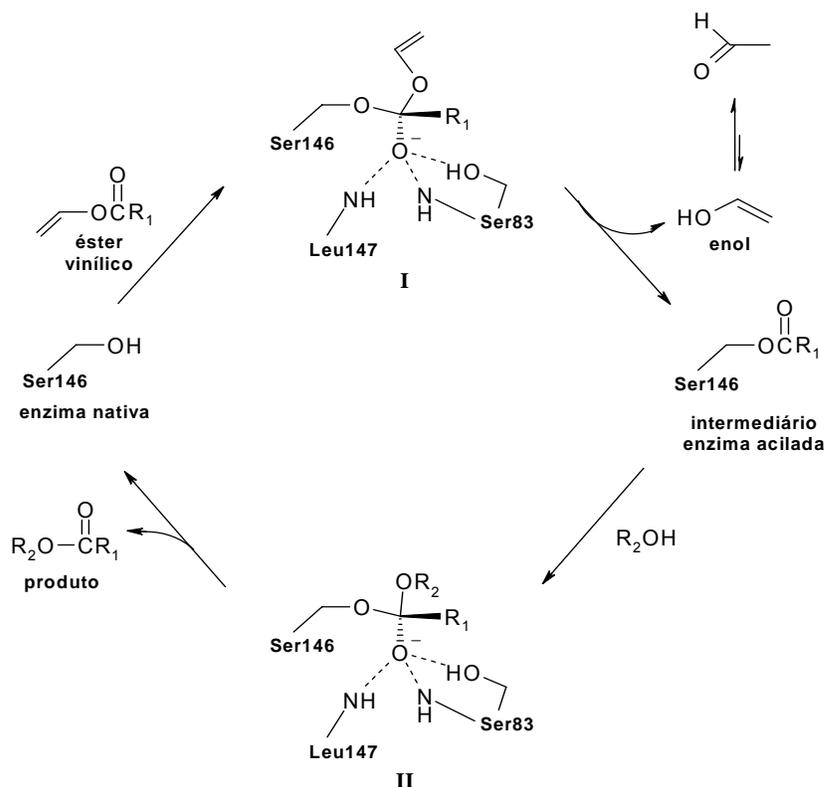


Figura 9 - Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação catalisada por lipase de *Humicola lanuginosa* (COSTA; AMORIM, 1999).

A estereoespecificidade de uma lipase depende amplamente da estrutura do substrato, da interação no sítio ativo e das condições reacionais. Por exemplo, sob condições fisiológicas normais muitas enzimas hidrolíticas como fosfolipases, proteases, glicosidases e nucleases, metabolizam somente um dos possíveis substratos. Entretanto, lipases são freqüentemente capazes de reconhecer enantiômeros assim como grupos enantiotrópicos de moléculas próquirais. Recentes avanços em engenharia de proteína e difração de raios-X têm possibilitado o estudo e a compreensão do mecanismo encoberto durante a interação do substrato com a lipase e seu sítio quiral (MURALIDHAR *et al.*, 2002).

As lipases são extremamente estáveis em solventes orgânicos e as reações de esterificação catalisadas nesse meio são freqüentemente mais enantiosseletivas que as correspondentes hidrolíticas em água (KLIBANOV, 2001).

Tendo em vista as suas aplicações atuais e as aplicações em potencial, as lipases são consideradas uma promissora classe de enzimas industriais (CIHANGIR; SARIKAYA, 2004).

1.4.1 Lipases em Biotransformações

O termo biotransformação pode ser aplicado às modificações específicas ou interconversões da estrutura química realizadas por catalisadores bioquímicos (CASTRO *et al.*, 2004). Neste sentido, a versatilidade das lipases tem sido explorada ou para substituir processos existentes, ou para produzir uma série de compostos considerados praticamente inviáveis de serem obtidos por via química convencional. Esta habilidade tem sido aplicada na hidrólise de gorduras para produção de ácidos graxos, esterificação ou interesterificação de gorduras e outros lipídeos para preparação de produtos alimentícios ou não alimentícios.

A aplicação de lipases tem sido também preconizada na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídeos, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de permanência do efluente nas lagoas de estabilização (CASTRO *et al.*, 2004).

Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora, conforme atestam os processos em fase de implantação industrial. Inúmeros ésteres são considerados de grande importância na vida cotidiana. Produtos naturais, tais como triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem.

As lipases catalisam:

- ✓ A síntese de ésteres de poliglicerol - ingredientes multifuncionais usados como emulsificantes, substitutos de gorduras, como meio de solubilização de vitaminas lipossolúveis para facilitar a incorporação destas em sistemas lipofóbicos.

- ✓ A esterificação de carboidratos com ácidos graxos - usados como emulsificantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos; além de seu efeito conservante, estes ésteres tem sido associados como agentes antitumor e inibidores do crescimento em plantas.

Destaca-se ainda os estudos recentes de aplicação de lipase na geração de energia, como a produção de biocombustível, alternativo ao óleo diesel, a partir de óleos vegetais brutos. O uso de lipases para produção de biodiesel é de relevante importância, considerando-se o crescimento da utilização desse biocombustível em âmbito mundial, não somente pelo aspecto do meio ambiente, mas principalmente, por se tratar de uma fonte de energia renovável (CASTRO *et al.*, 2004).

1.5 ACOMPANHAMENTO DAS REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Por ser altamente eficiente na separação de compostos orgânicos, a cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas para o acompanhamento de reações orgânicas. Este método físico-químico de separação está fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna a cromatografia uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (CASS; DEGANI, 2001).

Para o acompanhamento de uma reação, em que alíquotas são retiradas de tempos em tempos e a formação do produto precisa ser verificada, a cromatografia de camada delgada (CCD) é predominantemente utilizada, pois é um método simples, eficiente, rápido e econômico.

1.5.1 Cromatografia de Camada Delgada

A CCD é uma técnica de adsorção líquido-sólido onde a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. A fase estacionária é uma camada fina formada por um sólido granulado (sílica, alumina, poliamida, etc.) depositado sobre uma placa de vidro, alumínio ou outro suporte inerte. Pequenas gotas de solução das amostras a serem analisadas são aplicadas em um ponto próximo ao extremo inferior da placa. Deixa-se a placa secar e, então a mesma é colocada em um recipiente contendo a fase móvel (solvente ou mistura de solventes). A polaridade do solvente deverá ser de acordo com a substância que se deseja separar. Como somente a base da placa fica submersa, o solvente começa a molhar a fase estacionária e sobe por capilaridade. Deixa-se secar a placa após o deslocamento da fase móvel sobre ela. A revelação da placa é feita com a aplicação de um reagente que dê cor às substâncias de interesse (PERES, 2002).

Empregando esta técnica pode-se estimar o tempo mínimo necessário para a formação do produto desejado e o tempo em que a reação se estabiliza, não havendo mais mudança na placa cromatográfica. Apesar da CCD ser uma técnica que permita análise quantitativa dos componentes da reação ela é mais utilizada a nível qualitativo deixando a quantificação para outras técnicas cromatográficas mais precisas como a cromatografia gasosa (CG) ou a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou até mesmo métodos espectrométricos.

1.5.2 Ressonância Magnética Nuclear

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 $I \geq 1$ 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 blindado) 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.

1.6 PARÂMETROS QUANTITATIVOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ENANTIOSSELETIVIDADE DE REAÇÕES BIOCATALISADAS

Um substrato racêmico, quando submetido a uma reação enzimática, sofre discriminação quiral entre os enantiômeros. Devido à quiralidade da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no seu sítio ativo é convertido a uma velocidade mais alta. Para assegurar uma alta seletividade para ambos os enantiômeros, a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível. Em alguns casos ideais a velocidade é tão extrema que o “bom” enantiômero 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 pode ser obtido somente com 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.

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. 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 1, 2 e 3.

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{Equação 1}$$

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \quad \text{Equação 2}$$

$$E = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]} \quad \text{Equação 3}$$

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.

1.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA PUREZA ENANTIOMÉRICA

Os enantiômeros têm propriedades físicas idênticas (ponto de ebulição e fusão, solubilidade), exceto o sentido da rotação do plano de polarização da luz. Eles apresentam propriedades químicas idênticas (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; KILÉNYI, 1992).

1.7.1 Cromatografia Gasosa

Um método atrativo para a análise de mistura de enantiômeros é a cromatografia gasosa (CG) com fase estacionária quiral. 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 fase estacionária 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 fase estacionária, sendo eluído em velocidades diferentes. Por comparação com padrões previamente existentes, pode ser feita a identificação de compostos. A **Figura 10** mostra um cromatograma obtido na resolução do composto (R,S)-3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila, onde pode-se observar a eficiência da coluna quiral na separação dos isômeros dos padrões racêmicos (álcool e acetato) e do produto obtido, que mostra a predominância de apenas um dos enantiômeros.

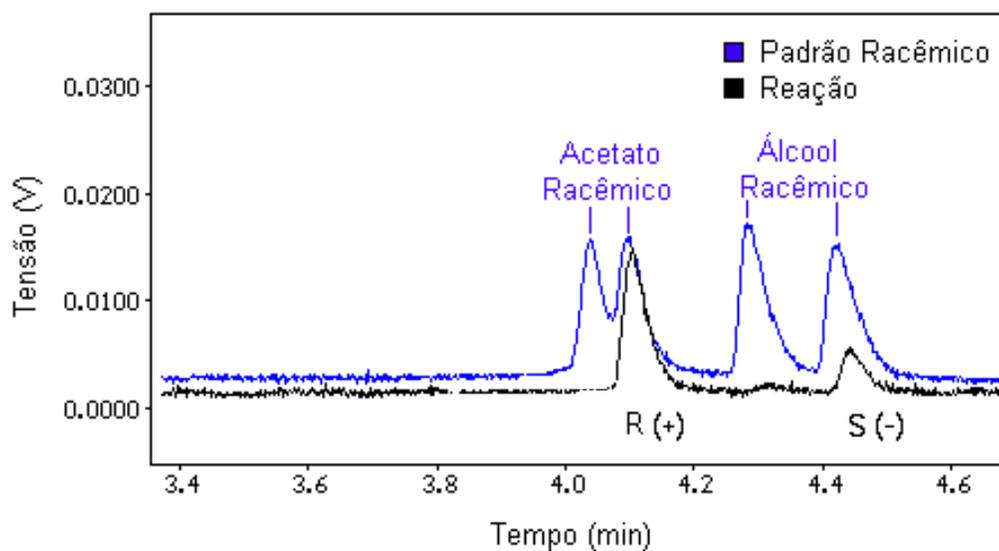


Figura 10 - Cromatograma para uma alíquota da reação do (R,S)-3-hidroxi-2-metilenbutanoato de metila com acetato de vinila, catalisada por lipase de *Pseudomonas sp* imobilizada em poli(oxi de etileno) (ZANOTTO, 2003).

Para esta técnica, as amostras deverão ser suficientemente voláteis e termicamente estáveis e, é claro, deverá ser quantitativamente resolvida na fase quiral do CG (AITKEN; KILÉNYI, 1992).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar e caracterizar fungos isolados de plantas da Região Amazônica, como fonte de novas lipases para utilização em biotransformações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a seleção de fungos endofíticos, fitopatogênicos e degradadores da madeira com atividade hidrolítica, especialmente para lipases, através de ensaio enzimático com o substrato tributirina.
- ✓ Determinar a atividade biocatalítica das lipases ligadas ao micélio dos fungos pré-selecionados, através do monitoramento da reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol e hexano como solvente, para selecionar os fungos com maior atividade biocatalítica.
- ✓ Verificar a capacidade enantiosseletiva das lipases dos fungos selecionados, através da resolução do (*R,S*)-2-hexanol e do (*R,S*)-2-octanol via transesterificação com acetato de vinila e hexano como solvente.
- ✓ Iniciar a formação de uma micoteca da Região Amazônica com fungos que apresentem atividade biocatalítica e capacidade de realizar transformações estereosseletivas.

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS FUNGOS

Os fungos endofíticos isolados da mandioca foram fornecidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. José Odair Pereira da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os demais fungos endofíticos foram isolados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) sob supervisão da Dr^a Mayra Kassawara Martins. Os fungos fitopatogênicos foram isolados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da UFAM sob supervisão da Prof^a Dra Jania Lilia Bentes. Os fungos degradadores de madeira foram fornecidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ademir Castro e Silva do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da UEA. Como norma de segurança, não foram utilizados microrganismos reconhecidamente patogênicos ao homem.

3.1.1 Isolamento dos Fungos Endofíticos

Os fungos isolados de *Manihot esculenta* (mandioca) foram obtidos seguindo técnica de isolamento de fungos endofíticos (RONDON, 2003) e armazenados em água destilada. Os fungos já isolados, em crescimento puro da espécie *Piper aduncum*, foram cedidos pelo aluno Rafael Lopes e Oliveira, do laboratório de microbiologia do CBA.

Para isolamento dos demais microrganismos endofíticos realizou-se a coleta de diferentes espécies de plantas oleaginosas (folha, fruto e caule de castanheira; polpa e semente de tucumã, polpa e semente de uxi, polpa e semente de cacau, polpa de abacate e coco). Um dia após a coleta, iniciou-se o processo de extração da microbiota epifítica através da lavagem em água corrente com posterior secagem sob papel. Em seguida, procedeu-se com a lavagem em álcool 70% em tempos específicos para cada tipo de tecido (folha, caule, semente e fruto), hipoclorito a 3%, álcool 70% novamente e água destilada, desta forma fazendo a desinfecção dos materiais colhidos (ARAÚJO *et al.*, 2002). Os materiais foram recortados com auxílio de um bisturi estéril, pinça e placa autoclavada sendo todo método realizado em ambiente adequado de fluxo contínuo de ar para evitar contaminação. Inoculados em placas de Petri com o meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA) acrescido do antibiótico tetraciclina (100mg.L⁻¹) à 28 °C, obteve-se o crescimento da microbiota fúngica endofítica contida em cada material analisado. Os isolados foram mantidos em câmara fria à temperatura de 5 °C até sua utilização posterior.

3.1.2 Isolamento dos Fungos Fitopatogênicos

O isolamento dos fungos fitopatogênicos foi feito a partir de folhas e frutos de plantas oleaginosas, com sintomas da presença de fungos (lesões), adquiridos nos mercados e feiras da cidade de Manaus, Estado do Amazonas (AM). O material foi levado para o laboratório de Microbiologia (FCA-UFAM) onde o isolamento foi feito. Para tal, o material foi lavado em água corrente (retirada do excesso de impurezas) e em seguida foram retirados fragmentos de tecido da região de transição entre a área lesionada e a sadia. Os explantes foram submetidos à desinfecção superficial em álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio 2% (1 min.) seguido de duas lavagens em água destilada autoclavada (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Os fragmentos foram depositados em papel de filtro para retirada do excesso de água e transferidos para placas de Petri contendo BDA acrescido de antibiótico cloranfenicol (250mg.L^{-1}) e autoclavado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. As placas foram então mantidas em incubadora a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ até surgimento dos primeiros fragmentos de hifa (24-48 horas). Os fungos foram repicados e crescidos em placas de Petri contendo novamente o meio BDA e armazenados, em tubos de ensaio contendo o mesmo meio, em câmara fria a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização posterior.

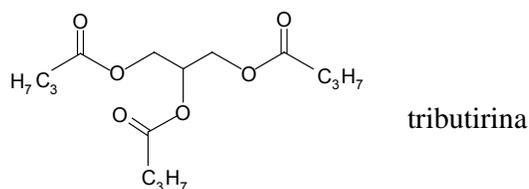
3.1.3 Fungos Degradadores de Madeira

Os isolados dos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp. foram crescidos em placas de Petri contendo o meio agar-czapack e agar-malte, respectivamente, e mantidos em câmara fria a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 TRIAGEM PRELIMINAR DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DOS FUNGOS

3.2.1 Preparação do Meio de Incubação

O meio usado para a triagem preliminar consistiu de 5,0 g de peptona micológica (Acumedia), 3,0g de extrato de levedura (Acumedia), e 10,0 g de agar (Acumedia), por litro de água destilada. Tributirina (Sigma) foi adicionada ao meio até uma concentração final de 1,0% (v/v) e a mistura foi emulsificada por agitação durante 7-15 minutos. O meio emulsificado foi então autoclavado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos (COSTAS *et al.*, 2004). Após resfriamento a aproximadamente $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ o meio foi colocado em placas de Petri e resfriado rapidamente (TORRES *et al.*, 2003).



3.2.2 Inoculação, Incubação, e Medição do Halo

O inóculo a ser testado foi previamente cultivado em placas de Petri com BDA por 5-7 dias a 28 °C. Um disco do meio sólido contendo o inóculo foi retirado desta placa com espátula esterilizada e colocado no meio de uma placa de Petri com agar contendo o substrato tributirina (meio de incubação). Placas foram incubadas a 25 °C por 14 dias. A espessura (mm) do halo ao redor do disco foi usada para estimar as atividades hidrolíticas relativas dos isolados testados.

3.3 TRIAGEM DA ATIVIDADE BIOCATALÍTICA DOS FUNGOS SELECIONADOS

Após a seleção dos isolados fúngicos produtores de hidrolases em meio sólido, a atividade biocatalítica das lipases produzidas pelos fungos selecionados foi avaliada por monitoramento da síntese de oleato de pentila, utilizando-se o micélio filtrado e seco dos fungos cultivados, como descrito abaixo.

3.3.1 Cultivo dos Microrganismos

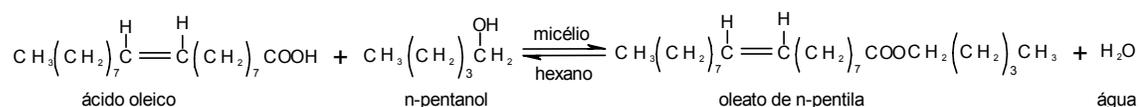
Os microrganismos foram cultivados em um meio líquido sintético constituído de 2 g de asparagina (Vetec), 2 g de glicose (Dinâmica), 1g de K_2HPO_4 (Vetec), 0,5 g de $MgSO_4$ (Vetec), 5 mg de hidrocloreto de tiamina (Sigma), 1,45 mg de $Fe(NO_3)_3 \cdot 7H_2O$ (Vetec), e 0,235 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$ (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 (H_2SO_4 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. O meio foi inoculado com quatro discos cortados de BDA e então incubado a 28 °C por 5-15 dias em um agitador orbital (200 rpm).

3.3.2 Preparação das Células em Repouso

O micélio foi coletado do meio de cultura com um funil de Buchner e lavado com água destilada e depois com acetona (TORRES *et al.*, 2000). O micélio foi seco por 48 horas (dessecador) e triturado a pó.

3.3.3 Ensaio da Atividade Biocatalítica

Para estudar a atividade da lipase ligada ao micélio, 50 mg de micélio seco foram suspensos em 30 mL de hexano (Dinâmica) contendo 6,66 mmoles de ácido oléico (Vetec) e 6,66 mmoles de n-pentanol (CRQ). Essa suspensão foi incubada por 72 horas em agitador termostatzado, 200 rpm e 30 °C.



A reação foi acompanhada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), realizada em placas de sílica (fase fixa) confeccionadas com tetracloreto de carbono. A combinação de solventes utilizada foi hexano/acetato de etila 90:10 (fase móvel). Utilizou-se iodo como revelador. A conversão em oleato de n-pentila foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN-¹H) em um espectrômetro da Varian (Unity Inova) AC 500MHz (**Figura 11**), utilizando como referência interna o próprio solvente utilizado, clorofórmio deuterado (CDCl₃, δ=0,00 ppm). Analisando-se os espectros de RMN-¹H para álcool e éster nota-se uma diferença de frequência entre os picos dos hidrogênios do grupamento metileno (-CH₂) ligado ao átomo de oxigênio, presente em ambas as moléculas: CH₃(CH₂)₃CH₂OH; CH₃(CH₂)₇(CH₂)₂(CH₂)₇COOCH₂(CH₂)₃CH₃. Os hidrogênios do grupamento metileno do n-pentanol registram picos em uma frequência mais baixa (mais blindado) do que os do oleato de n-pentila (menos blindados) no espectro de RMN-¹H. Devido a esta peculiaridade, através de integração das áreas dos espectros pode-se calcular quanto de n-pentanol foi convertido à oleato de n-pentila.



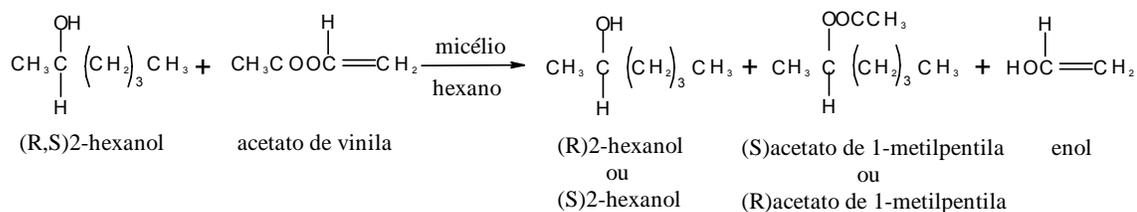
Figura 11 – Espectrômetro utilizado na obtenção dos espectros de RMN-¹H.

3.3.4 Influência do Teor de Água na Atividade Biocatalítica

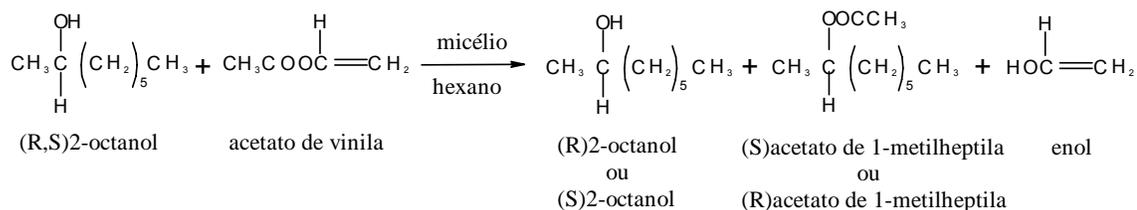
Para estudar como a atividade biocatalítica é influenciada pelo teor de água, o micélio foi liofilizado, incubado em solvente orgânico com distintas quantidades de água e utilizado na reação de esterificação. Em cinco frascos contendo 10 mL de hexano e 0, 5, 7, 10 e 20 μ L de água, respectivamente, foram suspensos 50 mg de micélio liofilizado. Essa suspensão foi repousada por 15 horas à temperatura ambiente. Foram adicionados 20 mL de hexano, 6,66 mmoles de ácido oléico e 6,66 mmoles de n-pentanol a cada frasco. A mistura reacional foi incubada por 96 horas em agitador termostatzado, 200 rpm e 30°C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em 24 e 96 horas e a conversão da esterificação foi determinada por RMN-¹H.

3.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ENANTIOSSELETIVA

Para estudar a atividade enantiosseletiva da lipase ligada ao micélio foram utilizadas as resoluções do (*R,S*)-2-hexanol (Aldrich) e do (*R,S*)-2-octanol (Aldrich). 50 mg de micélio seco foram suspensos em 20 mL de hexano contendo 2 mmoles de (*R,S*)-2-hexanol, e 6 mmoles do agente acilante (acetato de vinila, Fluka).



Da mesma forma, 50 mg de micélio seco foram suspensos em 20 mL de hexano contendo 2 mmoles de (R,S)-2-octanol, e 6 mmoles do acetato de vinila.



As reações de transesterificação foram realizadas em agitador termostatizado (200 rpm e 30 °C). Amostras foram retiradas e filtradas de acordo com o tempo da reação ou grau de conversão de aproximadamente 50%. As medidas de excesso enantiomérico (ee) foram calculadas através das áreas dos picos dos enantiômeros obtidas nos cromatogramas do cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa da Shimadzu (GCMS-QP2010, **Figura 12**), com uma coluna capilar de fase estacionária quiral da Chrompack, (Chirasil – Dex CB 25m x 0,25mm ID x 0,25 μm). A programação utilizada para separar os enantiômeros dos substratos e produtos das reações de resolução está mostrada na **Tabela 1**.



Figura 12 – CGMS utilizado para análise da reação enantiosseletiva.

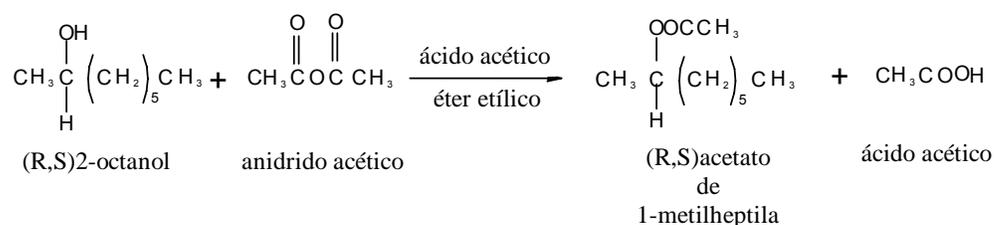
Tabela 1 - Programação utilizada no CGMS para análise das reações de resolução.

Parâmetros	Resolução do (<i>R,S</i>)-2-hexanol	Resolução do (<i>R,S</i>)-2-octanol
Temperatura Inicial	50°C	80°C
Temperatura Final	220°C	80°C
Taxa de Aquecimento	3°C/min - 50 a 100°C 10°C/min - 100 a 220°C	
Temperatura de Injeção	220°C	220°C
Razão de Split	20	50
Velocidade Linear	36,3 cm/s	35,0 cm/s
Pressão do Gás Carreador (He)	53,5 kPa	56,9 kPa

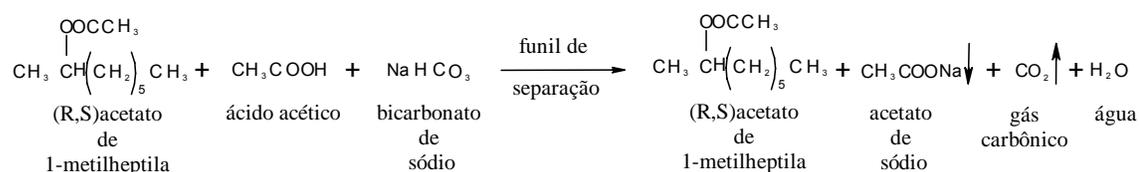
O padrão de (*R,S*)acetato de 1-metilheptila foi sintetizado no Laboratório de Biocatálise do Instituto de Química da UFSC, seguindo o procedimento descrito abaixo.

3.4.1 Síntese do Padrão Racêmico de Acetato

A 10 mL de éter etílico foram adicionados 6,3 mmoles de (*R,S*)-2-octanol, 6,3 mmoles de anidrido acético, e 5 gotas de ácido acético. A reação foi deixada em refluxo por 168 horas (7 dias).



A mistura reacional foi então colocada em um funil de separação, onde foram adicionadas porções de 15 mL de solução saturada de NaHCO₃ e extraído até não notar mais desprendimento de gás. Em seguida o solvente foi evaporado em rotaevaporador.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TRIAGEM DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DOS FUNGOS

4.1.1 Fungos Endofíticos

Foram obtidos 52 isolados de fungos endofíticos, de explantes de 6 espécies diferentes de plantas (**Tabela 2**). Alguns fungos puderam ser identificados por análise morfológica.

Tabela 2 – Origem e código de identificação dos isolados endofíticos.

Planta de Origem (nome popular)	Código de Identificação	Origem do Explante	Gênero do Fungo
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_039	folha	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_040	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_041	folha	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_043	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_044	caule	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_045	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_046	folha	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_048	---	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_049	---	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_052	caule	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_054	caule	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_055	caule	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_056	folha	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_057	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_058	caule	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_059	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_060	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_062	caule	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_064	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_066	folha	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_067	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_068	folha	---

Continua...

Continuação.

Planta de Origem (nome popular)	Código de Identificação	Origem do Explante	Gênero do Fungo
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_069	folha	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_070	caule	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_073	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_075	raiz	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_077	---	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_078	---	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_079	---	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_080	---	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_081	folha	---
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	UEA_082	---	---
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	UEA_131	caule	<i>Phomopsis</i>
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	UEA_106	folha	<i>Phomopsis</i>
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	UEA_048	folha	<i>Aspergillus</i>
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	UEA_109	folha	<i>Guignardia</i>
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	UEA_132	raiz	<i>Phomopsis</i>
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	UEA_133	raiz	<i>Fusarium</i>
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	UEA_134	caule	<i>Colletotrichum</i>
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	UEA_107	caule	<i>Phyllosticta</i>
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_053	polpa	---
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_065	polpa	---
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_072	polpa	---
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_042	semente	<i>Aspergillus</i>
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_061	semente	---
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_063	semente	---
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_047	folha	<i>Guignardia</i>
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_050	caule	---
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_051	semente	---
<i>Endopleura uchi</i> (uxi)	UEA_074	polpa	---
<i>Endopleura uchi</i> (uxi)	UEA_076	polpa	---
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	UEA_071	semente	---

--- Dado não disponível

Todos os 52 isolados foram submetidos ao ensaio com substrato tributirina. A formação de halo translúcido em volta do crescimento fúngico indica atividade hidrolítica (hidrólise da tributirina) e presença de hidrolase. Desses isolados, 49 apresentaram teste positivo para atividade hidrolítica (**Tabela 3**). As espécies oleaginosas de pimenta-de-macaco, castanha-do-brasil, uxi e cacau forneceram isolados que apresentaram halo em sua totalidade (100%), **Tabela 3**, indicando seu grande potencial como fonte de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas.

Tabela 3 – Porcentagem de aparecimento de halo dos isolados endofíticos.

Planta de Origem (nome popular)	Nº de Isolados	Nº de Isolados com Halo	% de Aparecimento de Halo
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	32	32	100
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	8	6	75
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	6	5	83
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	3	3	100
<i>Endopleura uchi</i> (uxi)	2	2	100
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	1	1	100
Total	52	49	94

4.1.2 Fungos Fitopatogênicos

Obteve-se 39 isolados de fungos fitopatogênicos, crescidos de explantes de 5 espécies diferentes de plantas (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Origem e código de identificação dos isolados fitopatogênicos.

Planta de Origem (nome popular)	Código de Identificação	Origem do Explante
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_010	fruto
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_016	fruto
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_017	fruto
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_022	fruto
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_033	fruto
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_034	fruto
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_035	fruto

Continua...

Continuação.

Planta de Origem (nome popular)	Código de Identificação	Origem do Explante
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_037	fruto
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_135	fruto
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_002	fruto
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_008	fruto
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_015	fruto
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_028	fruto
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_030	fruto
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_032	fruto
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_036	fruto
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_136	fruto
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_001	semente
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_014	semente
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_020	semente
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_021	semente
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_027	semente
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_029	semente
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_031	semente
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_139	semente
<i>Aloe vera</i> (babosa)	UEA_011	folha
<i>Aloe vera</i> (babosa)	UEA_012	folha
<i>Aloe vera</i> (babosa)	UEA_018	folha
<i>Aloe vera</i> (babosa)	UEA_019	folha
<i>Aloe vera</i> (babosa)	UEA_025	folha
<i>Aloe vera</i> (babosa)	UEA_108	folha
<i>Aloe vera</i> (babosa)	UEA_137	folha
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	UEA_006	fruto
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	UEA_007	fruto
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	UEA_013	fruto
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	UEA_023	fruto
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	UEA_024	fruto
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	UEA_026	fruto
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	UEA_138	fruto

Nas **Figuras 1 e 13** pode ser visto o crescimento de fungos fitopatogênicos isolados de *Bertholletia excelsa* (castanha-do-brasil), *Aloe vera* (babosa), *Astrocaryum aculeatum* (tucumã), *Bactris gasipaes* (pupunha) e *Theobroma cacao* (cacau).

Os 39 isolados foram submetidos ao ensaio com substrato tributirina. Na **Figura 14** a formação do halo translúcido em volta do crescimento fúngico em isolados fitopatogênicos de *Bactris gasipaes* (pupunha) e *Astrocaryum aculeatum* (tucumã) pode ser observada.

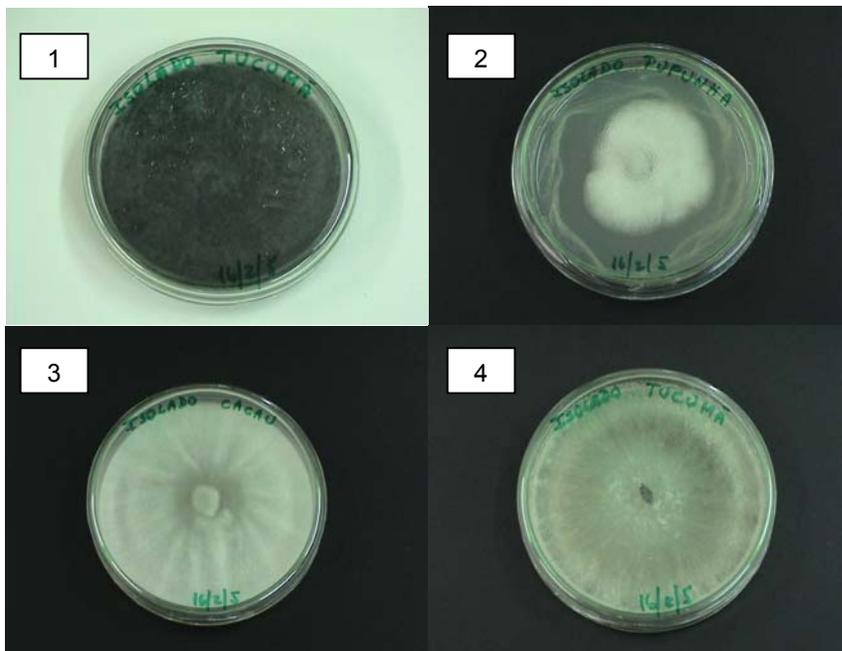


Figura 13 - Crescimento de fungos fitopatogênicos: 1 e 4 isolados de *Astrocaryum aculeatum* (tucumã); 2 isolado de *Bactris gasipaes* (pupunha); e 3 isolado de *Theobroma cacao* (cacau).

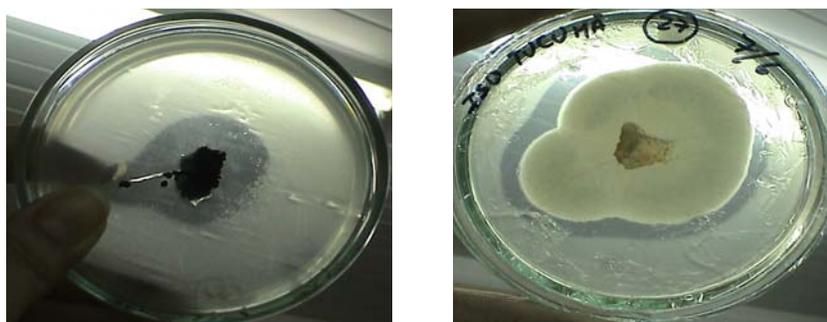


Figura 14 – Visualização da formação do halo translúcido em volta do crescimento fúngico em isolados fitopatogênicos de *Bactris gasipaes* (pupunha) e *Astrocaryum aculeatum* (tucumã), indicando atividade hidrolítica.

Trinta (30) isolados fitopatogênicos apresentaram halo, representando 77% do total (**Tabela 5**). A pupunha, cujo fruto apresenta cerca de 20% de óleo em sua composição (CLEMENT *et al.*, 1998), forneceu isolados com a maior porcentagem de aparecimento de halo: 89%, dentre os fungos fitopatogênicos avaliados.

Tabela 5 - Porcentagem de aparecimento de halo dos isolados fitopatogênicos.

Planta de Origem (nome popular)	Nº de Isolados	Nº de Isolados com Halo	% de Aparecimento de Halo
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	9	8	89
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	8	7	87
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	8	5	62
<i>Aloe vera</i> (babosa)	7	5	71
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	7	5	71
Total	39	30	77

Tabela 6 - Medida dos halos de alguns isolados fitopatogênicos.

Planta de Origem (nome popular)	Código de Identificação	Espessura do Halo com 14 Dias de Incubação(mm)
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_034	10
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_135	6
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_035	7
<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)	UEA_037	11
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_028	5
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_036	7
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_136	18
<i>Astrocaryum aculeatum</i> (tucumã)	UEA_032	7
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_027	9
<i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-brasil)	UEA_029	5
<i>Aloe vera</i> (babosa)	UEA_137	5
<i>Aloe vera</i> (babosa)	UEA_108	5
<i>Theobroma cacao</i> (cacau)	UEA_138	15

As espessuras dos halos foram medidas (**Tabela 6**) para se estimar as atividades hidrolíticas de alguns dos isolados. Essa atividade está associada à presença de enzimas

hidrolíticas (esterases e/ou lipases), mas nem sempre se pode associar uma maior atividade hidrolítica a uma melhor atividade biocatalítica (CARDENAS *et al.*, 2001; OTERO *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2003).

Quando se tem um crescimento uniforme da colônia, como é o caso das bactérias, pode-se relacionar o diâmetro de crescimento da colônia com o diâmetro do halo. Como o crescimento fúngico é desigual, nem sempre podemos medir os diâmetros, então medimos apenas a espessura do halo. Como neste trabalho o teste da tributirina tem importância qualitativa, e a medida do halo foi efetuada apenas para se ter uma idéia da ordem de grandeza da produção de enzimas hidrolíticas, não foi estabelecida nenhuma relação entre crescimento da colônia e produção de hidrolases.

4.1.3 Fungos Degradadores de Madeira

Quatro isolados de fungos degradadores de madeira foram utilizados no ensaio de atividade hidrolítica: um de *Pycnoporus sanguineus* (UEA_009) e três de *Trametes* sp. (UEA_003, UEA_004 e UEA_005). Sob as condições utilizadas neste estudo os quatro isolados foram incapazes de formar o halo translúcido, indicativo da presença de enzima hidrolítica.

4.1.4 Potencial dos Fungos Amazônicos

Como está indicado na **Tabela 7**, 79 fungos, o que corresponde a 83% dos isolados investigados, apresentaram resultado positivo quando submetidos ao ensaio de atividade hidrolítica. A porcentagem seria ainda maior (88%) se fossem considerados apenas os isolados de plantas oleaginosas (pimenta-de-macaco, tucumã, castanha-do-brasil, uxi, cacau, pupunha e babosa). Esses dados fornecem indicativo do grande potencial da biodiversidade microbiana da região amazônica como fonte de enzimas hidrolíticas.

Tabela 7 - Porcentagem total dos isolados que apresentaram halo.

Tipo de Isolado	Nº de Isolados	Nº de Isolados com Halo	% de Aparecimento de Halo
Fungos Endofíticos	52	49	94
Fungos Fitopatogênicos	39	30	77
Fungos Degradadores de Madeira	4	0	0
Total	95	79	83

4.2 ATIVIDADE BIOCATALÍTICA DOS FUNGOS SELECIONADOS

Os 79 isolados que apresentaram halo, foram cultivados em meio líquido, seus micélios filtrados, secos no dessecador e triturados a pó (**Figura 15**).

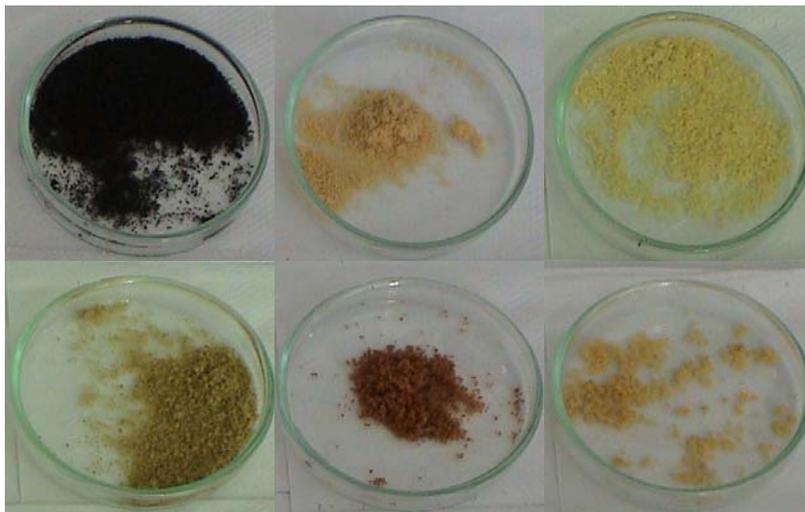


Figura 15 – Micélios de diferentes isolados, secos e triturados.

Os 26 isolados com melhor crescimento (maior massa micelial), maior facilidade de filtração e secagem, foram selecionados para biocatalisar a reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol utilizando hexano como solvente. O acompanhamento da reação por CCD revelou que antes de 24 horas de reação a formação do éster era quase imperceptível, nas condições utilizadas. Os resultados, após 72 horas de reação podem ser vistos na **Tabela 8**. Os valores de porcentagem de conversão a éster foram determinados por RMN-¹H. Para fins comparativos a reação foi também mediada pela lipase de *Candida antarctica* (Novozyme 435, CAL-B, 10 000 PLU/g) que, nas mesmas condições (72 horas de reação em agitador termostático, 200 rpm e 30 °C), apresentou conversão de 96%. Os espectros de RMN-¹H para a reação de esterificação catalisada pela lipase comercial CAL-B, e pelos isolados UEA_001 e UEA_027 podem ser vistos nas **Figuras 16, 17 e 18**.

Comparando-se as **Tabelas 6 e 8**, verifica-se que as lipases mais ativas no ensaio hidrolítico (maior halo) não foram as mais ativas na reação de esterificação (maior conversão). O isolado UEA_027 apresentou um valor de halo moderado (9 mm) e uma conversão a éster de 72%, já o isolado UEA_136 apresentou o maior valor de halo (18 mm), com uma conversão de apenas 16%. Essa diferença entre os níveis de atividade hidrolítica e sintética talvez seja acentuada pelo fato de que no ensaio com tributirina mede-se a atividade de hidrolases extracelulares e hidrolases ligadas ao micélio, em um meio

hidrofílico; enquanto que a síntese do oleato de n-pentila indica a presença de atividade da lipase ligada ao micélio em um meio hidrofóbico (TORRES *et al.*, 2003).

Tabela 8 - Porcentagem de conversão a éster na reação do ácido oléico com n-pentanol, catalisada por micélios de diferentes origens.

Código de Identificação do Isolado (origem)	% de Conversão a Éster Após 72 h Reação*	Tipo de Isolado
UEA_001 (castanha-do-brasil)	87,6	fitopatogênico
UEA_027 (castanha-do-brasil)	72,1	fitopatogênico
UEA_017 (pupunha)	49,6	fitopatogênico
UEA_108 (babosa)	39,4	fitopatogênico
UEA_014 (castanha-do-brasil)	35,8	fitopatogênico
UEA_029 (castanha-do-brasil)	34,6	fitopatogênico
UEA_028 (tucumã)	29,4	fitopatogênico
UEA_048 (mandioca)	25,7	endofítico
UEA_138 (cacau)	19,1	fitopatogênico
UEA_136 (tucumã)	16,0	fitopatogênico
UEA_137 (babosa)	11,2	fitopatogênico
UEA_135 (pupunha)	10,0	fitopatogênico
UEA_061 (tucumã)	8,0	endofítico
UEA_007 (cacau)	7,9	fitopatogênico
UEA_013 (cacau)	7,9	fitopatogênico
UEA_002 (tucumã)	7,8	fitopatogênico
UEA_011 (babosa)	7,8	fitopatogênico
UEA_033 (pupunha)	7,0	fitopatogênico
UEA_034 (pupunha)	6,8	fitopatogênico
UEA_109 (mandioca)	6,2	endofítico
UEA_010 (pupunha)	4,4	fitopatogênico
UEA_053 (tucumã)	4,0	endofítico
UEA_107 (mandioca)	4,3	endofítico
UEA_042 (tucumã)	4,1	endofítico
UEA_047 (castanha-do-brasil)	3,7	endofítico
UEA_106 (mandioca)	3,5	endofítico

*Dados obtidos por RMN-¹H

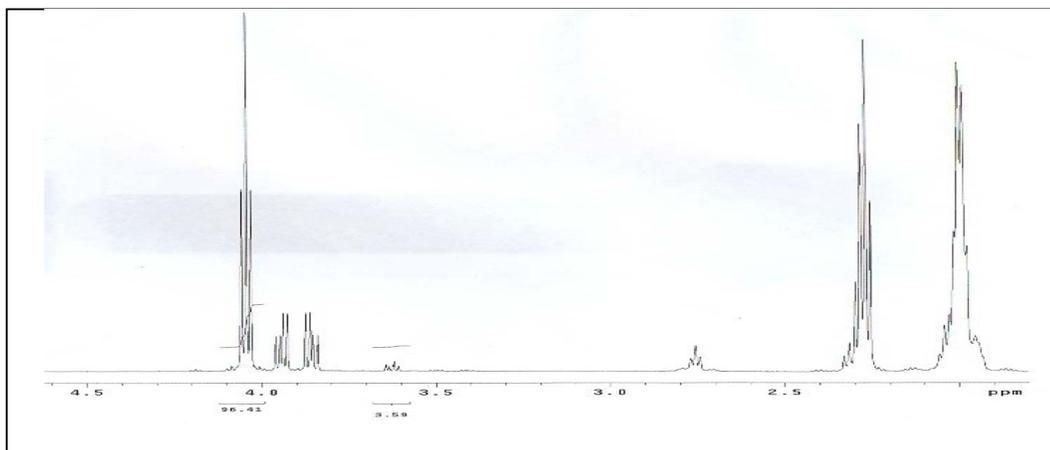


Figura 16 – Espectro de RMN-¹H para uma alíquota (72 h) da reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol catalisada pela lipase comercial CAL-B.

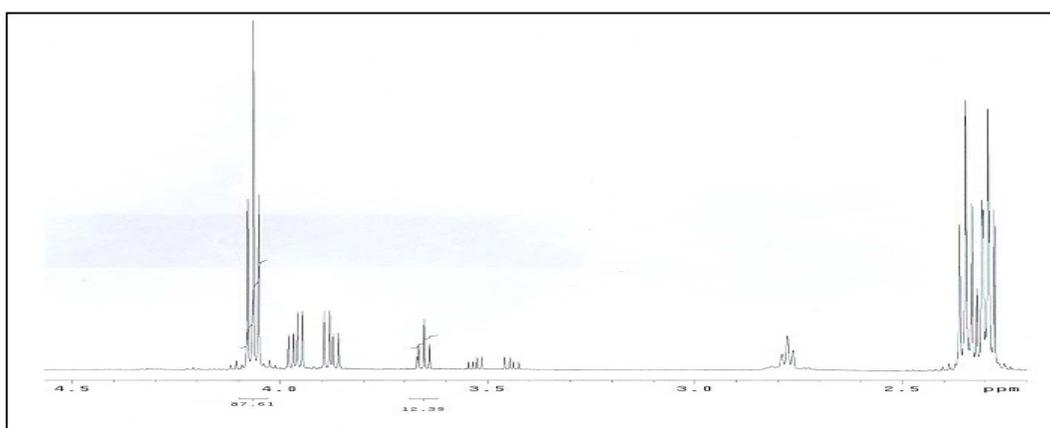


Figura 17 – Espectro de RMN-¹H para uma alíquota (72 h) da reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol catalisada pelo isolado UEA_001.

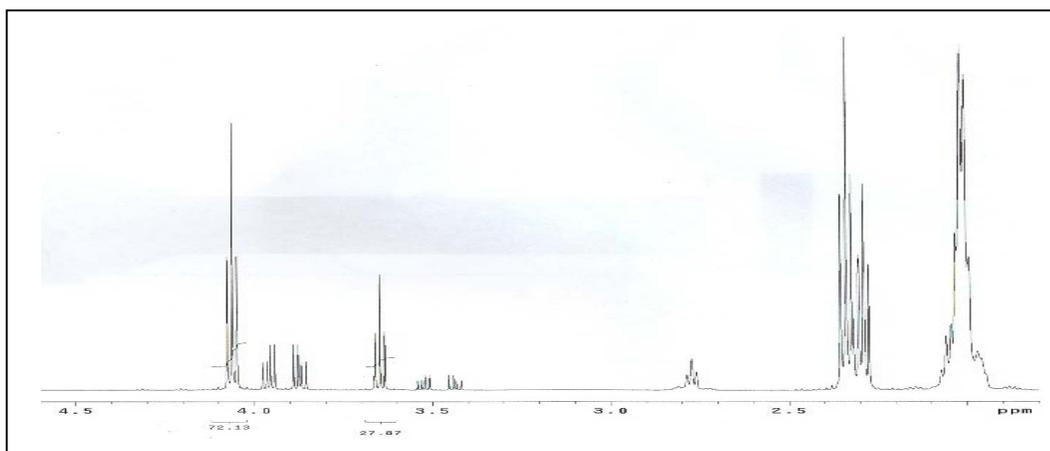


Figura 18 – Espectro de RMN-¹H para uma alíquota (72 h) da reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol catalisada pelo isolado UEA_027.

4.2.1 Influência do Teor de Água na Atividade Biocatalítica

Como o isolado UEA_027 apresentou uma conversão significativa (72%) na reação de esterificação, foi selecionado para verificar a influência do teor de água na atividade biocatalítica. As conversões (%) obtidas (RMN¹H), de acordo com o tempo de reação (24 e 96 h) e com a quantidade de água (μL), estão no gráfico da **Figura 19**.

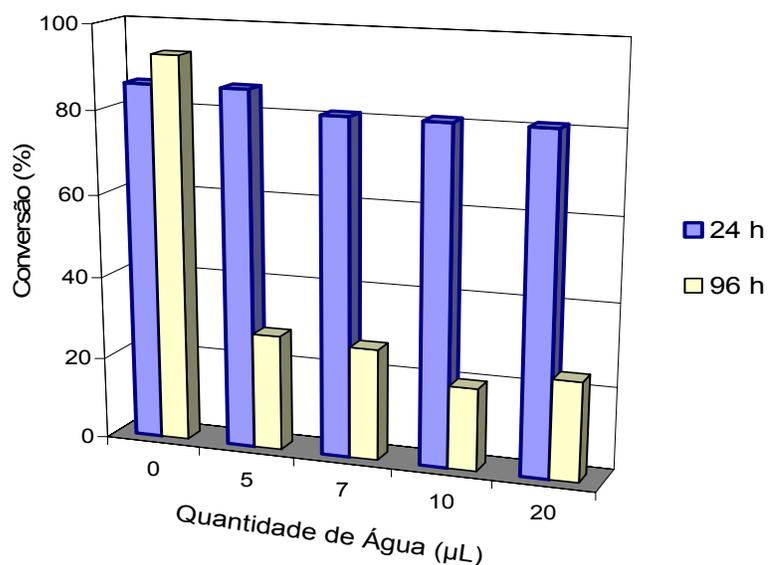


Figura 19 - Relação entre a quantidade de água e a porcentagem de conversão a éster na reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol em hexano, catalisada pelo isolado UEA_027, em 24 e 96 h de reação – dados obtidos por RMN¹H.

Pelo gráfico pode-se observar que quanto menor a quantidade de água presente na reação, maior a porcentagem de conversão a éster em 24 e 96 horas (**Figura 19**). Resultados similares foram obtidos por Torres *et al.* (2003) quando analisaram a influência do teor de água na atividade da lipase ligada ao micélio de *Rhizopus oryzae*. Na reação de esterificação do ácido linoleico com 1-propanol a lipase de *R. oryzae* foi mais eficiente quando utilizada seca ou depois de ser adicionada uma pequena quantidade de água (5 μL). Essa relação inversa entre conversão e quantidade de água é também observada quando se compara a conversão de esterificação obtida na reação catalisada pelo micélio do isolado UEA_027 liofilizado (menor teor de água): 86% de conversão em 24 horas de reação e 93% de conversão em 96 horas de reação; com a conversão obtida para mesma reação de esterificação catalisada pelo micélio seco apenas no dessecador (maior teor de água, 9,10%

p/p, **Tabela 9**): 72% de conversão em 72 horas de reação. Tanto em 96 quanto em 24 horas de reação a porcentagem de conversão a éster foi mais alta para a reação catalisada pelo micélio liofilizado do que para a reação catalisada pelo micélio seco no dessecador, indicando a grande influência da água na formação do produto.

Após 96 horas de reação foi observada uma notável redução na porcentagem de conversão a éster, nas reações em que certa quantidade de água havia sido adicionada, podendo-se concluir que houve um deslocamento do equilíbrio, conforme o princípio de Le Chatelier (adicionando qualquer participante da reação, o equilíbrio se desloca no sentido de consumi-lo, procurando minimizar o efeito da adição). Neste caso, os produtos da reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol são: o éster oleato de pentila e a água; logo, o acréscimo de água ao meio reacional e o passar do tempo, a reação (reversível) será deslocada no sentido de formação dos reagentes, ou seja, o éster será hidrolisado a álcool e ácido com o consumo de uma molécula de água. Resultado semelhante foi encontrado por Carvalho *et al.* (2005) na reação de esterificação do ibuprofeno racêmico com 1-propanol catalisada pela lipase de *Geotrichum candidum*.

4.2.2 Porcentagem de Água no Micélio Seco

Os micélios secos no dessecador de isolados fitopatogênicos de pupunha, castanha-do-brasil, tucumã, babosa e cacau, **Tabela 9**, foram submetidos à análise de teor de água em aparelho Karl-Fischer (Metrohm, modelo 633, **Figura 20**). O teor de água variou de 4,31 a 10,63% (p/p) (**Tabela 9**). Para efeito de comparação, lipases extracelulares de diferentes origens (bactérias, fungos e actinomicetos isolados de amostras de solo da Espanha, Nicarágua e Cuba) e liofilizadas, quando analisadas por Karl-Fischer apresentaram teor de água de 2,10 a 4,14% (p/p) (OTERO *et al.*, 2005).

Tabela 9 - Porcentagem de água presente nos micélios secos.

Código de Identificação (origem)	% (p/p) de Água ^a	% de Conversão a Éster Após 72 h Reação ^b
UEA_135 (pupunha)	10,63	10,0
UEA_027 (castanha-do-brasil)	9,10	72,1
UEA_136 (tucumã)	8,01	16,0
UEA_137 (babosa)	7,88	11,2
UEA_138 (cacau)	4,31	19,1

^a Dados obtidos por Karl-Fischer

^b Dados obtidos por RMN-¹H

O micélio do isolado UEA_138 apresentou o menor teor de água, 4,31% (p/p), e catalisou a reação de esterificação do ácido oléico com n-pentanol com conversão de 19,1% (**Tabela 9**). Já o micélio do isolado UEA_027 com o segundo maior teor de água, 9,10% (p/p), forneceu o maior valor de porcentagem de conversão (72,1%), dentre os micélios que tiveram seus teores de água determinados por Karl-Fischer. A quantidade de água requerida para níveis altos de atividade catalítica difere grandemente entre lipases. Algumas, como as enzimas de *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, e *Pseudomonas glumae*, retêm altos níveis de atividade mesmo depois de secas sobre uma peneira molecular. Outras lipases, como as de *Candida rugosa* e *Candida deformans*, parecem requerer níveis mais altos de água para níveis mais altos de atividade (TORRES *et al.*, 2003). Por se tratarem de lipases de diferentes origens, nenhuma relação entre teor de água do micélio e conversão da reação biocatalítica foi estabelecida.



Figura 20 - Aparelho Karl-Fischer.

4.3 ATIVIDADE ENANTIOSSELETIVA

O isolado UEA_027, por catalisar a reação de esterificação com conversão acima de 70%, foi utilizado para resolução do (*R,S*)-2-hexanol e do (*R,S*)-2-octanol. Novamente, as reações foram mediadas pela lipase de *Candida antarctica* (CAL-B). Para as reações de resolução, o excesso enantiomérico do substrato (ee_s) e o excesso enantiomérico do produto (ee_p) foram determinados por CGMS-quiral. Nas **Figuras 21** e **22** estão os cromatogramas das reações e do padrão racêmico do álcool para a resolução do 2-hexanol.

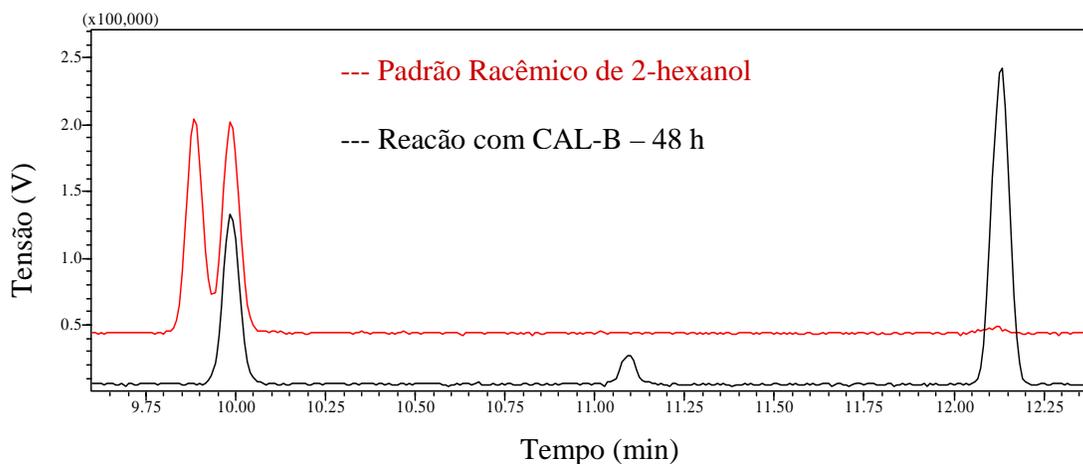


Figura 21 - Cromatograma para uma alíquota (48 h) da reação de resolução do (*R,S*)-2-hexanol com acetato de vinila, catalisada pela lipase comercial de *Candida antarctica* (CAL-B).

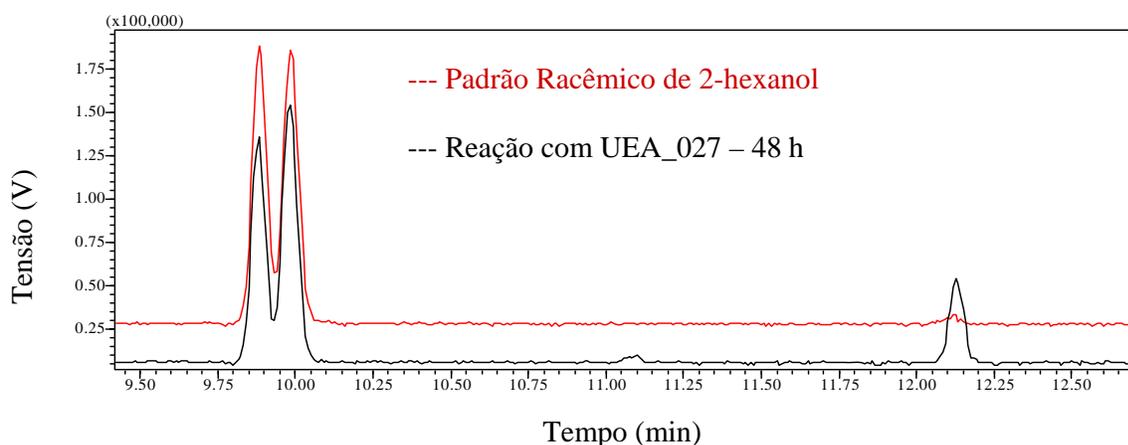


Figura 22 - Cromatograma para uma alíquota (48 h) da reação de resolução do (*R,S*)-2-hexanol com acetato de vinila, catalisada pelo micélio do isolado UEA_027.

Pode-se verificar pelo cromatograma da **Figura 21** que com 48 horas o excesso enantiomérico do substrato (ee_s) já tinha atingido um valor $>99\%$ para a reação catalisada pela lipase comercial (CAL-B). Já para a reação catalisada pelo isolado UEA_027 o ee_s tem um valor bem menor: 8% (**Figura 22**). Em ambos cromatogramas observa-se a formação de produtos nos tempos de retenção de 11,09 e 12,12 minutos.

Nas **Figuras 23 e 24** estão os cromatogramas das reações e do padrão racêmico do acetato (produto) para a resolução do 2-octanol. Pode-se verificar pelo cromatograma da **Figura 23** que os enantiômeros do acetato saem nos tempos de retenção 14,1 e 15,7 minutos. Sabe-se pelo padrão do álcool que os enantiômeros do 2-octanol saem nos tempos de retenção 10,5 e 10,7 minutos, como na **Figura 23** visualiza-se apenas um pico do álcool,

em 10,7 conclui-se que a lipase comercial CAL-B resolveu o álcool com $ee_s > 99\%$, em 72 h de reação. Para o mesmo tempo reacional (72 h) a reação catalisada pelo micélio do isolado UEA_027 apresenta os dois picos do álcool, com ee_s de 25% (**Figura 24**). Nota-se pelos cromatogramas das **Figuras 23 e 24** que ambas lipases têm enantiopreferência pela forma do acetato que sai no tempo de retenção de 15,7 minutos. Tanto a enzima comercial quanto a lipase do isolado UEA_027 apresentaram resultados similares para ee_p , 86% e 88%, respectivamente, para o tempo reacional de 72 horas (**Tabela 10**). A porcentagem de conversão a éster (c) foi determinada pela Equação 1 e a razão enantiomérica (E) foi calculada pela Equação 3 (**Tabela 10**).

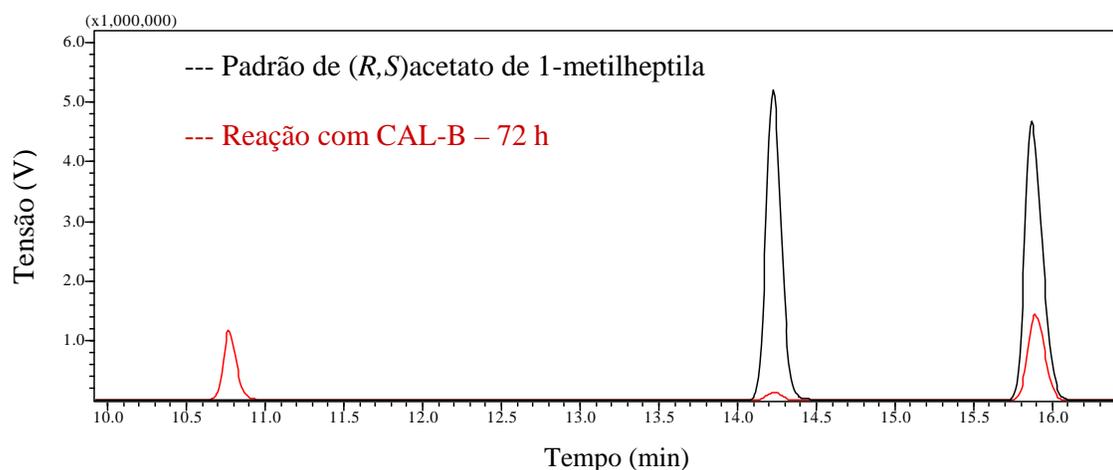


Figura 23 - Cromatograma para uma alíquota (72 h) da reação de resolução do (R,S)-2-octanol com acetato de vinila, catalisada pela lipase comercial de *Candida antarctica* (CAL-B).

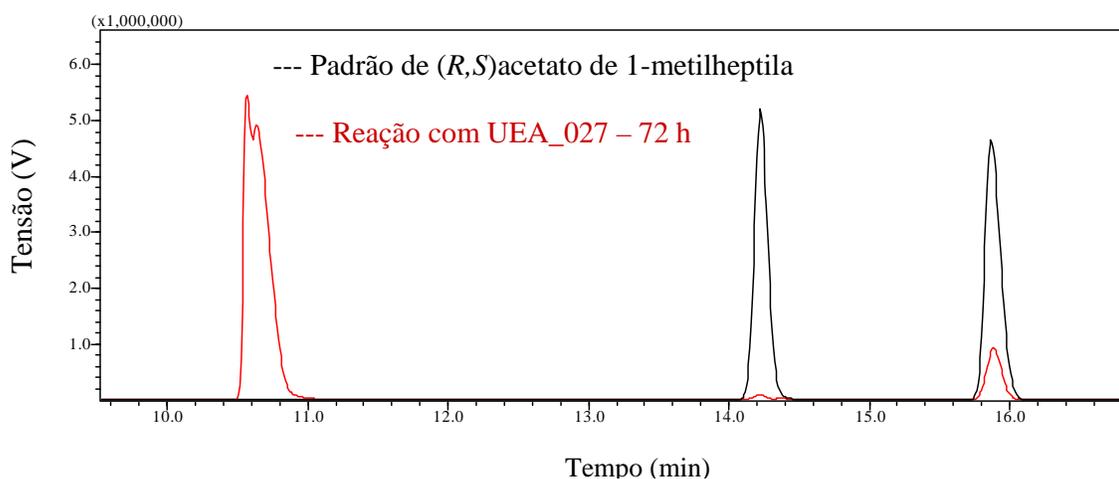


Figura 24 - Cromatograma para uma alíquota (72 h) da reação de resolução do (R,S)-2-octanol com acetato de vinila, catalisada pelo micélio do isolado UEA_027.

Tabela 10 - Conversão a éster (c), excesso enantiomérico do substrato (ee_s), excesso enantiomérico do produto (ee_p) e razão enantiomérica (E) obtidos com a lipase do isolado UEA_027 e a lipase comercial CAL-B na reação do (R,S)-2-octanol com acetato de vinila.

Enzima	Tempo de reação (h)	c ^a (%)	ee _s (%)	ee _p (%)	E ^b
UEA_027	72	22	25	88	21
CAL-B	72	53	>99	86	122

^a valores calculados a partir da Equação 1.

^b valores calculados a partir da Equação 3.

Conforme demonstrado na **Tabela 10**, a reação catalisada pelo isolado UEA_027 apresentou um valor de E acima de 20, considerado de moderado a bom (valores de 15 a 30). Já a lipase comercial apresentou um valor de E acima de 120, considerado excelente (valores acima de 30). A lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) tem sido relatada pela alta eficiência na esterificação de diferentes álcoois secundários racêmicos e ácidos carboxílicos. O valor de E na esterificação do 2-octanol racêmico com o ácido decanóico na presença de hexano foi de aproximadamente 20, conforme relatado por Carvalho *et al.* (2005); e de aproximadamente 40, conforme relatado por Wehtje *et al.* (1997).

Tem-se observado que mesmo as enzimas que apresentam baixos valores de E têm sido utilizadas com sucesso nas resoluções de substratos racêmicos, considerando-se que diferentes condições de reação, tais como tipo de solvente, atividade de água e temperatura de reação interferem significativamente nos valores de E (COSTA; AMORIM, 1999), e, portanto essas condições podem ser otimizadas.

Outro importante ponto a ser destacado é a utilização da lipase aderida ao micélio do isolado UEA_027 como catalisador das reações, e não da enzima purificada (como no caso da lipase comercial CAL-B), o que pode indicar a potencialidade dessa lipase quando passar por isolamento e purificação.

5. CONCLUSÕES

Os fungos isolados de plantas da região amazônica apresentaram um grande potencial como fornecedores de lipases para utilização em biotransformações, pois:

- Oitenta e três por cento (83%) dos isolados testados, provenientes de fungos endofíticos, fitopatogênicos e degradadores de madeira apresentaram atividade hidrolítica;
- Dos 26 isolados selecionados para catalisarem a reação de esterificação, dois apresentaram conversão biocatalítica acima de 70%; quatro apresentaram conversão acima de 30%; e dois acima de 20%, para 72 horas de reação.
- O isolado selecionado para catalisar as reações enantiosseletivas, UEA_027, resolveu o álcool (*R,S*)-2-octanol com excesso enantiomérico do produto acima de 88% e uma razão enantiomérica considerada boa (E acima de 20).

Os resultados obtidos sugerem que os dois gêneros testados de fungos degradadores de madeira talvez não sejam uma boa fonte de enzimas hidrolíticas.

Entre os fungos isolados de plantas da região amazônica 94% dos isolados endofíticos apresentaram resultados positivos para o ensaio de atividade hidrolítica.

Pelo tamanho do halo formado e a porcentagem de conversão da reação de esterificação não se encontrou nenhum tipo de correlação entre a atividade hidrolítica e sintética dos isolados testados como catalisadores.

Para o isolado UEA_027 quanto menor a quantidade de água presente no meio reacional, maior sua atividade catalítica.

Dos fungos testados neste trabalho, a lipase ligada ao micélio do isolado UEA_027 mostrou algumas propriedades desejadas para o uso em biocatálise: boa atividade de hidrólise, boa capacidade de esterificação do ácido oleico em meio orgânico, e boa resolução dos álcoois racêmicos secundários testados.

6. SUGESTÕES

Avaliar o crescimento em meio líquido do isolado UEA_027 e UEA_001 em diferentes condições como temperatura, substrato e pH.

Utilizar os micélios secos e liofilizados dos isolados UEA_001 e UEA_027 como catalisadores da reação biocatalítica do ácido oléico com n-pentanol. Determinar o teor de água dos micélios secos e liofilizados por Karl-Fischer, e analisar sua influência na atividade catalítica dos mesmos.

Utilizar o isolado UEA_001 como catalisador da reação enantiosseletiva, nas condições definidas no item 3.4 e comparar o resultado obtido com o resultado do isolado UEA_027.

Modificar as condições da reação enantiosseletiva como temperatura, solvente e massa micelial, para tentar elevar o valor da conversão e da razão enantiomérica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. A.; KILÉNYI, S. N. **Asymmetric Synthesis**. London: Blackie Academic & Professional, 1992, 233p.
- ÂNGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EducS, 2004, p. 263-285, cap.8.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAIVA, P. T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002, 86p.
- ARNOLD, F. H. Directed Evolution: Creating Biocatalysts for the Future. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 23, p. 5091-5102, 1996.
- BARBOSA, F. A Moderna Biotecnologia e o Desenvolvimento da Amazônia. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.17, n. 2, p. 43-79, maio/ago. 2000.
- BARBOSA, F. B. C. A Biotecnologia e a Conservação da Biodiversidade Amazônica, sua Inserção na Política Ambiental. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 69-94, maio/ago. 2001.
- BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional, 1999, 113 p.
- BORÉM, A.; VIEIRA, M. L. C. **Glossário de Biotecnologia**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2005. Disponível em: <http://www.cib.org.br/glossario.php>. Acesso em: 28/09/2006.
- CARDENAS, F.; DE CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 145–154, 2001.
- CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, 360p.
- CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de Biocatálise Enantiosseletiva de Lipases Microbianas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC**. São Carlos: Editora da UFSCar, 2001, 77p.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 193–197, 2004.
- CLEMENT, C. R.; AGUIAR, J. P. L.; ARKCOLL, D. B. Composição química do mesocarpo e do óleo de três populações de pupunha (*Bactris gasipaes*) do Rio Solimões, Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.20, n.1, p. 115-118, 1998.

- COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O Emprego de Lipases como Agentes de Resolução Cinética de Enantiômeros em Síntese Orgânica: Aspectos Gerais Sobre a Influência do Solvente. **Quim. Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.
- COSTAS, M.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2109–2114, 2004.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1995, 434p.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2004, 454p.
- GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v.18, p.2714-2723, 1997. Disponível em: <http://www.expasy.org/spdbv/> Acesso em: 10/12/2002.
- KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, p. 241-246, 2001.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: SARVIER, 1995, 839p.
- LOGUERCIO-LEITE, C.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004, p. 15-44, cap.1.
- MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004, p. 451-490, cap.13.
- MOLINARI, F.; GANDOLFI, R.; CONVERTI, A.; ZILLI, M. Mycelium-bound carboxylesterase from *Aspergillus oryzae*: an efficient catalyst for acetylation in organic solvent. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 27, p. 626-630, 2000.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 13 ed. Coimbra: Serviço de Educação Fundação Calouste Gulbenkian, 1996, 1510 p.
- MOSS, G. P. **Web Version of Enzyme Nomenclature**. 1992. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> Acesso em: 11/10/2006.
- MURALIDHAR, R.V.; CHIRUMAMILLA, R.R.; MARCHANT, R.; RAMACHANDRAN, V.N.; WARD, O.P.; NIGAM, P. Understanding lipase stereoselectivity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 81–97, 2002.
- NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P.; MORAN, P. J. S. Estudos de Proteção da Célula de *Saccharomyces cerevisiae* para Utilização em Reações de Redução em Meio Orgânico. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p.567-571, 2002.
- OTERO, C.; BERRENDERO, M. A.; CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; ÉLSON, S.W. General Characterization of Noncommercial Microbial Lipases in Hydrolytic and Synthetic Reactions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.120, p.209-223, 2005.
- PERES, T. B. Noções Básicas de Cromatografia. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 227- 229, 2002.

PINTO, M. M. Importância dos Estereoisômeros na Terapêutica. **Boletim do CIM** (Centro de Informação do Medicamento) - Ordem dos Farmacêuticos, set/out. 2005. Disponível em: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/ordemfarmaFiles/files/ofFileS1_1361.pdf. Acesso em: 21/09/2006.

ROBERTSON, D. E.; STEER, B. A. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p.141-149, 2004.

RONDON, A. C. F. **Atividade Amilolítica de Fungos Endofíticos Isolados de *Manihot esculenta* Crantz**. 2003. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 37, p. 1608-1633, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2000, 460p.

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: *Pausicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

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 BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 338–344, 2002.

VANDAMME, E. J. The search for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals. **Journal of Biotechnology**, v. 37, p. 89-108, 1994.

WAHLER, D.; BOUJARD, O.; LEFE`VRE, F.; REYMOND, J.L. Adrenaline profiling of lipases and esterases with 1,2-diol and carbohydrate acetates. **Tetrahedron**, v. 60, p. 703–710, 2004.

WEHTJE, E.; COSTES, D.; ADLERCREUTZ, P. Enantioselectivity of lipases: effects of water activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, p. 221-230, 1997.

ZANOTTO, S. P. **Utilização de Enzimas e Microrganismos para Obtenção de Compostos Oticamente Ativos**. 2003. 115f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.