

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

GABRIELLA SADAHO IGARASHI

**BIOTRANSFORMAÇÃO EMPREGANDO LIPASES LIGADAS AO
MICÉLIO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA

2018

GABRIELLA SADA KO IGARASHI

**BIOTRANSFORMAÇÃO EMPREGANDO LIPASES LIGADAS AO
MICÉLIO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao curso superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Machado Baron

Co-orientadora: Profa. Dra. Milena Martins Andrade

APUCARANA

2018



Ministério da Educação
**Universidade Tecnológica Federal do
Paraná**
Câmpus Apucarana
COLIQ – Coordenação do Curso
Superior de Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

Biotransformação empregando lipases ligadas ao micélio

por

Gabriella Sadako Igarashi

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado aos 21 dias do mês de novembro do ano de 2018, às 20 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Química, linha de pesquisa Química Orgânica, do Curso Superior de Licenciatura em Química da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela banca examinadora composta pelas professoras abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

Professora Dra. Alessandra Machado Baron – ORIENTADORA

Professora Dra. Patrícia Salomão Garcia – EXAMINADORA

Professora Dra. Silvana Fernandes Montanher – EXAMINADORA

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

*À minha mãe Tais,
que sempre incentivou minhas conquistas.
Às minhas irmãs Rafaella e Maria Clara,
que trouxeram mais vida e alegria durante esse período de trabalho.
Ao querido,
por tornar essa caminhada mais leve e não desistir de mim até
mesmo quando eu já teria desistido.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Alessandra Machado Baron, pela atenção e cuidado dedicados ao trabalho, sem você nada disso seria possível.

Aos “irmãos científicos” pelo auxílio no decorrer do trabalho nos momentos de desespero, obrigada pela ajuda e pelas risadas.

À minha família por embarcar comigo nessa aventura chamada trabalho de conclusão de curso.

*“Conheça todas as teorias,
domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana
seja apenas outra alma humana”*

Carl G. Jung

RESUMO

IGARASHI, G. S. **Biotransformação empregando lipases ligadas ao micélio**. 2018. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2018.

Lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio, oriundo de fermentação submersa, foram empregadas como catalisador em biocatálise. Os seguintes estudos foram realizados: a) Estabilidade à temperatura (40, 50 e 55 °C, 3 h) através da reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP); b) síntese do oleato de etila (Método de Lowry-Tinsley), com e sem co-solvente (hexano). Para o último caso, um planejamento experimental 2^3 (temperatura-T, massa do micélio-MM e Razão molar ácido: álcool-RM), com triplicata no ponto central, foi realizado. A atividade inicial do micélio foi calculada previamente ao estudo da estabilidade térmica ($2,71 \pm 0,27$ U mg⁻¹). O estudo da estabilidade térmica do micélio demonstrou perda enzimática de aproximadamente 20% para todas as temperaturas estudadas. A influência do co-solvente (hexano) no rendimento da síntese do oleato de etila pelo micélio foi positiva tendo como melhores resultados 90 (40°C; 1 g de micélio e RM de 1:1) e 97% (40°C; 1 g de micélio e RM de 1:3) de rendimento para os tempos de 24 e 48h respectivamente. Analisando-se a quantidade de energia elétrica, manutenção da atividade catalítica da enzima e cálculo da produtividade em éster ($36 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}/24 \text{ h}$ e $20 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$), a reação por 24 h foi mais viável. Assim, lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio podem ser uma interessante alternativa em relação às lipases imobilizadas, na síntese do oleato de etila e de outros ésteres, devido a sua preparação de baixo custo e alta atividade enzimática.

Palavras-chave: Biotransformação. Biomassa. Biocatalisador. Lipase.

ABSTRACT

IGARASHI, G. S. **Biotransformation using lipases attached to the mycelium.** 2018. 40 f. Course Completion Work (Licenciatura in Chemistry), Federal Technological University of Paraná. Apucarana, 2018.

Lipases of *Botryosphaeria ribis* EC-01 bound to the mycelium, from submerged fermentation, were used as catalysts in biocatalysis. Were studied : a) Stability at temperature (40, 50 and 55 ° C, 3 h) through the hydrolysis reaction of p-nitrophenyl palmitate (pNPP); b) Synthesis of ethyl oleate (Lowry-Tinsley method), with and without cosolvent (hexane). For the latter case, an experimental design 2^3 (T-temperature, mass of mycelium-MM and acid molar ratio: alcohol-MR) with triplicate at the central point was performed. The initial mycelial activity was calculated prior to the thermal stability study ($2.71 \pm 0.27 \text{ U mg}^{-1}$). The study of the thermal stability of the mycelium demonstrated enzymatic loss of approximately 20% for all temperatures studied. The influence of the co-solvent (hexane) on the yield of the ethyl oleate synthesis by the mycelium was positive with best results 90 (40°C; 1 g of mycelium and MR 1:1) and 97% (40°C; 1 g of mycelium and MR 1:3) yield for the times of 24 and 48h respectively. Analyzing the amount of electric energy, maintenance of the catalytic activity of the enzyme and calculation of the productivity in the ester ($36 \mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1} / 24 \text{ h}$ $20 \mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$), the reaction for 24 h was more viable. Thus, lipases of *Botryosphaeria ribis* EC-01 bound to the mycelium may be an interesting alternative to immobilized lipases, in the synthesis of ethyl oleate and other esters, due to their preparation of low cost and high enzymatic activity.

Keywords: Use of mycelium. Biotransformation. Biomass. Lipase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis máximos e mínimos para o planejamento fatorial 2^3	24
Tabela 2 – Comparação da atividade lipolítica do micélio (liofilizado) e da enzima presente no sobrenadante (fermentação submersa) pelo pNPP aquoso.....	26
Tabela 3 – Estabilidade térmica das lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 livre e imobilizada em CAC, CAC com glutaraldeído (GA) e CAC com EDC e glutaraldeído (GA) (3 h)	28
Tabela 4 – Resultados experimentais do delineamento fatorial 2^3 aplicado no estudo da síntese do oleato de etila, utilizando-se lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ligadas ao micélio.....	31
Tabela 5 – Valores calculados dos efeitos das variáveis principais e secundárias do delineamento fatorial 2^3 com repetição no ponto central em relação aos rendimentos da síntese do oleato de etila catalisada pela lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ligadas ao micélio.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais reações catalisadas por lipases	13
Figura 2 – Aplicações de lipases em diversos setores.	14
Figura 3 – Micélio após coleta do meio de cultura (a) e após secagem e trituração (b).	20
Figura 4 – Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila catalisada por lipases.	21
Figura 5 – Esquema da reação de esterificação (Quantificação por Lowry-Tinsley).	23
Figura 6 – Estudo da estabilidade térmica de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ligadas ao micélio (liofilizado) nas temperaturas de 40, 50 e 55°C (3h) com controle a temperatura ambiente. Atividade residual foi dosada através do método do <i>p</i> NPP aquoso.	27
Figura 7 – Efeito do co-solvente na síntese do oleato de etila catalisada pelas lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ligadas ao micélio. Condições para a reação com co-solvente: 10 mL hexano, 240 µL de ácido oleico e 130 µL de etanol (RM 1:3 ácido: álcool); sem co-solvente: 5 mL de etanol (240 µL de ácido oleico); 0,5 g de micélio; 50°C; 120 rpm.	29
Figura 8 – Valores calculados dos efeitos das variáveis principais e secundárias do delineamento fatorial 23 com repetição no ponto central em relação aos rendimentos da síntese do oleato de etila catalisada pelas lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ligadas ao micélio.	33
Figura 9 – Efeito da temperatura, 40°C(-1) e 50°C(+1); quantidade de Micélio (g), 0,5 g(-1) e 1 g(+1) e razão molar ácido/álcool 1:1(-1) e 1:3(+1) no rendimento da síntese do oleato de etila catalisada pelas lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ligadas ao micélio. (a) 24 h e (b) 48 h.	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1. LIPASES	13
3.2. FUNGOS DO GÊNERO <i>BOTRYOSPHERIA</i>	15
3.3. UTILIZAÇÃO DE LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. MICRORGANISMOS, CULTIVO E PRODUÇÃO DE LIPASES	19
4.2. PREPARAÇÃO DO MICÉLIO	20
4.3. REAÇÕES DE HIDRÓLISE UTILIZANDO LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO	20
4.4. ESTABILIDADE TÉRMICA	22
4.5. REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO DO OLEATO DE ETILA	22
4.5.1. Efeito da presença do co-solvente no rendimento da reação	22
4.5.2. Otimização da reação de esterificação	23
4.6. MÉTODO DE LOWRY-TINSLEY	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO MICÉLIO	26
5.2. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA	26
5.3. REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO	29
5.3.1. Efeito da presença de co-solvente no rendimento da reação	29
5.3.2. Otimização da reação de esterificação	30
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

As lipases (EC 3.1.1.3)* têm grande aplicação no setor biotecnológico porque são enzimas que catalisam inúmeras reações, dentre elas, a hidrólise de ésteres de ácidos graxos e reações de síntese realizadas *in vitro*, ou seja, fora do organismo vivo e em um ambiente aquo-restrito como esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise), interesterificação e aminólise (DUARTE et al., 2016; AOUF et al., 2014; KAZLAUSKAS et al., 1998). As de origem fúngica possuem boa estabilidade e especificidade tornando-as atrativas na indústria (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

A produção de enzimas microbianas envolve processos de fermentação submersa ou sólida. Para o primeiro caso, o mosto fermentado é separado da fase líquida por filtração ou centrifugação. As enzimas de interesse podem estar tanto nas células inteiras (biomassa/micélio/mosto), enzimas intracelulares como na fase líquida (extrato bruto), enzimas extracelulares. Na maioria dos casos, o extrato bruto é purificado, sendo a enzima concentrada e/ou imobilizada em suportes inertes. A biomassa além de poder ser empregada como fertilizantes e complemento de ração animal (SILVA, 2010; AMORIM, 2011), pode ser utilizada também em biotransformação (BIROLLI et al., 2015).

Até o momento, células inteiras (micélio) contendo lipases do fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 não foram empregadas em biotransformação. Entende-se por biotransformação, as reações químicas catalisadas por microrganismos ou preparações derivadas da biomassa (LEUERBERGER, 1990). Tendo em vista a possibilidade de aproveitamento da biomassa fúngica e analisando a possibilidade de catálise das lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio, o trabalho teve por finalidade estudar lipases ligadas ao micélio do fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01, através de reações de hidrólise de ésteres (palmitato de *p*-nitrofenila) e esterificação (oleato de etila).

*Seu número de acordo com a Comissão de Enzimas (número E. C., do inglês *Enzyme Commission*). <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Utilizar o micélio do fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 contendo lipases ligadas, produzido por fermentação submersa (FS), em reações com transferência de grupo acila (hidrólise de éster e esterificação).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

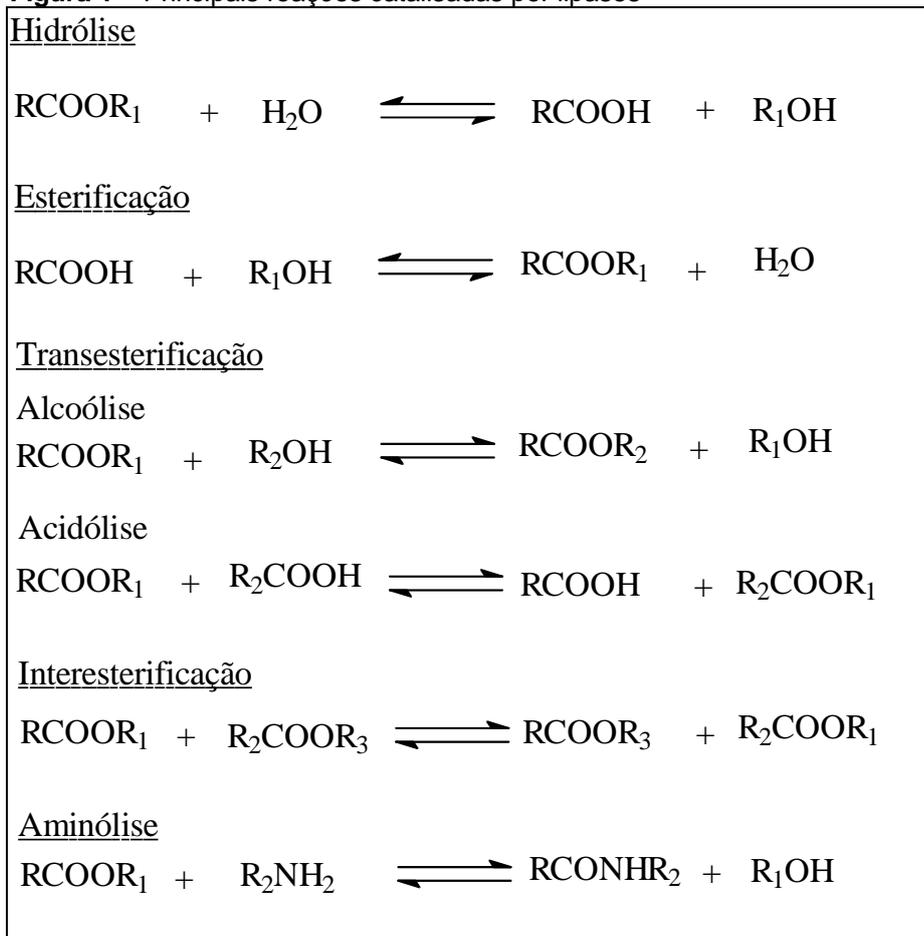
- I. Secar o micélio por liofilização, oriundo da produção de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa;
- II. Determinar a atividade lipolítica pelo método do *p*NPP (palmitato de *p*-nitrofenila) aquoso;
- III. Determinar a estabilidade térmica (3h) da lipase ligada ao micélio nas temperaturas de 40, 50 e 55°C;
- IV. Verificar a cinética de esterificação do oleato de etila, em etanol e hexano, empregando lipases ligadas ao micélio;
- V. Determinar o melhor solvente, etanol ou hexano, para a esterificação do oleato de etila;
- VI. Estudar os seguintes parâmetros na síntese do oleato de etila catalisada pelas lipases de *B. ribis* ligadas ao micélio com o melhor solvente: Efeito da razão molar ácido/álcool; concentração da enzima e temperatura.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. LIPASES

As lipases (triacilglicerol-acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) são carboxilesterases que catalisam a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa e reações de síntese como as esterificações e transesterificações, como mostra a Figura 1 (RODEVA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010). Estão dispostas na natureza em bactérias, fungos, leveduras, tecidos vegetais e animais tendo suas propriedades variáveis de acordo com a procedência.

Figura 1 – Principais reações catalisadas por lipases

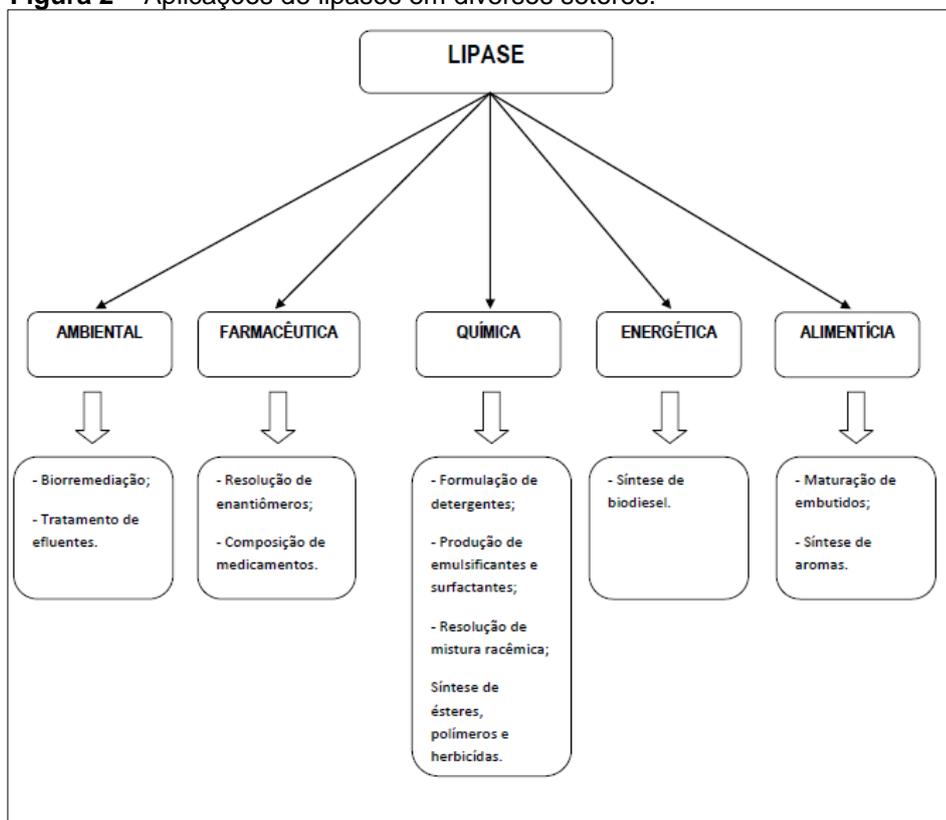


Fonte: Autoria própria (2018).

As principais fontes de obtenção para aplicação industrial são os microrganismos, devido à estabilidade e facilidade de aquisição se comparadas com fontes de origem animal, tornando sua produção mais pertinente e segura (CASTRO et al., 2004). Além das vantagens de obtenção que as lipases microbianas possuem, devido a sua fácil produção em massa, também chamam atenção especial para a indústria por sua atuação em faixa de pH de 6 a 8, estabilidade a temperaturas entre 30 e 55°C e especificidade quanto ao substrato, constituindo um grupo de valiosas enzimas com aplicações biotecnológicas (PERA et al., 2014).

Em virtude da ampla gama de reações em que atuam, das vantagens de obtenção e produção além das condições reacionais as lipases são aplicáveis em diversos setores industriais, principalmente no setor químico, para a formulação de detergentes, produção de emulsificantes e surfactantes, resolução de misturas racêmicas, síntese de ésteres, polímeros e herbicidas. Dentre as demais áreas aplicáveis de enzimas podemos destacar a ambiental, farmacêutica, alimentícia e energética exemplificada na Figura 2 (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012).

Figura 2 – Aplicações de lipases em diversos setores.



Fonte: Autoria própria (2018).

Dentre os microrganismos conhecidos como potenciais produtores de lipases destacam-se os fungos filamentosos que se diferem de fungos leveduriforme pela presença das hifas, que são filamentos de células crescentes em suas pontas que se dividem ao longo de todo o comprimento do fungo criando uma rede de fios denominada de micélio, responsável por expelir enzimas através de sua parede celular a fim de captar os nutrientes para a célula microbiana por meio da quebra do substrato lipídico em componentes polares mais facilmente absorvíveis além de crescerem em substratos simples e de baixo custo (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017).

3.2. FUNGOS DO GÊNERO *BOTRYOSPHAERIA*

Botryosphaeria ribis EC-01 foi preliminarmente selecionado como um bom produtor de lipases quando cultivado em diferentes óleos vegetais e glicerol através de fermentação submersa (FS) dentre nove isolados de *Botryosphaeria* spp. por ser endofítico e conhecido por secretar diferentes enzimas como, lipases, pectinas, beta-1,3-glucanases, celulasas, xilanases, amilases e inulinases. (CUNHA et al, 2003; MESSIAS et al., 2009).

As lipases são produzidas por meio de processos fermentativos classificados com relação ao modo de cultivo podendo ser em estado sólido (FES) ou líquido/submersa (FS). No geral podem ser descritos como métodos apropriados que fornecem ao microrganismo em questão os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, recebendo subsequentemente o inóculo que fermentará sob condições controladas que visam ao melhor desenvolvimento do microrganismo (BORZANI; AQUARONE; LIMA, 1975; PINTO, 2008).

Industrialmente, as lipases são produzidas principalmente por fermentação submersa, apresentando como característica principal a utilização de um meio de cultura líquido com nutrientes solúveis. Essa técnica possui grande facilidade de cultivo, pois a célula produtora se desenvolve homoganeamente dentro do meio fermentativo sob agitação constante garantindo a uniformidade do meio e possibilitando a transferência de calor, o que facilita o monitoramento de parâmetros do processo, tais como, pH e temperatura (WOLSKI, 2008).

3.3. UTILIZAÇÃO DE LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO

Quando produzidas por fermentação submersa, as lipases podem ser extracelulares (normalmente as empregadas na indústria), ou seja, que é secretada no meio de cultivo, e intracelular ou presente em células inteiras, neste caso, a enzima está no interior da célula ou na parede celular (CANELA-GARAYOA et al., 2014). Para os dois casos, a decisão quanto ao tipo de biocatalisador a ser empregado (enzima isolada ou célula inteira) e em forma (livre ou imobilizada, purificada ou não) depende de fatores, tais como o tipo de reação, se há cofatores a serem reciclados e a escala na qual a biotransformação será realizada (FABER, 2004).

A utilização de lipases ligadas ao micélio tem sido estudada desde 1979, sendo esse termo aplicado a todas as enzimas excedentes nas células após o processo de separação das células do meio de cultura, onde algumas enzimas estão localizadas no micélio de fungos filamentosos. Sua utilização vem ganhando destaque frente as intracelulares, por poderem ser utilizadas sem a necessidade de isolamento, purificação, imobilização e recuperação da enzima, reduzindo assim a perda da atividade enzimática pelo privilégio do uso direto, aumentando o interesse industrial por esse tipo de lipase, favorecendo a redução do custo global do processo (MAROTTI, 2016).

Apesar dos primeiros relatos da utilização de células inteiras contendo lipases terem ocorrido próximo há quarenta anos, ainda há poucos trabalhos sobre lipases associadas ao micélio ou parede celular. Para estas lipases naturalmente ligadas, a estrutura da célula pode atuar como uma matriz natural, semelhante ao processo de imobilização convencional onde é possível a diminuição da perda de atividade pela ação do solvente e a manutenção da atividade por mais tempo (ROMERO et al., 2007; WANG et al., 2007).

Com a finalidade de relatar o que a literatura tem descrito a respeito deste tipo de preparação de lipases, alguns trabalhos, onde lipases ligadas ao micélio foram empregadas em biotransformação serão apresentados no Quadro 1.

Canela-Garayoa et al, (2014) utilizou lipases ligadas ao micélio do fungo *Aspergillus flavus* para a síntese do acetato de (R)-1-feniletila preparado a partir do álcool quiral (R,S) 1-feniletanol. Para os melhores resultados, o excesso

enantiomérico (e.e) foi de 94,6% e 99% para o éster (R) e para o (S)-1-feniletanol respectivamente. Os mesmos autores prepararam laurato de etila com rendimento de 96% (24 h).

Zanotto et al (2009) utilizou micélio contendo lipases oriundos de fungos isolados das plantas *Piper aduncum*, *Manihot esculenta*, *Astrocaryum aculeatum*, *Bertholletia excelsa*, *Endopleura uchi* e *Theobroma cacao*, todas da região amazônica, para esterificação do oleato de pentila e linoleato de dodecila e reação de transesterificação entre o palmitato de p-nitrofenila e etanol (produção do palmitato de etila). Os melhores resultados foram obtidos para lipases ligadas ao micélio do fungo codificado como UEA_115 (tipo: fitoterápico; hospedeiro: *A. aculeatum*; lenço de papel: fruta) e UEA_007 (tipo: fitoterápico; hospedeiro: *T Cacao*; lenço de papel: fruta), 91% de rendimento na síntese do oleato de pentila e 98% de linoleato de dodecila, respectivamente (72 h). Para a reação de transesterificação, as lipases ligadas ao micélio do fungo UEA_007 apresentou melhor desempenho (87%, 72 h).

Xu et al, (2002) utilizou lipases ligadas ao micélio do fungo *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 para a síntese de ésteres de cadeia longa. Os melhores resultados foram obtidos para a esterificação do hexanoato de etila 96,5% de rendimento (72 h; 30°C). Os autores estudaram a reutilização do micélio e verificaram tempo de meia vida de 981 h.

Fukuda et al, (2002) utilizaram lipases de células inteiras (micélio) provenientes do fungo *Rhizopus oryzae* IFO 4697 para produzir biodiesel. O melhor rendimento, 83% foi obtido em 2,5 h com 50 células. Du et al (2010) utilizaram lipases ligadas ao micélio do mesmo fungo em sistemas de terc-butanol, hexano e sem solvente para produção de biodiesel obtendo o melhor rendimento com hexano próximo a 67% (24 h).

Quadro 1 – Aplicações de lipases ligadas ao micélio. (*) Produtividade em éster.

Microrganismo	Tipo de reação	Condições	Resultados principais	Referências
<i>Aspergillus flavus</i>	Transesterificação	25 mg de enzima; 0,5 mmol (R,S)-1-feniletanol; 1,0 mmol de acetato de isopropenila; 1 mL de tolueno; 24 h, 40°C.	e.e 94,6% (R)-1-feniletila 788 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ (éster)* ee 99% (S)-1-feniletanol	Solarte et. al (2014)
<i>Aspergillus flavus</i>	Esterificação	0,5 mL solução (0,125 mmol mL ⁻¹ ácido láurico; 0,250 mmol.mL ⁻¹ etanol em hexano), 20 mg de lipase; 24 h; 40°C.	96% 125 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ (éster)*	Solarte et. al (2014)
<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4697	Transesterificação	10 g de trioleína, 10 g de hexano, 3 g de solução tampão fosfato (pH 6,8), 0,55 g de metanol; 8% de micélio com base no peso do óleo; 35°C e 24h	67% 1,2 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ (éster)*	Du et al (2010)
(1) UEA_115 (2) UEA_007 (3) UEA_007	(1) Esterificação (2) Esterificação (3) Transesterificação	(1) oleato de pentila: 6,66 mmol de ácido oléico e n-pentanol, 30 mL hexano (2) linoleato de dodecila utilizou-se 0,5 mmols de ácido linoleico e dodecanol em 10 mL n-hexano (3) 1,25.10 ⁻² mmols de palmitato de p-nitrofenila e 5.10 ⁻² mols de etanol; 10 mL n-hexano Para todas: 50 mg lipase; 28°C; 200 rpm; 72 h	(1) 91% 1680 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ (éster)* (2) 98% 136 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ (éster)* (3) 87% 3 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ (éster)*	Zanotto et. al (2009)
<i>Rhizopus chinesis</i>	Esterificação	0,5 M de ácido hexanoico e etanol; 6 g.L ⁻¹ de enzima; 15 mL de heptano; 150 rpm; 30°C; 72 h	96,5% 1,15 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ (éster)*	Xu et. al (2002)
<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4697	Transesterificação	9,65 g de óleo de soja, 1,5 mL de uma solução tampão fosfato (pH 6,8) 0,1 M, 0,35 g de metanol e 50 células; 35°C; 2,5 h	80%	Fukuda et. al (2002)

Fonte: Autoria própria (2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMOS, CULTIVO E PRODUÇÃO DE LIPASES

As lipases ligadas ao micélio utilizadas neste trabalho foram provenientes do fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308). Para manutenção, o microrganismo foi mantido em meio BDA (batata, dextrose e ágar) inclinado a 4°C e repicados trimestralmente. Antes da fermentação submersa, *B. ribis* EC-01 foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel (1956, Quadro 2), glucose 1% (m/v), como fonte de carbono, e ágar 2% (m/v) incubadas a 28°C por 5 dias. A produção de lipases foi realizada segundo Andrade (2013), em fermentação submersa contendo 25 mL de solução aquosa com 0,6% (m/v) torta de soja, 2,8% (v/v) de glicerol PA em erlenmeyers de 125 mL (180 rpm, 28°C). O cultivo foi interrompido após 5 dias (máxima atividade lipolítica) sendo as células (micélio) separadas do extrato bruto por filtração.

Quadro 2 – Meio mínimo de sais de Vogel concentrado 50 vezes

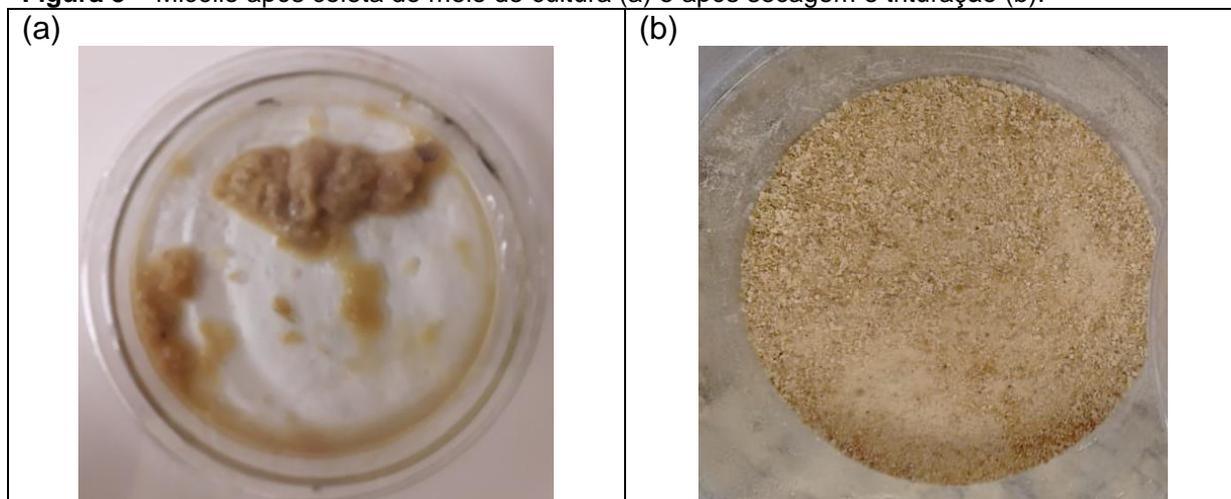
Sais	Quantidade
Solução de biotina 0,1 mg.mL ⁻¹	2,5 mL
Água destila qsp.	1000 mL
Solução de elementos-traços	5 mL
Ácido cítrico. 1 H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) 6 H ₂ O	1 g
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ 1 H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,05 g
Água destilada qsp.	100 mL
Citrato de sódio 5 ½ H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	10 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	5 g

Fonte: Adaptado de Andrade (2013).

4.2. PREPARAÇÃO DO MICÉLIO

O micélio foi coletado do meio de cultura (Figura 3a) por filtração simples, lavado com água destilada e seco por 48 h (liofilizador). Em seguida foi triturado a pó e armazenado em freezer (-4°C) (Figura 3b). As lipases ligadas ao micélio foram analisadas quanto a atividade de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) e esterificação do oleato de etila.

Figura 3 – Micélio após coleta do meio de cultura (a) e após secagem e trituração (b).



Fonte: Autoria Própria (2018).

4.3. REAÇÕES DE HIDRÓLISE UTILIZANDO LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO

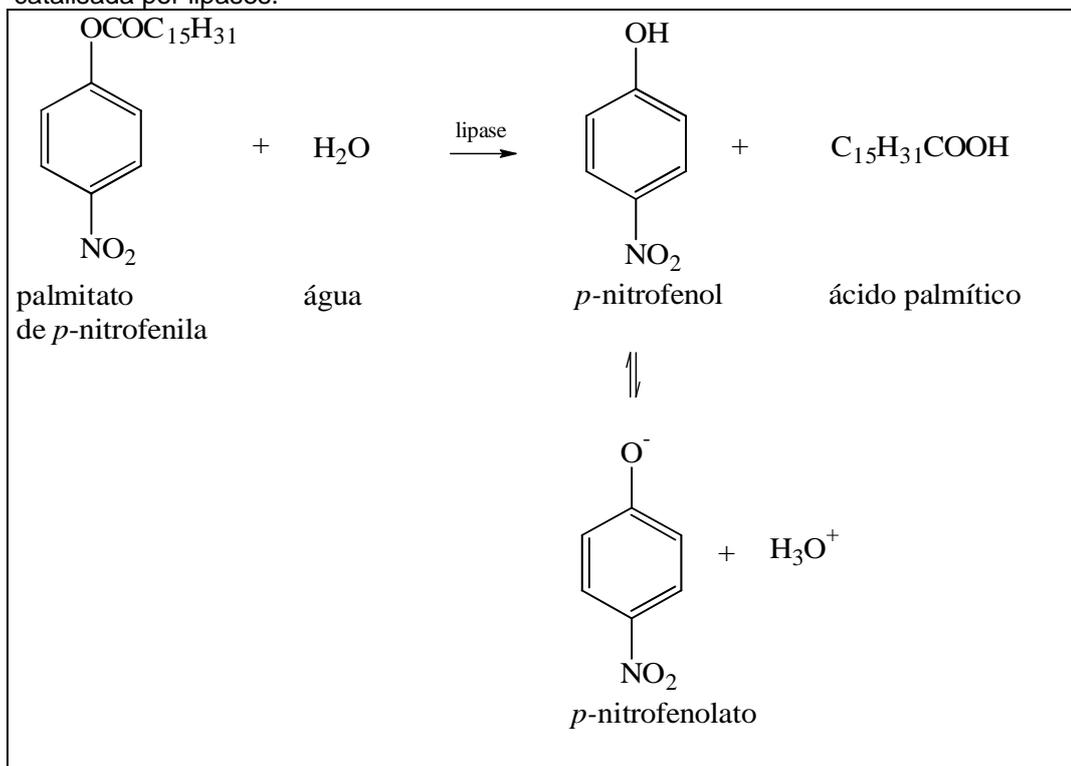
A hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) é um método espectrofotométrico inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979) que pode ser catalisada por lipases. Baseia-se na hidrólise do *p*NPP pela enzima (Figura 4), em meio aquoso contendo como surfactantes o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela é seguida por análise em comprimento de onda de 410 nm.

Misturou-se 1 mL da solução A contendo palmitato de *p*-nitrofenila (Sigma) em isopropanol (3 mg mL⁻¹) com 9 mL da solução B (2 g de Triton X-100, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0), lentamente e sob contínua agitação. A

mistura foi feita imediatamente antes da determinação da atividade, pois o substrato é instável quando em meio aquoso. Desta solução foram colocados 1 mL em cubeta estabilizada na temperatura a 55°C para a leitura do branco.

Para as reações de hidrólise do *p*NPP catalisada pelas lipases ligadas ao micélio, 5 mL de meio reacional (A+B) foram adicionados em erlenmeyers de 25 mL climatizados em banho termostático (55°C). A reação iniciou-se com a adição de 1 mg de micélio. A cinética das reações foram seguidas em diferentes intervalos de tempo (1 a 5 min) transferindo-se alíquotas de 1 mL para uma cubeta e simultânea leitura das absorvâncias em comprimento de onda de 410 nm.

Figura 4 – Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada por lipases.



Fonte: Autoria própria (2018).

Para o cálculo da atividade de hidrólise, a Equação 1 foi empregada, sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a liberação de 1 μmol de *p*-nitrofenol (*p*NP) por minuto. O coeficiente de extinção molar do *p*NPP, em pH 8,0, ($15 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a

absorbância obtida na leitura. A unidade final da atividade de hidrólise é U mg⁻¹ (U por mg de micélio). As reações foram feitas em triplicata.

$$A = \frac{C_{ang} \cdot V}{\varepsilon \cdot X_{enz}} \quad (1)$$

Sendo:

C_{ang} : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em minutos);

V: volume do meio reacional;

ε : coeficiente de extinção molar do pNPP a pH 8,0;

X_{enz} : massa do micélio (mg)/ volume (mL) para o extrato bruto.

4.4. ESTABILIDADE TÉRMICA

O micélio contendo lipases ligadas (10 mg) foi incubado nas temperaturas 40, 50 e 55°C por 3 h. A atividade residual de lipase foi realizada pelo método do pNPP (item 4.3). As reações foram feitas em triplicata.

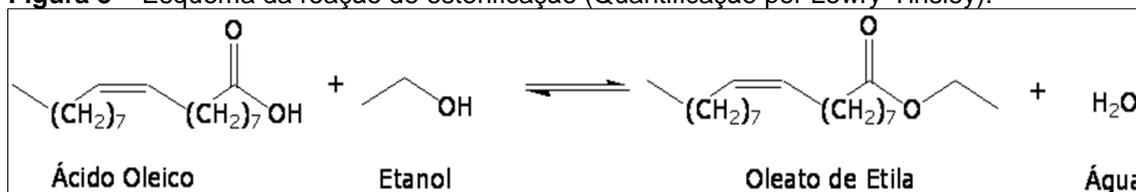
4.5. REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO DO OLEATO DE ETILA

4.5.1. Efeito da presença do co-solvente no rendimento da reação

Para verificar se as lipases ligadas ao micélio eram ativas em meio orgânico, a reação modelo (síntese do oleato de etila via esterificação, Figura 5) foi realizada em dois sistemas reacionais: contendo hexano (co-solvente) e o etanol (solvente principal). Para o primeiro caso, utilizou-se erlenmeyers de 25 mL contendo 0,5 g

de micélio, 10 mL de hexano, 240 μ L de ácido oléico, 130 μ L de etanol (RM 1:3) 50°C, 120 rpm, (24 e 48 h). No caso da síntese utilizando o etanol como solvente, o volume foi de 5 mL, 240 μ L de ácido oléico e a reação foi realizada nas mesmas condições citadas acima. O curso das reações foi seguido retirando-se alíquotas de 100 μ L em intervalos de 24 e 48 h. A determinação do rendimento em éster (%) foi feita pelo método de Lowry-Tinsley (item 4.6). As reações foram feitas em triplicata.

Figura 5 – Esquema da reação de esterificação (Quantificação por Lowry-Tinsley).



Fonte: Autoria própria (2018).

4.5.2. Otimização da reação de esterificação

Depois de selecionado o melhor meio reacional, isto é, o meio reacional onde houve maior rendimento em éster, os seguintes parâmetros foram estudados na conversão do éster: efeito da razão molar ácido: álcool; concentração da enzima e temperatura através de um delineamento 2^3 com repetição no ponto central (Tabela 1).

Os ensaios do delineamento fatorial foram feitos em Erlenmeyer de 25 mL em agitador orbital, a 120 rpm, usando 10 mL de hexano como cossolvente e quantidade suficiente de micélio contendo lipases para fornecer a concentração de enzima requerida no planejamento. A reação foi iniciada pela adição de ácido oleico (240 μ L) ao meio reacional contendo álcool etílico (50, 90 e 140 μ L), para os ensaios com razão molar ácido/álcool de 1:1, 1:2 e 1:3, respectivamente. Em intervalos de 24 e 48 h, amostras de 100 μ L do meio reacional foram coletadas e analisadas pelo método de Lowry-Tinsley (item 4.6). Uma curva padrão foi construída usando ácido oleico sob as mesmas condições. O rendimento em éster foi calculado a partir do consumo de ácidos graxos livres.

Para medir a influência de cada variável na reação, foi calculada a contribuição de cada variável na formação do éster. Para tal, empregou-se o esquema de sinais da Tabela 1, atribuindo-se a cada valor de rendimento do éster o sinal correspondente a cada uma das condições estudadas. Em seguida, procedeu-se a somatória dos valores respeitando os sinais atribuídos e o resultado foi dividido por quatro (b^2), o que corresponde ao número de contrastes.

$$EP = 2 \frac{[y^{+1} - y^{-1}]}{b^2} \quad (2)$$

Sendo:

EP = Efeitos principais;

y^+ = níveis dos parâmetros + (50°C; 1g; RM 1:3);

y^- = níveis dos parâmetros - (40°C; 0,5 g; RM 1:1);

$b = 2$

Tabela 1 – Níveis máximos e mínimos para o planejamento fatorial 2^3 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
X_1 - Temperatura (T, °C)	40	45	50
X_2 - micélio (MM, g)	0,5	0,75	1
X_3 - RM ^a ácido:álcool	1:1	1:2	1:3

Fonte: Autoria própria (2018).

^aRM: razão molar

Para as reações onde os rendimentos foram máximos, fez-se o cálculo da produtividade em éster. Expressa por μmol de éster produzido por hora de reação e por grama de micélio.

4.6. MÉTODO DE LOWRY-TINSLEY

O método (LOWRY e TINSLEY, 1976) foi utilizado para quantificar indiretamente o teor de ésteres formados, a partir do teor residual de ácido oléico produzido durante a síntese de ésteres catalisada pelas lipases de *B. ribis* ligadas ao micélio. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado, formado entre os íons Cu^{2+} e os ácidos graxos livres solúveis em fase orgânica, em comprimento de onda de 715 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO MICÉLIO

Na Tabela 2 é possível observar que a atividade total das lipases de *B. ribis* do sobrenadante é aproximadamente igual à do micélio. Aliado a paridade da atividade lipolítica e ao fato da massa por frasco fermentado ser demasiadamente reduzida se comparada ao volume utilizado por frasco fermentado, o micélio ainda apresenta vantagens pela sua utilização direta evidenciando o aproveitamento da biomassa em processos de biotransformação (ANDRADE; CORTEZ; CASTRO, 2017; FUKUDA et al., 2002 e SOLARTE et al., 2014). O resultado obtido na atividade lipolítica do micélio liofilizado apresentou-se auspicioso podendo ser uma alternativa para dobrar a atividade e dar um novo destino para o micélio que atualmente é descartado ou utilizado como complemento de rações.

Tabela 2 – Comparação da atividade lipolítica do micélio (liofilizado) e da enzima presente no sobrenadante (fermentação submersa) pelo pNPP aquoso.

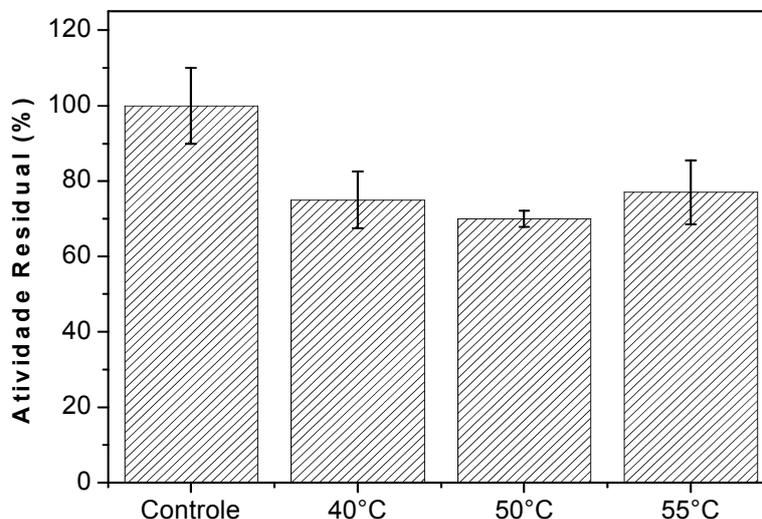
Balanço da atividade lipolítica por frasco fermentado			
Atividade do sobrenadante (1) (U mL ⁻¹)	47,6 ± 1,63	Atividade do micélio seco (2) (U mg ⁻¹)	2,71 ± 0,27
V por frasco fermentado (1) (mL)	25	Massa por frasco fermentado (2) (g)	0,4745 ± 0,04
Atividade total (1) (U)	1190	Atividade total (2) (U)	1233,7

Fonte: Autoria própria (2018).

5.2. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA

As lipases de *B. ribis* ligadas ao micélio apresentaram aproximadamente 20% de perda na atividade enzimática para as três temperaturas estudadas (40, 50 e 55°C) como observadas na Figura 6.

Figura 6 – Estudo da estabilidade térmica de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio (liofilizado) nas temperaturas de 40, 50 e 55°C (3h) com controle a temperatura ambiente. Atividade residual foi dosada através do método do pNPP aquoso.



Fonte: Autoria própria (2018).

Andrade (2013) estudou a estabilidade térmica de lipases de *B. ribis* presentes no extrato bruto da fermentação submersa e na forma imobilizada, nas mesmas condições experimentais. Para a enzima livre (presente no sobrenadante), observou aproximadamente 10% de perda da atividade enzimática na temperatura de 40°C e 20% de perda para as temperaturas de 50 e 55°C, resultados muito próximos aos obtidos para a estabilidade das lipases de *B. ribis* ligadas ao micélio (presente trabalho). Em se tratando de lipases de *B. ribis* imobilizadas, os seguintes suportes foram estudados por Andrade (2013): CAC (carvão ativado de coco), CAC com glutaraldeído (GA), funcionalizado com EDC (1-etil-3(dimetilaminopropil)carbodiimida) e glutaraldeído (GA) (Tabela 3). A estabilidade foi maior para o suporte CAC (97%, 40°C) e todas as demais condições estudadas mostraram perda da atividade catalítica superior a 50%.

Tabela 3 – Estabilidade térmica das lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 livre e imobilizada em CAC, CAC com glutaraldeído (GA) e CAC com EDC e glutaraldeído (GA) (3 h)

Lipase	Atividade Residual (%)
Livre 40°C	10
Livre 50°C	20
Livre 55°C	20
Imobilizada em CAC a 40°C	97
Imobilizada em CAC a 50°C	50
Imobilizada em CAC a 55°C	45
Imobilizada em CAC com GA a 40°C	20
Imobilizada em CAC com GA a 50°C	20
Imobilizada em CAC com GA a 55°C	8
Imobilizada em CAC funcionalizado com EDC e GA a 40°C	20
Imobilizada em CAC funcionalizado com EDC e GA a 50°C	20
Imobilizada em CAC funcionalizado com EDC e GA a 55°C	5

Fonte: Adaptado de Andrade (2013)

Diferentemente das lipases extracelulares, geralmente utilizadas industrialmente, as lipases ligadas ao micélio podem ser utilizadas de modo direto, ou seja, sem a necessidade dos processos de isolamento, purificação, imobilização e recuperação das enzimas, pois estas enzimas estão ligadas naturalmente à estrutura da célula, levando à diminuição da perda enzimática ao longo de todos os processos mencionados. Conseqüentemente, a utilização das lipases ligadas ao micélio reduz o custo global de produção de enzimas sendo este um aspecto significativo para a sua aplicação em larga escala (ANDRADE; CORTEZ; CASTRO, 2017; MAROTTI, 2016).

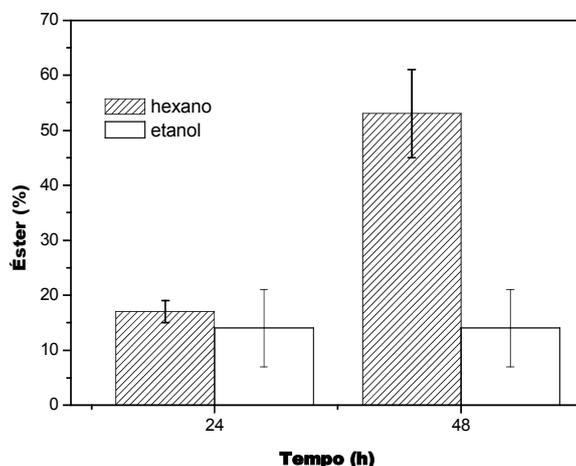
5.3 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO

5.3.1 Efeito da presença de co-solvente no rendimento da reação

O efeito do co-solvente (hexano) na síntese do oleato de etila pelas lipases de *B. ribis* EC-01 ligadas ao micélio apresentou rendimento superior ao sistema reacional sem co-solvente como apresenta a Figura 7. Essa melhora no rendimento pode ser explicada pelo fato de que enzimas desnaturam-se na presença de um meio com excesso de álcool.

Analisando-se os tempos de rendimento em éster utilizados, o rendimento em éster em 24 h é praticamente o mesmo para ambos os meios reacionais, enquanto que, no tempo de 48 h houve um aumento extremamente significativo se comparado com o tempo de 24 h bem e comparando os rendimentos entre dos meios reacionais, o meio com hexano (co-solvente) apresentou rendimento mais considerável se comparado com o meio sem solvente dado que as lipases ficaram mais tempo em contato com o meio reacional produzindo maior porcentagem de éster do que em 24 h aliado ao fato de não haver um excesso de álcool que pudesse desnaturá-la ou diminuir a sua atividade catalítica.

Figura 7 – Efeito do co-solvente na síntese do oleato de etila catalisada pelas lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio. Condições para a reação com co-solvente: 10 mL hexano, 240 µL de ácido oleico e 130 µL de etanol (RM 1:3 ácido: álcool); sem co-solvente: 5 mL de etanol (240 µL de ácido oleico); 0,5 g de micélio; 50°C; 120 rpm.



Fonte: Autoria própria (2018).

Este resultado já era esperado, pois a utilização de solventes polares pode diminuir a atividade catalítica da enzima devido à interação solvente-enzima, que altera a conformação nativa da proteína pela ruptura das ligações de hidrogênio. Além disso, pode ocorrer ainda a interação direta com a água essencial em torno da molécula da enzima, pois solventes polares são capazes de absorver água e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação (MIAO et al., 2018; VERDASCO-MARTÍN et al., 2016). Baseado nos resultados acima, os próximos experimentos foram realizados em presença de co-solvente (hexano).

5.3.2. Otimização da reação de esterificação

Depois de realizados os estudos prévios de síntese do oleato de etila, foram testados os efeitos dos parâmetros temperatura, concentração da enzima e razão molar ácido/álcool na reação de síntese do éster, através de um delineamento fatorial 2^3 .

A Tabela 4 apresenta os resultados experimentais do delineamento fatorial aplicado no estudo da síntese do oleato de etila, bem como, as variáveis e níveis estudados.

Com base nos resultados obtidos para o ponto central (Tabela 4, experimento 5 realizado em triplicata), foi possível calcular o desvio padrão para a conversão de éster, que foi de ± 4 (24 h) e $\pm 1,3$ (48 h), que também são válidos para as demais respostas do delineamento. Um efeito será tanto ou mais significativo, quanto maior for a diferença entre o desvio-padrão obtido e o valor encontrado para o efeito.

A Tabela 5 e a Figura 8 apresentam os efeitos das variáveis, calculados a partir dos resultados experimentais da Tabela 4 e da Equação 2. Os resultados do delineamento foram interpretados em função da conversão em éster (24 e 48 h).

Tabela 4 – Resultados experimentais do delineamento fatorial 2^3 aplicado no estudo da síntese do oleato de etila, utilizando-se lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Médio (0)	Superior (+1)
X ₁ – Temperatura (T, °C)	40	45	50
X ₂ – Micélio (MM, g)	0,5	0,75	1
X ₃ – RM ácido/álcool	1:1	1:2	1:3

Experimento	Temperatura (°C)	Micélio (g)	RM ^a Ácido/álcool	Rendimento após 24 h (%)	Rendimento após 48 h (%)
1	40	1 g	1:3	79	97
2	40	0,5 g	1:3	54	82
3	50	1 g	1:1	84	89
4	50	0,5 g	1:1	75	93
5 ^b	45	0,75 g	1:2	78 ± 4	95 ± 1,3
6	50	1 g	1:3	68	94
7	40	0,5 g	1:1	70	89
8	50	0,5 g	1:3	15	57
9	40	1 g	1:1	90	92

a) RM = razão molar. A concentração do ácido oleico em cada experimento foi de 95 mmol/L

b) Experimento 5 realizado em triplicata. O desvio padrão relativo para este experimento foi de ± 4 (24 h) e 1,3 (48 h).

Fonte: Autoria própria (2018).

De acordo com os valores calculados dos efeitos das variáveis principais (Tabela 5) é possível observar que as três variáveis analisadas (Temperatura, Unidades Totais e Razão Molar Ácido/Álcool) apresentaram influência nas respostas monitoradas, pois os valores dos efeitos foram superiores ao desvio-padrão característico das correspondentes variáveis-resposta. O efeito individual mais significativo foi a quantidade de micélio (g), que representa a quantidade de catalisador (lipase). Quando a quantidade de micélio é alterada do nível menos (0,5 g) para o nível mais (1 g), o sistema apresenta um aumento de 27(24 h) e 13 (48 h)

pontos percentuais no rendimento, como esperado, pois o aumento do catalisador tende a diminuir o tempo de reação requerido. No entanto, muitas vezes por razões econômicas, nem sempre a maior concentração possível deve ser usada (CRUZ et al., 2018). Desta forma, para maximizar a resposta, levando-se em consideração apenas o parâmetro quantidade de enzima, valores elevados são recomendados.

Tabela 5 – Valores calculados dos efeitos das variáveis principais e secundárias do delineamento fatorial 23 com repetição no ponto central em relação aos rendimentos da síntese do oleato de etila catalisada pela lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio.

Variáveis	Efeitos	
	24 h	48 h
Temperatura (°C)	-13	-7
Micélio (MM, g)	+27	+13
RM ^a ácido:álcool	-26	-9
Temperatura (°C) x MM	+4	3,7
Temperatura x RM ácido/álcool	-12	-7
MM x RM ácido/álcool	+12	+13
Temperatura (°C) x MM x RM ácido/álcool	+10	+7

^aRM: razão molar

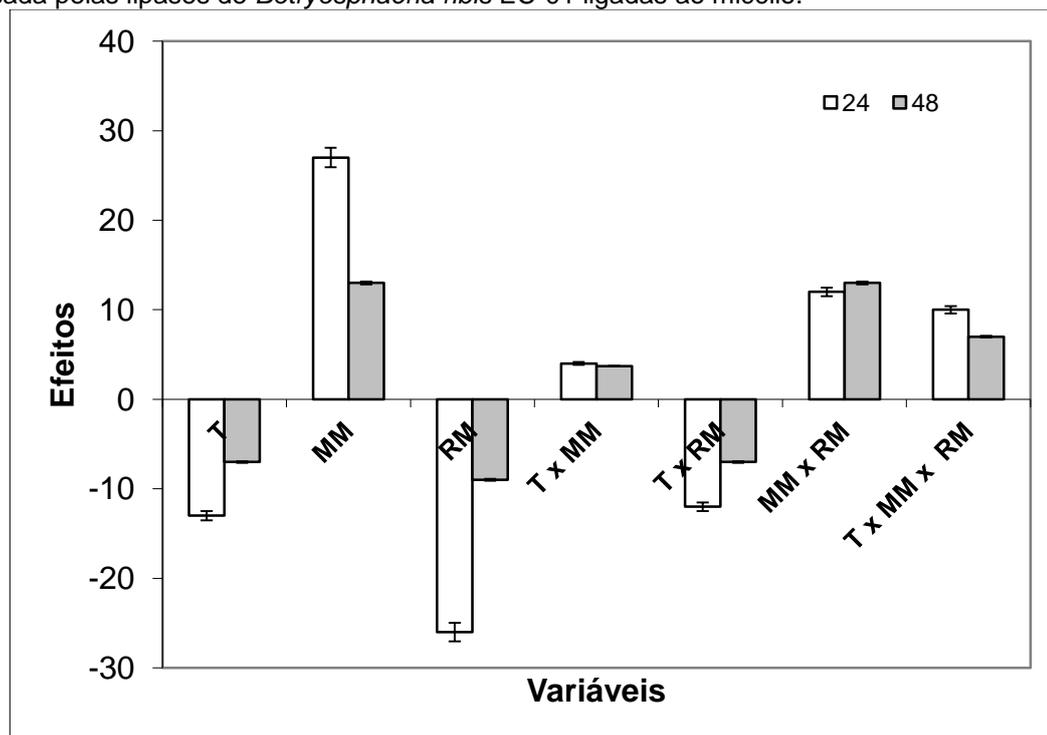
Fonte: Autoria própria (2018).

O segundo efeito individual mais significativo foi o parâmetro da Razão molar ácido/álcool, que representa a quantidade de etanol utilizado em relação à concentração do ácido. Para este fator foi verificado uma queda de -26 e -9 pontos percentuais no rendimento da reação para os tempos de 24 e 48 horas, como já era previsto, pois quantidades muito elevadas de álcool tendem a inibir ou até mesmo desnaturar a enzima (RATHOD; KHAN; JADHAV, 2015), reduzindo sua eficiência catalítica. Sendo assim, o efeito da Razão Molar ácido/álcool apresentou efeito negativo sobre o rendimento da esterificação.

Assim como o efeito individual do parâmetro da Razão Molar ácido/álcool, o parâmetro da Temperatura também apresentou declínio no rendimento da reação, sendo verificada uma queda de -13 e -7 pontos percentuais. Este resultado é comum em reações catalisadas por enzimas uma vez que o aumento da temperatura pode provocar a desnaturação da enzima, acarretando na diminuição do rendimento e da atividade enzimática (LIU et al., 2018; ABDULLAH et al., 2009). Sendo assim, o

efeito da temperatura também apresentou efeito negativo sobre o rendimento da esterificação.

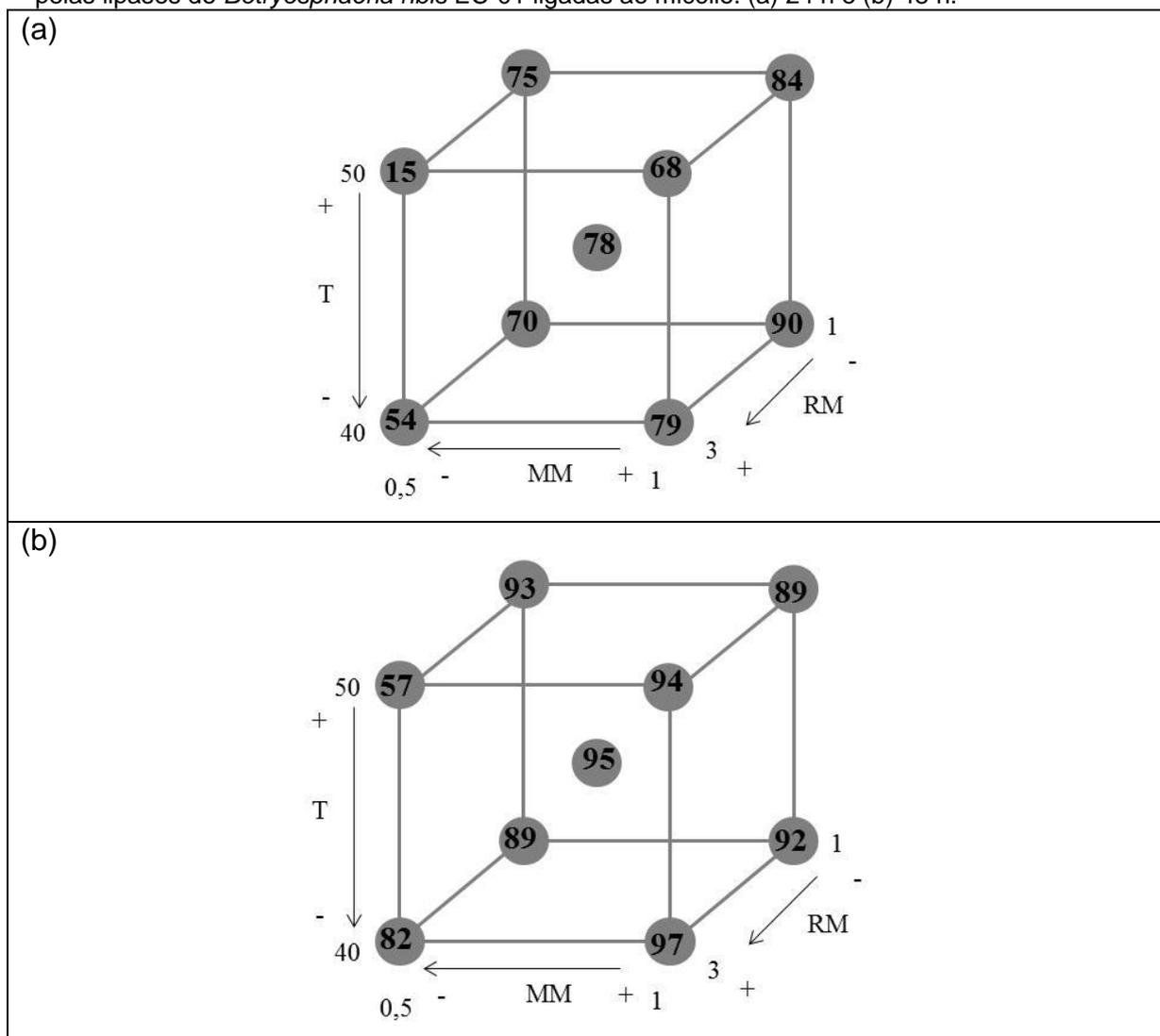
Figura 8 – Valores calculados dos efeitos das variáveis principais e secundárias do delineamento fatorial 23 com repetição no ponto central em relação aos rendimentos da síntese do oleato de etila catalisada pelas lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio.



Fonte: Autoria própria (2018).

Analisando-se os efeitos secundários, ou seja, aqueles resultantes da interação entre duas variáveis, verificam-se valores significativos para a interação T x RM (-12/24 h e -7/48 h); MM x RM (+12/24 h e +13/48 h) e T x MM x RM (+10/24 h e +7/48 h), ou seja, o efeito sinérgico foi relevante, pois são superiores ao desvio-padrão calculado apresentado na Tabela 4. Para facilitar a compreensão da análise, uma figura geométrica do sistema envolvendo as variáveis e suas respostas são apresentadas na Figura 9a (24 h) e 9b (48 h).

Figura 9 – Efeito da temperatura, 40°C(-1) e 50°C(+1); quantidade de Micélio (g), 0,5 g(-1) e 1 g(+1) e razão molar ácido/álcool 1:1(-1) e 1:3(+1) no rendimento da síntese do oleato de etila catalisada pelas lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio. (a) 24 h e (b) 48 h.



Fonte: Autoria própria (2018).

Avaliando-se a tendência das respostas, verifica-se no cubo da Figura 8a ponto de máxima (vértice inferior direito da face de trás, rendimento de 90%), atingido por uma temperatura de 40°C, quantidade de enzima de 1 g e RM 1:1. Quando a síntese é realizada em um período de 48 h (8b), o ponto de máxima (vértice inferior direito da face frontal, rendimento de 97%) é atingido nas condições 40°C, 1 g de micélio, porém com RM 1:3. Analisando a quantidade de energia

elétrica, manutenção da atividade catalítica da enzima, excesso de álcool (RM 1:3) e cálculo da produtividade em éster ($36 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}/24 \text{ h}$ e $20 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$), a reação por 24 h (Experimento 9) foi mais viável.

A utilização de lipases ligadas ao micélio aplicadas em biocatálise são pouco relatadas na literatura, desse modo, algumas comparações serão realizadas com os trabalhos apresentados no Quadro 1 que mais assemelham-se às condições utilizadas no presente trabalho.

Xu et al (2002) obtiveram rendimento de 96,5% e produtividade de $1,15 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ para a síntese do hexanoato de etila, ou seja, à produtividade foi inferior ao resultado obtido neste trabalho ($36 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$). Solarte et al (2014) e Zanotto et al (2009) obtiveram nas reações de esterificação (laurato de etila e oleato de pentila respectivamente) rendimento de 96% e 91% e produtividade em éster de $125 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ e $1680 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$, respectivamente, sendo portanto resultados superiores ao valor obtido no trabalho exposto ($36 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$). Vale salientar que o presente trabalho está utilizando pela primeira vez lipases de *B. ribis* ligadas ao micélio liofilizado e os estudos realizados não estão completamente otimizados, experimentos de desejabilidade (complementando o planejamento experimental realizado) podem ser utilizados futuramente para melhorar a produtividade em éster.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que lipases ligadas ao micélio do fungo *B. ribis* EC-01 perdem aproximadamente 20% da atividade enzimática para as três temperaturas analisadas (40, 50 e 55°C). Na presença do co-solvente hexano apresentou melhor produtividade em éster sendo os melhores resultados obtidos nas condições de 40°C; 1g de micélio; RM 1:1 (24h) e 1:3 (48h) onde ao analisar a quantidade de energia elétrica, manutenção da atividade catalítica da enzima, excesso de álcool (RM 1:3) e cálculo da produtividade em éster ($36 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}/24 \text{ h}$ e $20 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$), a reação por 24 h foi mais viável.

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser considerados promissores e contribuíram para o estudo da utilização de lipases ligadas ao micélio aplicadas em biocatálise e biotransformação.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, A. Z.; SULAIMAN, N. S.; KAMARUDDIM, A. H. Biotacalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**. v. 44, p. 263-270, 2009.

AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal**. Itapetininga, 2011. 77f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos/ Engenharia de Processos de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetininga, 2011.

ANDRADE, G. S. S.; CORTEZ D. V.; CASTRO, H. F. Potencial catalítico de lipases ligadas ao mciélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**. v. 40, p. 85-96, 2017

ANDRADE, M. M. **Produção e imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e aplicações**. 2013. 215 f. Tese (Doutorado em Química)- Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

AOUF, C. et al. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. **Green Chem**. v. 16, p. 1740 -1754, 2014.

BIROLLI, W. G. et al. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview . **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 481–510, 2015.

BORELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 20774 - 20840, 2015.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. **Tecnologia das Fermentações**. Vol. 1, São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1975.

CANELA-GARAYOA, R. et al. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 78-83, 2014.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

COLLA, L. M., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **CIATEC – UPF**, v. 4, p. 1-14, 2012.

CORTEZ, D. V., CASTRO, H. F., ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2017.

COSTA, B. Z. **Produção de lipases e lacases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 e *Botryosphaeria rodina* MAMB-05 sob fermentação em fase sólida, em tortas de soja, milho, mamona e azeitona.** 2008. 106 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química, CCE) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

CRUZ, M. et al. Enzymatic esterification of acid oil from soapstocks obtained in vegetable oil refining: effect of enzyme concentration. **Renewable Energy**. v. 124, p. 165-171, 2018.

CUNHA, M. A. et al. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 385-392, 2003.

DU, W. et al. Dependence on the properties of organic solvent: Study on acyl migration kinetics of partial glycerides. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5737-5742, 2010.

DUARTE, J. G.; LEONE-IGNACIO, K.; DA SILVA, J.A.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. FREIRE, D.M.G. Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography. **Fuel**. v. 177, p. 123–129, 2016.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry.** Berlim Springer-Verlag, v. 8, p. 454, 2004.

FUKUDA, H. et al. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 157-165, 2002.

KAZLAUSKAS RJ, BORNSCHEUER UT. Biotransformations with Lipases. In: Rehm H-J, Reed G, editors. **Biotechnology: biotransformations I**, 2th ed., vol. 8a. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1998, p. 37 – 191.

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

LIU, Y. et al. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. **Process Biochemistry**. v. 45, p. 1176-1180, 2010.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. **Rapid** colorimetric determination of free fatty acids. **J. Am. Oil Chem. Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MAROTTI, B. S. **Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação na hidrólise de óleos vegetais**. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

MESSIAS, J. M. **Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono**. 2008, 229 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

MIAO, C. et al. Lipase immobilization on amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. **Fuel**. v.224, p. 774-782, 2018

PERA, L. M. et al. Activity and stability of lipase preparations from *Penicillium corylophilium*: potential use in biocatalysis. **Chemical Engineering Technology**, v. 37, n. 11, p. 1987-1992, 2014.

PINTO, M. H. **Produção de biosurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais**. Rio Grande, 2008, 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

RATHOD, V. K.; KHAN, N. R.; JADHAV, S. V. Lipase catalyzed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: Optimisation and kinetic studies. **Elsevier**. v. 27, p. 522-529, 2015.

RODEVA, M., HEMKEMEIER, M., COLLA, L. C. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

ROMERO, M. C.; BAIGORI, M. D.; PERA, M. L. Catalytic properties of myceliumbound lipases from *Aspergillus niger* MYA 1 35. **Applied Microbiology. Biotechnology**, v. 76, p. 1067-1069, 2007.

SILVA, T. A. C. **Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases produzidas pelo fungo *Cercospora kikuchii***. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2010.

SING, A. K.; MUKHOPADHAYA, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486-520, 2012.

SOLARTE, C. et al. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 100, p. 78-83, 2014.

VERDASCO-MARTÍN, C. M. et al. Effect chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**. v. 111, p. 76-86, 2016.

WANG, D. Synthetic activity enhancement of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* by pretreatment with isooctane. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, p. 1-8, 2007.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WOLSKI, E. **Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium sp.* livre e imobilizado**. 2008, 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2008.

XU, Y. et al. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, p. 29-37, 2002.

ZANOTTO, S. et al. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from amazonian fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1046-1059, 2009.