

# UTILIZAÇÃO DA LIPASE FÚNGICA PRODUZIDA POR FERMEMNTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO EM BIOCATÁLISE.

Paula Barbosa Condi<sup>1</sup>, Maria Luiza Fernandes Rodrigues<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

<sup>2</sup>Doutora em Química Orgânica. Prof<sup>a</sup>. Orientadora e Adjunto da Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná. Curitiba, Paraná, Brasil.

Endereço para correspondência: Maria Luiza Fernandes Rodrigues [mlmfernandes@hotmail.com](mailto:mlmfernandes@hotmail.com)

---

## RESUMO

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná. O fungo utilizado para a produção da lipase por Fermentação em Estado Sólido (FES), estudada neste trabalho, foi isolado da folha da espécie *Ricinus communis* (mamona), e identificado como R2. A atividade enzimática foi determinada através do método titulométrico. A última etapa deste trabalhinho foi o estudo e a aplicação das enzimas em reações de síntese de ésteres, como os acetatos de propila (aroma da pêra) e octila (aroma da laranja).

**Palavras-Chave:** *Ricinus communis*, fungos endofíticos, lipases

---

## ABSTRACT

The experimental part of this work was developed in the laboratory of Microbiology, School of Biological Sciences and Health University Tuiuti. The fungus used for the production of lipase by Solid State Fermentation (SSF), studied in this work was isolated from leaf species *Ricinus communis* (castor bean), and identified as R2. Enzyme activity was determined by titration method. The last step of this work was the study and application of enzymes in reactions of synthesis of esters such as propyl acetate (pear aroma) and octyl (orange flavor).

**Keywords:** *Ricinus communis*, endophytic fungi, lipases

---

## 1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas hidrolíticas que "in vivo" catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), sendo a trioleína o seu substrato padrão, aos ácidos graxos correspondentes e glicerol, constituindo uma classe especial de carboxil éster hidrolases. "In vitro", as lipases também atuam como catalisadores em diversas reações, com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, incluindo as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (FORESTI, 2006; DIAZ *et al.*, 2006).

Esta classe de enzimas pode ser de origem bacteriana, fúngica, vegetal, animal e diferem também quanto às suas propriedades cinéticas. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de microrganismos são as mais utilizadas, devido a sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las (FERNANDES, 2007).

As lipases apresentam destaque no mercado mundial, tendo várias aplicações utilizadas em larga escala, tais como: hidrólise de triacilgliceróis insolúveis, catálise de reações de esterificação, interesterificação e transesterificação e na biocatálise em geral, em meios não aquosos ou em meios orgânicos. Para sua aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial, isto é, a enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. (FERNANDES, 2007).

Embora sua função natural seja a de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos (Figura 1).

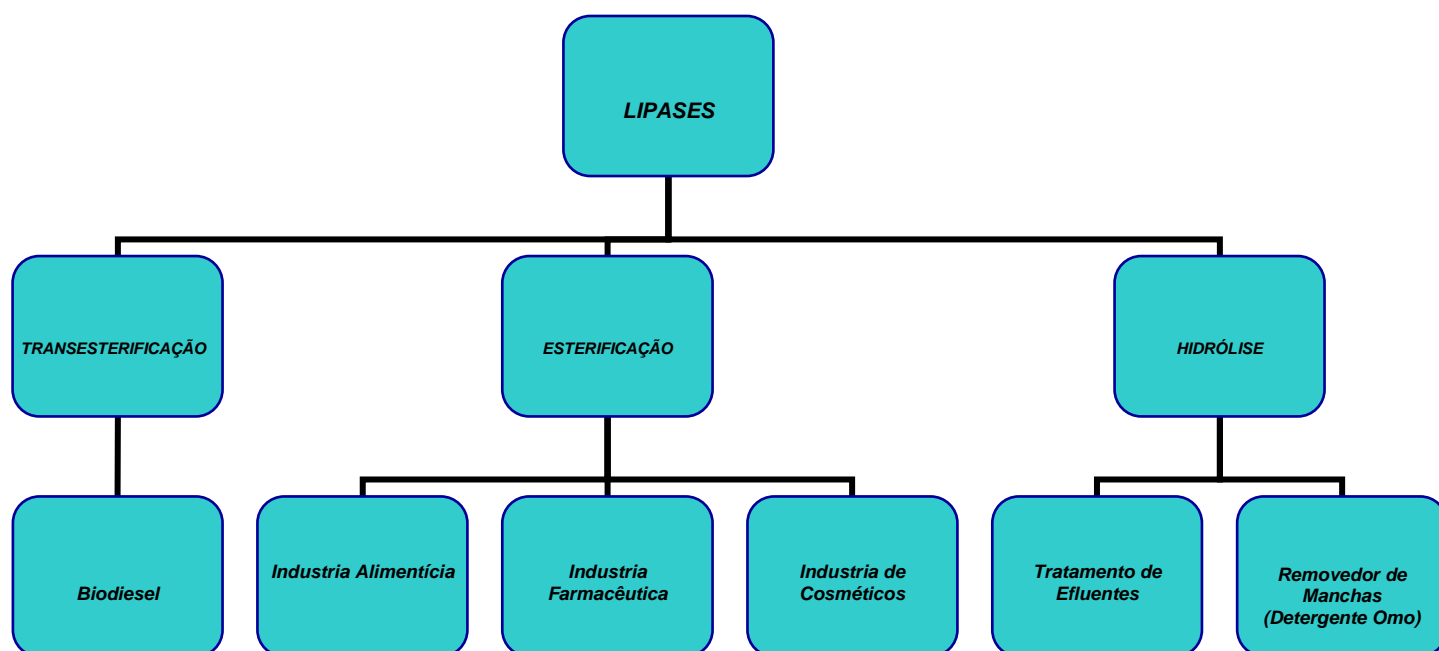


Figura 1: Aplicações da lipase.

Ésteres são compostos amplamente distribuídos na natureza, sendo os ésteres simples aqueles que tendem a ter um odor agradável, estando geralmente associados com as propriedades organolépticas de frutos e flores. Ésteres produzidos por síntese química têm um valor reduzido no mercado consumidor, pois não são considerados naturais. Já ésteres produzidos por síntese enzimática são de grande valor no mercado, sendo usados na produção de produtos cosméticos, alimentícios e farmacêuticos (FERNANDES, 2002).

O objetivo deste trabalho é avaliar as reações de hidrólise de triacilglicerol e síntese de ésteres de aroma utilizando-se a lipase fúngica como biocatalisador das reações.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Tuiuti do Paraná, na Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – Campus Barigui, entre os meses de Agosto a Novembro de 2009.

### 2.1. SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

A seleção dos fungos endofíticos foi realizada em conjunto com o grupo de pesquisa da professora Roseli Mello da Universidade Tuiuti do Paraná.

O material botânico foi coletado em um prazo de 24 horas. Os fungos isolados das folhas da mamona (*Ricinus communis*) foram cultivados em Ágar Saboroud contendo cloranfenicol e identificados de A a R, e submetidos a testes de produção de lipases em placas de Petri pela aluna Ana Carolina Debiasio, do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Figura 2). As cepas que apresentaram maior produção de lipases foram R1 e R2. A cepa escolhida foi a R2.



**Figura 2:** Teste de produção de lipase. O resultado positivo é indicado pelo halo de fosforescência alaranjada que é visualizado quando a placa é irradiada ao UV em 365 nm. (Fotógrafa: Mirian Moraes, 2009)

### 2.2. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min.

### 2.3. FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

A lipase obtida através do fungo endofítico R2 foi produzida por FES nas melhores condições (pH 7,0, 65 % de umidade, temperatura de 30 °C e tempo de fermentação de 62 h) otimizadas previamente pela aluna Gisele Gelbecke, do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná.

#### 2.3.1. Condições de cultivo no meio sólido

Os ensaios de FES foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo cada um 5g de Erva Mate (*Ilex paraguariensis*) e 5g de sementes com valor lipídico. As sementes escolhidas foram Gergelim (*Sesamum indicum*), Linhaça (*Linum usitatissimum L.*) e Girassol (*Helianthus annuus*). Os experimentos foram realizados em duplicata e para cada experimento foi realizado um grupo controle, que não continha a suspensão de esporos.

Após o preparo do substrato, estes foram inoculados com os esporos do fungo R2, sendo adicionados 2 mL do inóculo em cada Erlenmeyer. Os sólidos foram então incubados em estufa a 30°C, com 65 % de umidade, durante 18, 48, 62, 72 e 96 horas (Figura 3).

A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica (método titulométrico) no material fermentado. A atividade lipolítica foi expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido fermentado (U/gSS).



**Figura 2.** Sólido Fermentado incubado em estufa a 30°C. (Fotografia: Paula Condi, 2009)

### 2.4. BIOCATALÍSE: ESTUDO DE REAÇÃO DE SÍNTESE DE ÉSTERES DE AROMAS

Os estudos de síntese foram realizados utilizando-se o sólido fermentado (adição direta). Nestes experimentos, a enzima foi produzida por FES e no pico máximo de produção da enzima (62

h), o cultivo foi interrompido e o material fermentado foi seco em estufa a 30°C por 48 horas para eliminar a água do meio, procurando evitar contaminação e interferência nas reações de hidrólise e síntese.

Estudos cinéticos foram realizados para a verificação de síntese do acetato de propila - aroma da pêra (Figura 4) e acetato de octila - aroma da laranja (Figura 5).

#### 2.4.1. Estudos de Síntese utilizando a Enzima Produzida por sólidos fermentados

Os substratos utilizados foram ácido acético (70 mM), álcool propílico (350 mM) e álcool octílico (350 mM). As reações foram realizadas utilizando-se 1 g do material fermentado, em meio de n-hexano, a 37°C. As reações foram realizadas sob agitação constante e acompanhadas durante 60 minutos.

As alíquotas foram retiradas do meio reacional nos intervalos de tempo de 0, 10, 20, 40 e 60 minutos. A conversão em éster foi avaliada qualitativamente por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Na análise foi realizado ensaio - padrão (branco) com um controle negativo contendo o material fermentado, meio reacional com ausência do ácido carboxílico (ácido acético). O objetivo desta etapa foi garantir que a catálise da reação de síntese dos ésteres estava ocorrendo somente pela presença da lipase.

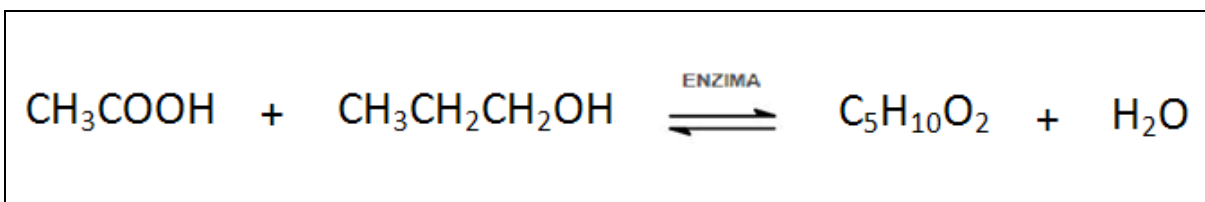


Figura 4. Reação Esterificação do Acetato de Propila.

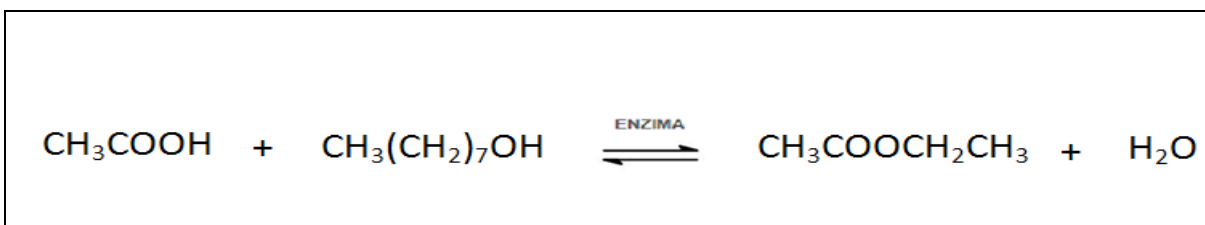


Figura 5. Reação Esterificação do Acetato de Octila.

## 2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.5.1. Método Titulométrico

Os ensaios de atividade frente à triacilgliceróis foram realizados utilizando-se o óleo de oliva como substrato. A determinação da atividade de lipases por titulometria foi baseada no método proposto por Stuer *et al.* (1986), com modificações (Figura 6). O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis.

O meio reacional para o substrato foi previamente preparado na forma de emulsão. A emulsão é composta por solução de Tris-HCl (0,25 mM) e NaCl (150 mM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), goma arábica 3%, fenolftaleína como indicador e pelo substrato óleo de oliva 1,0 mM (La Violetera). Os ácidos graxos liberados do substrato emulsificado pela ação da enzima foi titulado com NaOH 0,05 M, a 37°C e pH 7,0 por 3 minutos. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.



**Figura 6.** Método Titulometrico. (Fotografia: Paula Condi, 2009)

### **2.5.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Cada alíquota foi retirada do meio reacional nas reações de síntese de ésteres, nos intervalos de zero até 60 minutos e aplicada em uma cromatoplaça contendo fluoresceína (Merck), com auxílio de um tubo capilar. Após, as cromatoplaças foram transferidas para uma cuba de vidro hermeticamente fechada contendo acetato de etila: hexano (1:3) como fase móvel. As cromatoplaças foram retiradas da cuba de vidro e evaporadas a temperatura ambiente para posterior visualização das manchas.

As placas foram primeiramente visualizadas em câmera UV a 254 nm. Em seguida, foram reveladas com iodo sublimado (I<sub>2</sub>). As manchas apareceram gradativamente em decorrência da interação do iodo com os componentes das amostras (mancha marrom).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

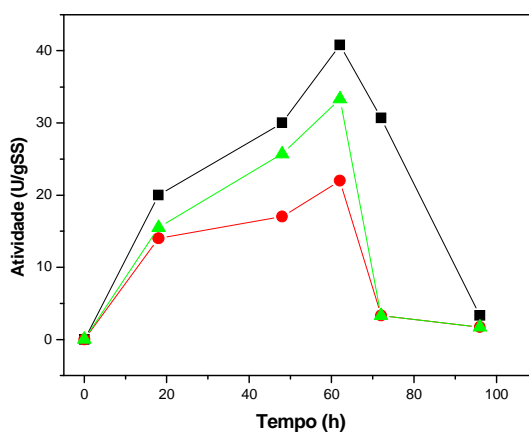
#### 3.1. PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA POR FES UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Para a produção de lipases foram utilizados os substratos com alto teor lipídico com o farelo de semente de girassol (FSG), farelo de semente de linhaça (FSL), farelo de semente de gergelim (FSGE) e o resíduo agroindustrial da erva-mate (EM), preparados no laboratório. O resíduo de erva-mate foi fornecido pela indústria Leão S.A (Curitiba, PR).

Os farelos agiram como fontes de nutrientes, principalmente de lipídeos, enquanto que o resíduo agroindustrial EM apenas como suporte físico, pois apresenta baixo teor de lipídeos (menos de 2 %). Para a determinação de produção de enzimas lipolíticas utilizou-se o método titulométrico, conforme descrito em 2.5.1.

Com relação aos substratos utilizados, o FSGE possui um maior teor de lipídeos (48 %) em relação ao FSL (28 %) e ao FSG (32 %). Estes resultados estão de acordo com a origem e o tipo de processamento que estes materiais sofreram antes de serem utilizados como substratos.

Analisando-se a Figura abaixo, verifica-se que a maior produção de lipases ocorreu em 62 h de fermentação para os três substratos estudados. A maior produção de lipase ocorreu para o substrato FSGE (41 U/gSS ou 410 U), seguido do substrato FSG (33 U/gSS ou 330 U). A menor produção de lipases foi obtida com o substrato FSL (22 U/gSS ou 220 U).



**Figura 6.** Produção de lipase fúngica pelo fungo endofítico R2 por Fermentação no Estado Sólido. Meios de cultivo: (-●-) farelo de semente de linhaça (FSL); (-▲-) farelo de semente de girassol (FSG); (-■-) farelo de semente de gergelim (FSGE). Os ensaios foram realizados com umidade de 65 %. Experimentos realizados em duplicata com temperatura de 30°C.

Os resultados obtidos neste trabalho são inéditos, pois não foram encontrados artigos que reportem a produção de lipases por FES utilizando-se fungos endofíticos isolados das folhas da mamona (*Ricinus communis*).

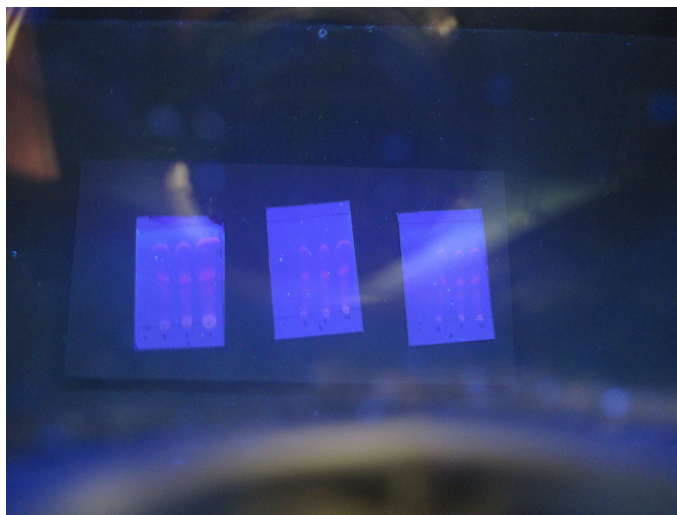
### 3.2. BIOCATALÍSE: REAÇÃO DA SÍNTESE DE ÉSTERES

Para os estudos de biocatálise, realizou-se a FES a 30<sup>0</sup>C, mistura de FSGE (5 g) e EM (5 g) e FSG (5 g) e EM (5 g), contendo 65 % de umidade. No pico máximo de produção da enzima (62 h), o cultivo foi interrompido e o material fermentado foi seco em estufa a 30<sup>0</sup>C. Estudos cinéticos foram realizados para a verificação de síntese de ésteres com aplicações industriais, como os acetatos de propila (aroma da pêra) e de octila (aroma da laranja).

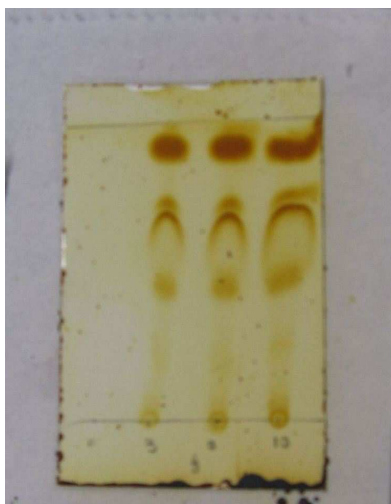
Os ensaios foram realizados utilizando-se 1 g do material fermentado e seco, em n-hexano, a 37<sup>0</sup>C, com uma razão molar 1:5 (ácido/álcool) e com atividade de 41 U/gSS para o FSGE e 33 U/gSS para o FSG.

Durante o processo foram coletadas alíquotas nos seguintes tempos: 0, 10, 20, 30, 40 e 60 min. As reações de síntese foram acompanhadas por CCD conforme descrito em 2.5.2.

Verificou-se que tanto as lipases produzidas pelos substratos FSGE e FSG catalisaram as reações de síntese do aroma da pêra e da laranja, a partir de 20 min de reação, conforme pode ser verificado nas figuras abaixo (Figuras 7, 8).



**Figura 7.** Foto da cromatoplaça visualizadas em câmera UV a 254 nm. (Fotografia: Paula Condi, 2009)



**Figura 8.** Foto da cromatoplaça revelada em iodo sublimado. (Fotografia: Paula Condi, 2009)



Os ésteres são compostos derivados de ácidos e álcoois e podem ser obtidos de fontes naturais por destilação e extração com solventes adequados ou por processos químicos e mais recentemente por biocatálise (Krishna *et al.*, 2001a,b; Marques e Pastore, 1999). Possuem diversas aplicações, como na produção de aromas, na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos, na fabricação de plásticos e fibras sintéticas, na síntese de sedativos e outros fármacos e como surfactantes, entre outras. Uma variedade de agentes ativos na superfície (surfactantes) tem sido sintetizada utilizando-se lipases. Os ésteres de sacarose, por exemplo, são conhecidos como bons emulsificantes no campo da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. Um outro exemplo é o palmitato de isopropila, usado em preparações medicinais para cosméticos, nas quais é necessária uma boa absorção do produto através da pele (GARCIA *et al.*, 1999).

Outra categoria importante de ésteres são os aromas. Durante muito tempo, as plantas foram a única fonte destes compostos, sendo a maioria isolada de óleos essenciais. Entretanto, nas plantas, os componentes ativos sensorialmente estão freqüentemente presentes em pequenas quantidades ou ligados a outras substâncias, o que acarreta uma baixa produção e custos elevados com o isolamento e purificação do aroma. Outra desvantagem da extração de plantas é a forte dependência de fatores que dificultam o controle do produto, tais como a influência do tempo e o risco de doenças e pragas em tais plantas. Todos estes fatores influem diretamente na variabilidade, quantidade e qualidade do produto final (MARQUES e PASTORE, 1999).

O aroma é um dos mais importantes atributos dos alimentos e bebidas. Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os aditivos aromatizantes ou aromas são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e sápidas, capazes de conferir ou intensificar o "flavour" dos alimentos. Muitos compostos responsáveis por odores de frutas e fragrâncias de alimentos são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta como os acetatos (C<sub>2</sub>), propionatos (C<sub>3</sub>) e butiratos (C<sub>4</sub>). Podem-se citar como exemplos os ésteres butirato de etila, acetato de isoamila, acetato de benzila, acetato de isopentila, propionato de isobutila, butirato de metila e o butirato de etila, que estão presentes respectivamente nos aromas de morango, banana, pêssago, suco de frutas, rum, e maçã (KRISHNA *et al.*, 2001a,b).

Os aromas gerados por via biotecnológica são classificados como "naturais", o que representa uma grande vantagem junto ao mercado consumidor. Atualmente, os consumidores estão dando preferência aos alimentos que apresentem ingredientes naturais, que estão cada vez mais substituindo os aditivos químicos. Para atender a esta crescente demanda do mercado consumidor, os processos biotecnológicos estão sendo usados para produzir diversos aditivos para a indústria de alimentos (KRISHNA *et al.*, 2001 a,b; MARQUES e PASTORE, 1999). Os processos enzimáticos apresentam algumas vantagens em relação aos processos químicos industriais que utilizam catalisadores inorgânicos a altas temperaturas, que formam subprodutos indesejáveis, coloridos e que interferem no aroma. Isto requer procedimentos de purificação de elevado custo. O uso de enzimas permite a síntese de ésteres de alta pureza, com procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam

temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluentes (DEL RIO *et al.*, 2000).

Algumas empresas brasileiras já utilizam, produzem e comercializam enzimas que são utilizadas na síntese de ésteres, como a empresa Novozymes (Araucária, PR), que trabalha com pesquisas biotecnológicas desde 1941 e possui filiais no Brasil, Dinamarca, China, Japão e Estados Unidos. A Novozymes trabalha em conjunto com outros centros de pesquisas mundiais, desenvolvendo novas idéias de como aplicar industrialmente.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, estudou-se a produção de uma lipase fúngica por FES, a partir do fungo endofítico R2 isolado das folhas da mamona (*Ricinus communis*).

Na etapa de produção de enzimas por FES utilizando-se diferentes substratos, os resultados de hidrólise do triacilglicerol demonstraram que a maior produção de lipases ocorreu em 62 h de fermentação, com o substrato FSGE (41 U/gSS ou 410 U), seguido do substrato FSG (33 U/gSS ou 330 U). A menor produção de lipases foi obtida com o substrato FSL (22 U/gSS ou 220 U).

Verificou-se que a lipase catalisou as reações de síntese com aplicações industriais, como os ésteres acetatos de propila (pêra) e octila (laranja);

A partir dos resultados obtidos neste trabalho poderão ser realizados novos estudos para utilização das lipases em aplicações industriais como medicamentos, cosméticos e alimentos.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a pesquisadora e orientadora Maria Luiza F. Rodrigues, a pesquisadora Roseli Mello, a Biotecnóloga Evandra Mello Pereira, a todos os técnicos e funcionários da Universidade Tuiuti do Paraná, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ATTISERAFINI, L.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: **Avanços na Agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2002.
- [2] CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S.P.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; COPNTESINE, F.J.; BIZACO, R. **Química Nova**, Campinas, v.28, n 4, 614-621,2005, nov. 2004.
- [3] DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHA.; CARRIÈRE, F.; BARATTI, J. "Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures". **Enzyme Microbial Technol.**, v. 39, p. 1042-1050, 2006.
- [4] CASTRO, HEIZIR F.; OLIVEIRA, PEDRO C. & SOARES, CLEIDE. **Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno**. Faculdade de Engenharia Química de Lorena – FAENQUIL, Lorena – São Paulo, 22/10/97.

- [5] DEL RÍO, J.L.; CAMINAL, G.; FITÉ, M.; FAUS, I.; BLADÉ, J.; SOLÁ, C. "Lipase-catalysed synthesis of natural ethanol esters: effect of water removal on enzyme reutilisation". **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 75, 991-996, 2000.
- [6] FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 130f. Dissertação de doutorado (Doutorado em Química), Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.
- [7] FERNANDES, M.L.M **Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistemas de micelas reversas**. Curitiba, 2002. 107 f. Tese (Mestrado em Química Orgânica) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.
- [8] GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. "Enzymatic synthesis of fatty esters. Part I. Kinetic approach". **Enzyme Microb. Technol.**, 25, 584-590, 1999.
- [9] KRISHNA, S. H.; MANOHAR, B.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. "Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*". **J. Biotechnol.**, 87, 191-201, 2001a.
- [10] KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. "Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A Kinetic study". **Biochim. Biophys. Acta.**, 1547, 262-267, 2001b.
- [11] MARQUES, D.B.; PASTORE, G.M. "Produção de aromas naturais por microorganismos". **Bol. SBCTA.**, 33 (1), 80-185, 1999.
- [12] PINHEIRO, T.L.F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. 2006. 120f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Setor de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI. Erechim, 2006.
- [12] RAJENDRAN, A. *et al.* **Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries**. Brazilian archive of biology and technology, vol.52, no.1, Curitiba, Jan./Fev. 2009.
- [13] STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriology**, v. 168, p. 1070-1074, 1986.