UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

| Peptidases e lipases produzidas pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> : caracterização e microencapsulação por <i>spray drying</i> |
|---|
| |
| Tamara Ângelo de Oliveira Santos |

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por *spray drying*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Tamara Ângelo de Oliveira Santos

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

ÂNGELO, T.

Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por *spray drying*

MESTRADO FCFRPUSP 2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ângelo, Tamara

Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por *spray drying*

65 p., 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Cabral, Hamilton

1. Biotecnologia 2. Enzimologia 3. Bioencapsulação

FOLHA DE APROVAÇÃO

| Tamara | Ângelo | de | Olivei | ra San | itae |
|------------|---------|----|--------|--------|------|
| I allial a | Allgelo | ue | Ollvei | ra Sar | เเบร |

Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por *spray drying*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Aprovado em:

Banca Examinadora

| Prof. Dr | | |
|--------------|-------------|--|
| Instituição: | Assinatura: | |
| Prof. Dr | | |
| Instituição: | Assinatura: | |
| Prof. Dr | | |
| Instituição: | Assinatura: | |

Dedicatória

Dedico a meus pais, Alexandre e Margarete, exemplos de dedicação, fé e perseverança.

Agradecimentos

Antes de tudo, e sempre, agradeço a Deus por sua infinita misericórdia e incontáveis demonstrações de cuidado e amor. A Ele consagro tudo o que tenho, o que sou e o que serei.

Meu pai, minha mãe, Pinho e Dindô, muito obrigada por me apoiarem nos meus sonhos e planos, por me ajudarem a suportar a distância e as dificuldades e por, de alguma maneira, sempre me acompanharem, aonde quer que eu vá. Vocês são fundamentais sempre!

Aos meus avós, tios e primos, agradeço por todo carinho e pelas incansáveis orações. Vocês fazem parte da minha vida em todos os momentos. Tia Sueid e tio Jorge, muito obrigada pelo apoio na fase final do meu mestrado – o cuidado de vocês foi muito importante para tornar a escrita deste trabalho possível.

Eleni, minha querida, você me acolheu como filha e eu nunca me esquecerei de tudo que fez e tem feito por mim. Te carrego no coração.

Aos irmãos da igreja, declaro meu amor e gratidão pelas orações e por terem me recebido em suas vidas e em suas casas como uma verdadeira família. "Oh! Como é bom e agradável viverem unidos os irmãos". Não posso imaginar minha vida sem vocês.

Professor Hamilton e Professor Luis, sou grata a vocês por toda orientação e ensinamento acadêmico, mas também agradeço por todos os momentos de descontração e de aprendizado pra vida. Vocês são sensacionais!

Ana, Andrezza, Gabriel, Nathalia, Rafael, Roni, Suellen e Youssef, trabalhar com vocês foi um prazer! Nossos experimentos e momentos científicos foram ainda melhores pelo apoio, companheirismo e gargalhadas que sempre nos acompanharam. Muito obrigada por extrapolarem nossa convivência para além das quatro paredes do laboratório e tornarem esses dois anos inesquecíveis!

A Bia, Cenzi, Luciana, Marcela, Rodrigo e Simone, agradeço por estarem sempre dispostos a ajudar, tirar dúvidas e por tornarem os dias de trabalho mais agradáveis, com tanta generosidade e delicadeza.

Bárbara, Gabriela, Kariane, Mariana, Rebeca e Talita, vocês foram uma das melhores descobertas que fiz na USP! Obrigada por tornarem Ribeirão Preto um lugar melhor pra viver! Já morro de saudade...

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.

Eclesiastes 3:1-8

RESUMO

ÂNGELO, T. **Peptidases e lipases produzidas pelo fungo** *Fusarium oxysporum***:** caracterização e microencapsulação por *spray drying*. 2012. 65 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Duas variações de resíduo agroindustrial foram analisadas como meio de cultura para o bioprocesso de fermentação semissólida pelo fungo Fusarium oxysporum, com o objetivo de obter a melhor produção de peptidases e lipases. Essas enzimas foram microencapsuladas por spray drying, visando garantir sua estabilidade e investigar outros prováveis benefícios obtidos pela técnica. A utilização de planejamento experimental permitiu analisar os efeitos e interações entre as variáveis operacionais do processo (temperatura de secagem, proporção de adjuvantes e relação entre adjuvantes). A caracterização bioquímica e físico-química do extrato enzimático e das micropartículas também foram estudadas. O emprego de farelo de trigo como substrato demonstrou maior produção enzimática que o uso de farelo de algodão. A fermentação produziu uma serinopeptidase e uma lipase, ambas com característica alcalina, com alta estabilidade em ampla faixa de pH e certa estabilidade em diferentes temperaturas. Para ambas as enzimas, observou-se modulação positiva da atividade frente à maioria dos íons estudados e forte inibição pelo surfactante SDS, enquanto a lipase demonstrou superatividade frente a CTAB. A caracterização enzimática permite sugerir a aplicação dessas enzimas na formulação de detergentes enzimáticos, indústria de couro, indústria de papel, agroquímicos, síntese de biopolímeros e biodísel. No processo de microencapsulação, a temperatura foi a variável operacional mais importante para a estabilidade, enquanto a quantidade de adjuvantes em relação à quantidade de extrato enzimático influenciou nas condições de manipulação. O estudo demonstrou que a técnica de microencapsulação por spray drying resultou em grande benefício no armazenamento das enzimas, por aumentar consideravelmente sua estabilidade e melhorar as propriedades físicas do extrato.

Palavras-chave: biotecnologia, enzimologia, bioencapsulação

ABSTRACT

ÂNGELO, T. Peptidases and lipases produced by the fungus *Fusarium oxysporum*: characterization and microencapsulation by *spray drying*. 2012. 65 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Two variations of agroindustrial residue were analyzed as culture medium for the bioprocess of solid-state fermentation by the fungus Fusarium oxysporum, in order to achieve the best production of peptidases and lipases. These enzymes were microencapsulated by spray drying in order to ensure its stability and investigate other potential benefits obtained by the technique. The use of experimental design allowed us to analyze the effects and interactions between the operating variables of the process (drying temperature, proportion of adjuvants and relation among adjuvants). Biochemical and physico-chemical characterization of the enzymatic extract and of the microparticles were also studied. The use of wheat bran as substrate demonstrated a greater enzyme production then the use of cottonseed meal. The fermentation produced serinepeptidases and lipases, both alkaline, with high stability over a wide pH range and some stability at different temperatures. For both enzymes, there was up regulation of activity with most of the ions analyzed and strong inhibition against the surfactant SDS, whereas lipase demonstrated superactivity against CTAB. The enzymatic characterization suggests the application of these enzymes in the formulation of enzymatic detergents, leather industry, paper industry, agrochemicals, synthesis of biopolymers and biodiesel. In the microencapsulation process, the temperature was the most important operating variable for stability, while the amount of adjuvants in relation to the amount of enzymatic extract influenced in terms of handling. The study demonstrated that the technique of microencapsulation by spray drying resulted in benefits for the storage of enzymes, by increasing considerably its stability and improve the physical properties of the extract.

Keywords: biotechnology, enzymology, bioencapsulation

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1. Características que definem sistemas de bioprocesso de fermentação semissólida (FSS). A) O arranjo de partículas sólidas e umidade de fase gasosa contínua em sistemas FSS envolvendo um fungo filamentoso (lado esquerdo) e um organismo unicelular (lado direito); B) Outros sistemas que envolvem o crescimento em sólidos, mas que não são definidos como FSS, devido à grande quantidade de água nos espaços inter-partículas (imagem adaptada de MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006). | 06 |
|--|----|
| Figura 2. Esquema de biorreator para bioprocesso de fermentação semissólida, com demonstração da possibilidade de parâmetros operacionais (imagem adaptada de MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006). | 08 |
| Figura 3. Sistemas de fermentação estática para bioprocesso de fermentação semissólida. A) Larga escala; B) Pequena escala (imagem adaptada de MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006). | 09 |
| Figura 4. Modelos de estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (imagem adaptada de SINGH et. al., 2010) | 11 |
| Figura 5. Esquema do equipamento de spray drying (imagem adaptada de ROSA, TSUKADA, FREITAS, 2006) | 13 |
| Figura 6. Equipamento de spray drying A) de escala laboratorial e B) de escala industrial (imagens disponíveis em: www.labmaq.com.br) | 14 |
| Figura 7. Fluxograma das etapas de fermentação, caracterização e microencapsulação do extrato enzimático produzido por <i>Fusarium oxysporum</i> | 20 |
| Figura 8. Esquema e fotografia do preparo de saco plástico de polipropileno para ser utilizado em bioprocesso de fermentação semissólida em escala laboratorial | 22 |
| Figura 9. Desenho esquemático para determinação do ângulo de repouso imagem adaptada de AUTON, 2005) | 31 |
| Figura 10. Fotografias do crescimento do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> durante 196 horas, em bioprocesso de fermentação semissólida, utilizando farelo de trigo como substrato | 33 |

| Figura 11. Atividades enzimáticas em 168 h de crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes meios de cultura. A) Atividade proteolítica; B) Atividade Lipolítica. FT = Farelo de Trigo; FA = Farelo de Algodão. | 34 |
|---|------------|
| Figura 12. Efeito de pH na atividade de peptidases e lipases do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> em bioprocesso de fermentação semissólida | 36 |
| Figura 13. Efeito do pH na estabilidade de peptidases e lipases do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> em bioprocesso de fermentação semissólida | 37 |
| Figura 14. Efeito da temperatura na atividade de peptidases e lipases do extrato enzimático produzido pelo fungo Fusarium oxysporum em bioprocesso de fermentação semissólida | 38 |
| Figura 15. Efeito da temperatura na estabilidade de A) peptidases e B) lipases do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxyxporum</i> em bioprocesso de fermentação semissólida | 39 |
| Figura 16. Efeito de inibidores nas atividades A) proteolítica e B) lipolítica do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxyxporum</i> em bioprocesso de fermentação semissólida. AIA = Ácido Iodoacético | 10 |
| Figura 17. Efeito de íons nas atividades A) proteolítica e B) lipolítica do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxyxporum</i> em bioprocesso de fermentação semissólida | 1 1 |
| Figura 18. Efeito de surfactantes nas atividades A) proteolítica e B) lipolítica do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxyxporum</i> em bioprocesso de fermentação semissólida | 12 |
| Figura 19. Estabilidade do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes condições de armazenamento (4 e 25°C) | 14 |
| Figura 20. Superfície de resposta para A) Atividade proteolítica e B) Atividade lipolítica das micropartículas do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxyxporum</i> | 15 |
| Figura 21. Aspecto das micropartículas observadas por MEV. A) Micropartículas obtidas em experimento com alta concentração de dióxido de silício (experimento 2); B) Micropartículas obtidas em experimento com baixa concentração de dióxido de silício (experimento 3) | 50 |

51

Figura 22. Aspecto dos pós após 30 dias de armazenamento em recipientes plásticos vedados. A) Micropartículas obtidas em experimento com alta concentração de adjuvantes (experimento 2); B) Micropartículas obtidas em experimento com baixa concentração de adjuvantes (experimento 3)

Figura 23. Aspecto das micropartículas observadas por MEV após 30 dias de 52 armazenamento em recipientes plásticos vedados. A) Micropartículas obtidas em experimento com alta concentração de adjuvantes (experimento 2); B) Micropartículas obtidas em experimento com baixa concentração de adjuvantes (experimento 3)

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1. Métodos utilizados para encapsulação | 12 |
|--|----|
| Tabela 2. Proporções de meio de cultura utilizadas para bioprocesso de fermentação semissólida do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> | 21 |
| Tabela 3. Reagentes para ensaio de efeito de íons e inibidores sobre do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> em bioprocesso de fermentação semissólida | 26 |
| Tabela 4. Desenho experimental para microencapsulação do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> em bioprocesso de fermentação semissólida | 28 |
| Tabela 5. Condições iniciais do equipamento de <i>spray dryer</i> | 28 |
| Tabela 6. Estabilidade das peptidases nas micropartículas após armazenamento a 4 e 25°C. Ensaios realizados nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 dias de armazenamento | 47 |
| Tabela 7. Estabilidade das lipases nas micropartículas após armazenamento a 4 e 25°C. Ensaios realizados nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 dias de armazenamento | 48 |
| Tabela 8. Caracterização física das micropartículas de extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ar/Dx proporção Aerosil®/Dextrina

BOD Biochemical oxygen demand (demanda bioquimica de oxigênio)

CTAB *Cetyl trimethylammonium bromide* (brometo de cetil trimetil amônio)

da densidade aparente

de densidade de compactação

EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetracético)

EE Extrato enzimático

EE/Ad Proporção extrato enzimático/adjuvante

EF Extrato de fermentação

FA Farelo de algodão

FSS Fermentação semissólida

FH Fator de Hausner

FSm Fermentação submersa

FT Farelo de trigo
IC Índice de Carr

PDA Potato Dextrose Agar

PMSF Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoreto de fenil-metil sulfonila)

SDS Sodium dodecyl sulphate (dodecil sulfato de sódio)

TCA Trichloracetic acid (ácido tricloroacético)

Te Temperatura de entrada
Ts Temperatura de saída

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

| Resumo | |
|---|----|
| Abstract | i |
| Lista de figuras | ii |
| Lista de tabelas | V |
| Lista de abreviaturas e siglas | vi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1Enzimas de uso industrial | 2 |
| 1.2 Fusarium oxysporum | |
| 1.3 Fermentação Industrial | |
| 1.4 Microencapsulação | 10 |
| 1.4.1 Spray drying | |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 3.1 Fluxograma | |
| 3.2 Fermentação | 20 |
| 3.2.1 Inóculo | 20 |
| 3.2.2 Fermentação semissólida | 21 |
| 3.3 Perfil de produção enzimática | 22 |
| 3.3.1 Determinação da atividade proteolítica com caseína | |
| 3.3.2 Determinação da atividade lipolítica | 23 |
| 3.4 Fracionamento por etanol | 23 |
| 3.5 Caracterização bioquímica | 24 |
| 3.5.1 Determinação da atividade proteolítica com azocaseína | 24 |
| 3.5.2 Determinação da atividade lipolítica | 24 |
| 3.5.3 Efeito do pH na atividade e estabilidade | 24 |
| 3.5.4 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade | |
| 3.5.5 Efeito de inibidores e íons | 25 |
| 3.5.6 Efeito de surfactantes | 26 |
| 3.6 Microencapsulação | 26 |
| 3.6.1 Estabilidade das micropartículas de extrato enzimático | |
| 3.6.2 Caracterização física das micropartículas obtidas por <i>spray drying</i> | |
| 3.6.2.1 Umidade | 29 |
| 3.6.2.2 Densidade aparente (da) | 29 |
| 3.6.2.3 Densidade de compactação (dc) | 29 |
| 3.6.2.4 Determinação do fator de Hausner (FH) e índice de Carr (IC) | 30 |
| 3.6.2.5 Determinação do ângulo de repouso (α) | 30 |
| 3.6.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 31 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 4.1 Fermentação semissólida | 33 |
| 4.2 Caracterização do extrato enzimático | 35 |
| 4.2.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade | 36 |

| 4.2.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade | 37 |
|---|----|
| 4.2.3 Efeito de inibidores e íons | 39 |
| 4.2.4 Efeito de surfactantes | 42 |
| 4.3 Fracionamento por etanol | 44 |
| 4.4 Microencapsulação | 44 |
| 4.4.1 Estabilidade das micropartículas de extrato enzimático | 44 |
| 4.4.2 Caracterização física das micropartículas de extrato enzimático | 49 |
| 5. CONCLUSÕES | 53 |
| 6. REFERÊNCIAS | 56 |

1. Introdução

1.1 Enzimas de uso industrial

Embora não se saiba exatamente quando as sociedades primitivas começaram a utilizar processos enzimáticos no seu cotidiano, sabe-se que fabricação de bebidas como vinho e cerveja e a transformação de alimentos como pães e queijos constitui uma tradição milenar. Contudo, somente em 1878, o termo enzima (do grego: *en*, no + *zyme*, levedura) foi primeiramente utilizado por Fredrich Wilhelm Kühne, sugerindo que algo dentro da levedura era responsável pela fermentação (VOET & VOET, 2006; ZIMMER et al., 2009).

Por serem capazes de catalisar reações como hidrólise, polimerização, transferência de grupos funcionais, oxirredução, desidratação e isomerização, as enzimas constituem um dos grupos mais importantes de produtos biotecnológicos e encontram diversas aplicações industriais (NAMALDI, ÇALIK, ULUDAG, 2006; VOET & VOET, 2006; ZIMMER et al., 2009). Dados do "Freedonia Group" (2011) indicam que o mercado mundial de enzimas gera um faturamento em torno de 5,8 bilhões de dólares por ano, com previsão de aumento de 6,8% por ano até 2015, chegando a aproximadamente 8,0 bilhões de dólares por ano.

Das enzimas industriais, cerca de 75% são enzimas hidrolíticas. Entre essas se destacam as peptidases e as lipases, que representam dois dos maiores grupos de aplicação na indústria (RAO et al., 1998; SHARMA, CHISTI, BANERJEE, 2001; SHU et al., 2010).

As enzimas ocupam grande destaque nos processos industriais, já que apesar da possibilidade de síntese de alguns produtos como vitaminas, hormônios e polissacarídeos pela indústria química, os processos são de alto custo e podem gerar resíduos de difícil tratamento, que se tornam poluentes ambientais. Além disso, a maioria das substâncias naturais como alguns antibióticos e polímeros é tão complexa que a produção por síntese química é mais difícil ou impossível sem utilização de enzimas. Em adição, enzimas oferecem alta especificidade, possibilitando o controle dos produtos obtidos, minimizando reações indesejadas e reduzindo o desperdício (DEMAIN, 2007; HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

Uma vez que as enzimas são fisiologicamente necessárias para os organismos vivos, elas são encontradas em uma ampla diversidade de fontes, tais como plantas, animais e microorganismos (PAHOJA & SETHAR, 2002; RAO et al., 1998).

Nas plantas, em sua maioria, as enzimas são encontradas em tecidos de reserva, mas mais abundantemente em sementes e frutos. A utilização de plantas como fonte de enzimas é regulada por vários fatores como a disponibilidade de terras para o cultivo e a adequação de tempo e de condições climáticas para o crescimento. Já enzimas de origem animal são obtidas principalmente de glândulas e órgãos. Nesse caso, além das questões éticas envolvidas, dependem ainda da disponibilidade de animais para abate e de tempo e espaço para crescimento. Assim, fontes animais e vegetais não conseguem suprir toda demanda de enzimas que existe no mercado (PAHOJA & SETHAR, 2002; RAO et al., 1998).

Por esse motivo, ao longo dos anos ocorreu um aumento no interesse por enzimas de origem microbiana. Os microrganismos se mostram uma opção mais atrativa, devido à ampla diversidade bioquímica, podendo ser cultivados em grandes quantidades, em pouco espaço, em tempo relativamente curto, com facilidade de manutenção, com baixo custo, além de apresentarem a possibilidade de manipulação genética. Em adição, a produção enzimática por microrganismos não está associada a condições sazonais ou geográficas (DEMAIN, 2007; RAO et al., 1998; ZIMMER et al., 2009).

Entre os microrganismos, os fungos são preferíveis em relação às bactérias por possuírem uma capacidade muito maior de secretar as enzimas produzidas para o meio externo. Além disso, geralmente enzimas de origem fúngica apresentam características mais abrangentes, como, por exemplo, atividade enzimática em faixas de pH mais amplas e maior termotolerância em alguns casos (DEMAIN, 2007; RAO et al., 1998; ZIMMER et al., 2009).

Atualmente, diferentes enzimas produzidas por fungos são largamente utilizadas em indústrias. Mais especificamente, peptidases e lipases encontram aplicação em detergentes, tratamento de couro, alimentos, indústria de aromas, indústria de celulose, biocatálise de fármacos, ésteres e derivados de aminoácidos, química fina, produtos agroquímicos, biorremediação, biossensores e cosméticos (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006; RAO et al., 1998; TREICHEL, et al., 2010; YIKE, 2011).

1.2 Fusarium oxysporum

Ao colonizar diferentes substratos, os fungos produzem várias enzimas para utilização nas reações das substâncias essenciais para seu metabolismo. Entre essas enzimas estão peptidases e lipases (RAO et al., 1998; TREICHEL, et al., 2010).

Espécies do gênero *Fusarium* são amplamente distribuídas no solo, em partes aéreas e subterrâneas de plantas e em outros materiais orgânicos. Elas apresentam grande habilidade para crescer em diferentes substratos e são comumente encontradas em regiões tropicais e temperadas, mas também em condições climáticas extremas como deserto e ártico (NELSON, DIGNANI, ANAISSIE, 1994).

A espécie *Fusarium oxysporum* é um fungo do solo que pode existir como saprófito. Também pode crescer como endófito de vegetais, colonizando suas raízes e até exercer ação benéfica de proteção a plantas contra doenças causadas por outros fungos (KAVANAGH, 2005; LARKIN, HOPKINS, MARTIN, 1993; LEMANCEAU et al, 1993).

Embora existam algumas cepas de patógenos oportunistas para plantas, recentes estudos genéticos (DENISOV, FREEMAN, YARDEN, 2011) conseguiram identificar e silenciar genes de *F. oxysporum* relacionados a fatores de patogenicidade, levando a uma redução de 75% desta. Além disso, alguns estudos indicam o uso da engenharia genética para promover o aumento de rendimento na produção de enzimas em até dez vezes em algumas cepas selecionadas de microrganismos (SHU et al., 2010).

Desse modo, o fungo *Fusarium oxysporum* se torna um interessante candidato para produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas para uso industrial.

1.3 Fermentação industrial

Para obtenção de enzimas de origem microbiana em larga escala, é utilizada a fermentação industrial (MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006).

Acredita-se que as pesquisas com fermentação iniciaram-se por volta de 1810 com Gay-Lussac investigando a atuação de leveduras na decomposição do açúcar em etanol e CO₂.

Com o passar dos anos, outras descobertas importantes colaboraram para a elucidação dos mecanismos de fermentação, como a teoria da catálise química de Jacob Berzelius, os estudos de Louis Pasteur com microrganismos, a teoria dos "fermentos" de Justus Von Liebig, entre outros (VOET & VOET, 2006).

No estudo da Bioquímica, a fermentação é definida como um processo biológico de reações anaeróbicas (VOET & VOET, 2006). Entretanto, a palavra "fermentação" na expressão "fermentação industrial" está relacionada ao "cultivo controlado de organismos", podendo ser tanto em condição aeróbica quanto anaeróbica, para geração de produtos como aminoácidos, vitaminas, enzimas, vacinas, solventes, ácidos orgânicos, ácidos graxos, e outras substâncias de interesse industrial (BHARGAV et al., 2008; DEMAIN, 2007; MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006). É dentro deste conceito que será utilizado o termo "fermentação" no presente trabalho.

A fermentação industrial pode ser classifica em dois tipos: Fermentação submersa (FSm) e Fermentação semissólida (FSS), (SINGHANIA et al., 2010; PANDEY, 2003).

Na FSm, o microrganismo é incubado em meio nutriente líquido com agitação. Como vantagens, apresenta a possibilidade de controle de parâmetros fermentativos como pH do meio, temperatura, aeração e agitação, além de garantir a homogeneização de nutrientes e células no meio de cultura (DURAND, 2003; SILVA, 2011).

Por mimetizar melhor seu habitat natural, a FSS é preferível no cultivo de fungos (TREICHEL, et al., 2010). A FSS envolve o crescimento de microrganismos em partículas sólidas úmidas, em um sistema com uma fase gasosa contínua e um mínimo de água livre. As partículas sólidas tanto podem ser substrato com fonte de carbono e energia para o crescimento do microrganismo, quanto partículas inertes suplementadas com nutrientes. Apesar de meios de cultura sintéticos serem utilizados, a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais é uma alternativa interessante por ser uma fonte de nutrientes de baixo custo, que pode auxiliar a resolver problemas ambientais relacionados à poluição causada por esses resíduos (MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006; TREICHEL et al., 2010).

Por toda extensão do meio de cultura sólido, existe a possibilidade de gotículas de água estarem presentes entre as partículas e de haver filmes finos de água na superfície das partículas. Contudo, a fase de água interpartícula é descontínua e a maior parte do espaço interpartícula é preenchido pela fase gasosa (Figura 1). Isso é importante, já que possibilita que a temperatura do sistema não seja aumentada consideravelmente, devido à fraca condutividade térmica do ar comparada com a água (BHARGAV et al., 2008; DURAND, 2003; MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006; PANDEY, 2003).

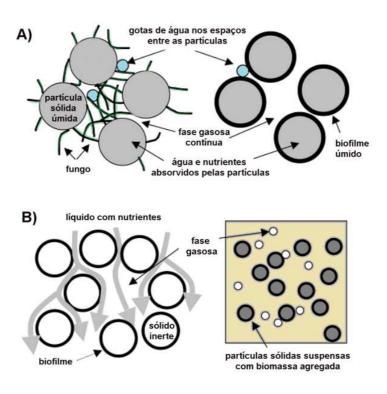


Figura 1. Características que definem sistemas de bioprocesso de fermentação semissólida (FSS). A) O arranjo de partículas sólidas e umidade de fase gasosa contínua em sistemas FSS envolvendo um fungo filamentoso (lado esquerdo) e um organismo unicelular (lado direito); B) Outros sistemas que envolvem o crescimento em sólidos, mas que não são definidos como FSS, devido à grande quantidade de água nos espaços inter-partículas (imagem adaptada de MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006)

Na tentativa de selecionar as melhores condições para produção de enzimas, a FSS tem se mostrado uma opção atrativa e uma promessa no desenvolvimento de bioprocessos, exibindo várias vantagens em relação à FSm. É uma tecnologia de baixo custo, que apresenta condições de fermentação semelhantes ao ambiente natural do microrganismo (principalmente fungos) e que utiliza pouca água, gerando um menor volume de efluentes. Além disso, o crescimento do microrganismo ocorre na superfície e/ou no interior do material sólido,

gerando maior concentração de produtos. Por possibilitar a utilização de resíduos agroindustriais de baixo custo como farelo de trigo e farelo de algodão, a FSS gera produtos com alto valor agregado, diminuindo problemas de poluição e se tornando uma tecnologia promissora para produção de enzimas (BHARGAV et al., 2008; PANDEY, 2003; SINGHANIA, et al., 2010).

Comparando a FSm com a FSS, pode-se observar que na FSm o controle de temperatura, pH, aeração e disponibilidade de nutrientes é relativamente fácil. Além disso, o fungo não corre o risco de ressecar, devido ao seu contato contínuo com o líquido. Já na FSS, a exposição do fungo ao ar pode dessecá-lo; a temperatura e o pH podem variar na extensão do substrato e durante o ciclo de crescimento, com difícil possibilidade de manutenção; e o oxigênio é livremente disponível na superfície, mas tem dificuldade na penetração do substrato, tornando-se restrito em algumas áreas. Essas e outras diferenças tornam a FSm um sistema "mais fácil" que a FSS. Por esse motivo, alguns fungos somente esporulam em FSS e alguns produtos como algumas enzimas apenas são induzidos sob condições de estresse ou são produzidos com rendimento muito superior quando comparado à produção em FSm (MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006; SILVA, 2011).

Embora o estresse seja importante para produzir algumas substâncias de interesse, o estresse em excesso pode inibir a produção ou até mesmo levar o microrganismo à morte. Por esse motivo é necessário desenvolver ao menos o mínimo controle das condições de crescimento em escala laboratorial e industrial (MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006). Desse modo, em qualquer escala deve-se buscar as condições ideais para fermentação. A Figura 2 demonstra a possibilidade de controlar diversas variáveis em um fermentador de escala industrial.

Ajustes no equipamento tornam possível controlar a vazão, a temperatura, e a umidade do ar fornecido na entrada do biorreator ou câmara. Para garantir a umidade constante, podese borrifar água no leito. O fermentador pode possuir uma camisa de água ou ar para controlar a temperatura através das paredes. As condições nos arredores do reator também podem ser controladas, instalando-o numa sala com ajuste de temperatura, umidade, e circulação de ar. Em câmaras em que há misturador, é possível controlar a frequência, a duração e a intensidade da mistura (BHARGAV et al., 2008; MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006).

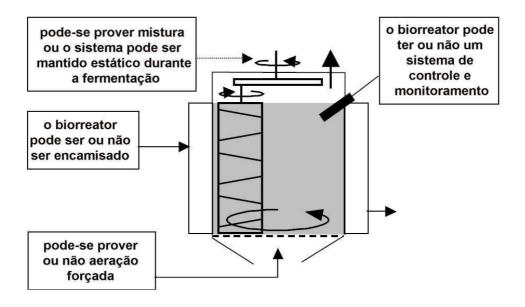


Figura 2. Esquema de biorreator para bioprocesso de fermentação semissólida, com demonstração da possibilidade de parâmetros operacionais (imagem adaptada de MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006)

Quando as enzimas precisam ser extraídas do produto resultante da fermentação, podem-se acoplar ao sistema ferramentas ou equipamentos para prover filtração, centrifugação, decantação, rompimento de células e outros processos para separação e purificação das enzimas (OKAFOR, 2007).

Entretanto, o biorreator da Figura 2 não é a única possibilidade para FSS. Incubadoras estáticas representam a tecnologia mais simples para se realizar FSS e tem sido utilizadas há séculos para produção de alimentos fermentados. Além de câmaras sem misturadores, a FSS pode ser conduzida em sistemas de bandejas ou sacos plásticos (Figura 3). Nesses sistemas, caso seja observada a necessidade de uma pequena mistura, essa pode ser realizada com alguma frequência, de forma manual ou automatizada. Contudo, essas opções são particularmente desejáveis quando a agitação não é tolerada pelo microrganismo, impedindo seu crescimento, ou em projetos novos, quando essa condição ainda não é determinada (MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006; PANDEY, 2003).

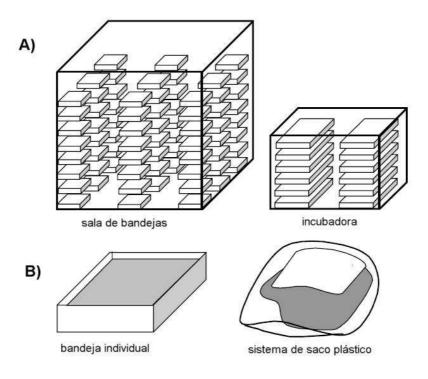


Figura 3. Sistemas de fermentação estática para bioprocesso de fermentação semissólida. A) Larga escala; B) Pequena escala (imagem adaptada de MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006)

Outros tipos de fermentadores incluem tambores cilíndricos rotatórios, com ou sem misturador interno. Além disso, os biorreatores podem operar em regime de batelada ou em modo contínuo (MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006).

Em escala laboratorial, além de pequenos biorreatores, a FSS pode ser realizada em placas de petri, bandejas, frascos e em sacos plásticos. Para processos novos, a utilização de sacos plásticos se mostra uma opção interessante ao se empregarem plásticos autoclaváveis, que possibilitam que haja troca de O_2 e CO_2 , mas sem troca de água. Desse modo é possível permitir que o microorganismo respire, sem que o substrato seque, além de impedir contaminação por outros microrganismos externos (DURAND, 2003; MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006). Esta tecnologia tem sido utilizada há quase 30 anos para produzir molho de soja koji e outros alimentos fermentados, além de vir sendo explorada por diversos pesquisadores ao longo dos anos (CUERO SMITH, LACEY, 1985; DAIGLE et al., 1998; DURAND, 2003; HSIEH & YANG, 2004; LOTONG & SUWANARIT, 1983; MISRA et al., 2007; PATTANAGUL et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2011).

Assim, a utilização de sacos plásticos para obtenção de enzimas por FSS se mostra uma opção bastante atrativa por ser simples, versátil, econômica quando comparada a biorreatores, fácil de manusear e de retirar o substrato após fermentação, além garantir operação asséptica dentro do sistema (LOTONG, SUWANARIT, 1983; MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006).

1.4 Microencapsulação

A principal preocupação na produção de proteínas e enzimas comerciais é de manter a sua estabilidade. Esses produtos apresentam menor estabilidade em formulações líquidas do que quando se encontram em estado sólido, uma vez que a água atua como agente ou como veículo de degradação física e química. Consequentemente, formulações sólidas são frequentemente desenvolvidas para aumentar a vida útil aceitável das enzimas e conservar sua atividade biológica, além de facilitar seu transporte, armazenamento e fornecimento. Na transformação de produtos líquidos em formulações em pó, a microencapsulação se mostra uma opção bastante interessante (AMERI & MAA, 2006; NAMALDI, ÇALIK, ULUDAG, 2006).

Microencapsulação é definida como uma tecnologia de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em miniaturas de cápsulas, que variam seu diâmetro entre poucos mícrons a 1 mm e tem sido largamente utilizada na indústria de alimentos, medicamentos e cosméticos, nas mais diversas áreas (ANAL, SINGH, 2007; PRAKASH, URBANSKA, 2008).

Por exemplo, um composto volátil pode ter seu tempo de vida útil aumentado por microencapsulação, pois a membrana impede a sua evaporação. Reações químicas entre duas espécies ativas podem ser evitadas pela separação física oferecida pela membrana. A microencapsulação pode também ser utilizada para proteger o conteúdo dos efeitos da radiação ultravioleta, umidade ou do contato com o oxigênio e pode ainda modificar ou mascarar a cor, o odor, o sabor, a forma ou o volume da substância encapsulada (BARROS, STRINGHETA, 2006; FAVARO-TRINDADE, PINHO, ROCHA, 2008; MARTINS et al., 2011). De forma geral, a técnica oferece muitos benefícios, pois funciona isolando, estabilizando e protegendo seu conteúdo da exposição a qualquer fator ambiental destrutivo.

De acordo com a técnica escolhida e com os materiais de encapsulação, diferentes sistemas podem ser produzidos. Na Figura 4, adaptada de Singh et. al. (2010), observam-se os modelos A e B, que podem ser denominadas microcápsulas mononucleares e possuem a substância ativa recoberta por uma ou mais camadas de material encapsulante. Os tipos C e D são microcápsulas multinucleares, e seus múltiplos núcleos podem ser, inclusive, outras micro ou nanopartículas. Já o tipo E apresenta-se como uma microesfera de mistura molecular entre a substância ativa e os agentes encapsulantes. Já que alguns autores considerariam os tipos C e D também como microesfera e não há, na literatura, um consenso com relação ao uso dos termos microcápsula e microesfera, neste trabalho optou-se pelo uso do termo micropartícula, que engloba os dois tipos.

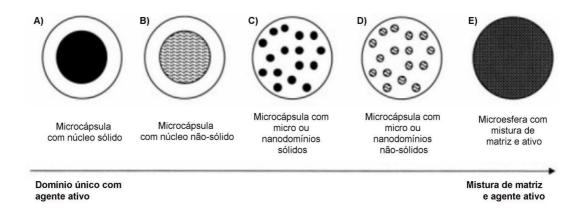


Figura 4. Modelos de estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (imagem adaptada de SINGH et. al., 2010)

A depender do tipo e da aplicação desejada à micropartícula, do tamanho necessário, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas (tanto do material encapsulado, quanto do agente encapsulante) a técnica de microencapsulação adequada deve ser selecionada. (BARROS, STRINGHETA, 2006; FAVARO-TRINDADE, PINHO, ROCHA, 2008; PRAKASH, URBANSKA, 2008; ROSSANEZI, 2008). A Tabela 1 descreve os principais tipos.

Tabela 1. Métodos utilizados para encapsulação

| Métodos de encapsulação | Materiais encapsuláveis |
|---|-------------------------|
| Métodos físicos | |
| Extrusão estacionária | Líquido/sólido/gás |
| Bocal submerso | Líquido/sólido/gás |
| Extrusão centrifuga | Líquido/sólido/gás |
| Bocal vibrante | Líquido/sólido/gás |
| Spray drying | Líquido/sólido |
| Disco rotativo | Líquido/sólido |
| Pan coating | Sólido |
| Suspensão por ar | Sólido |
| Spray chilling e spray cooling | Líquido/sólido |
| Leito fluidizado | Sólido |
| Co-cristalização | Líquido/sólido |
| Liofilização | Líquido |
| Métodos químicos | |
| Polimerização interfacial | Líquido/sólido |
| Inclusão molecular | Líquido |
| Polimerização in situ | Líquido/sólido |
| Métodos fisicoquímicos | |
| Coacervação simples | Líquido/sólido |
| Coacervação complexa | Líquido/sólido |
| Lipossomas | Líquido/sólido |
| Lipoesferas (solid lipid nanoparticles e nanostructured lipid carriers) | Líquido/sólido |
| Evaporação do solvente | Líquido/sólido |

Fonte: adaptado de FAVARO-TRINDADE, PINHO, ROCHA, 2008

1.4.1 Spray drying

Spray drying é, por definição, a transformação de um material em estado fluido em partículas sólidas por atomização do líquido em um meio de secagem quente (RÉ, 1998).

Para secagem das mais diversas substâncias ou para a microencapsulação de materiais termolábeis ou voláteis, a técnica *spray drying* tem sido aplicada há muitos anos. O primeiro relato do seu uso é em um processo de secagem de ovos em uma patente norte-americana de 1865 (FREITAS et. al., 2010). Algumas décadas depois, o método foi difundido na indústria química, farmacêutica e de alimentos, alcançando amplitude durante a Segunda Guerra Mundial, devido à necessidade de reduzir o peso de alimentos para facilitar o transporte

desses materiais (ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2007; PATEL, PATEL, SUTHAR, 2009).

Em comparação a outras técnicas de encapsulação, o *spray drying* mostra vantagens como ser de fácil transposição de escala, ser operado em equipamento de fácil aquisição e ter o custo de produção mais baixo em relação à maioria das outras opções. Ao contrário de outros métodos de microencapsulação, a secagem por atomização é rápida e versátil, com etapas reduzidas, não necessitando etapa adicional de pulverização. Algumas características como a possibilidade de trabalhar com ampla faixa de quantidade (de gramas a toneladas), a produção de pós secos de fácil armazenamento e o controle das propriedades do pó por meio de variações nas condições operacionais se mostram grandes vantagens para processos industriais (BARROS, STRINGHETA, 2006; FREITAS et. al., 2010; LIEVENSE, VAN´T RIET, 1993; ROSA, TSUKADA, FREITAS, 2006; SAVOLAINEN, 2002).

Conforme a Figura 5 e a Figura 6, o conjunto que compõe um equipamento do tipo *spray dryer* padrão é constituído de: 1) Sistema de bombeamento e controle de vazão da alimentação do material a ser seco; 2) Sistema de atomização; 3) Sistema de aquecimento e controle de temperatura do ar de secagem; 4) Sistema da alimentação de ar para secagem; 5) Câmara de secagem; 6) Sistema de separação ar–pó seco e coleta. (ROSA, TSUKADA, FREITAS, 2006).

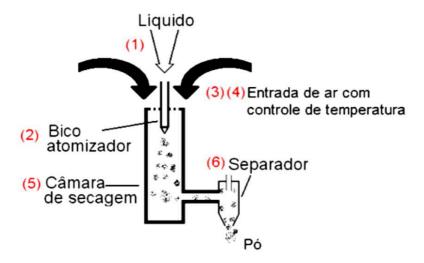


Figura 5. Esquema do equipamento de *spray drying* (imagem adaptada de ROSA, TSUKADA, FREITAS, 2006)

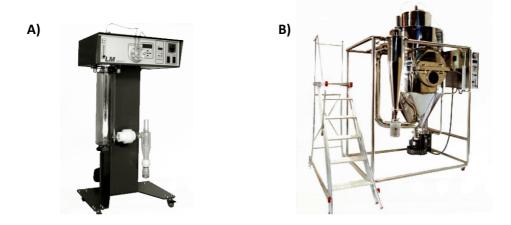


Figura 6. Equipamento de *spray drying*. A) de escala laboratorial e B) de escala industrial (imagens disponíveis em: www.labmaq.com.br)

O processo se dá em etapa única, com atomização, secagem e coleta do pó em um único equipamento, o que torna o processo rápido e diminui a possibilidade de contaminação do produto. A partir da substância que se deseja encapsular e do material encapsulante, prepara-se uma emulsão, solução ou suspensão, que é injetada no bico atomizador, produzindo gotas. Na câmara de secagem, a grande área de contato entre o ar de secagem e a superfície das gotas permite a utilização de altas temperaturas para secagem do solvente, mantendo baixa a temperatura de gota. No fim do processo, já no separador, o ar sai do sistema por um lado do ciclone, enquanto o produto final sai pelo outro lado e pode ser recolhido em um recipiente coletor acoplado ao equipamento. Quando o solvente é diferente de água, este pode ser recuperado no separador para reutilização ou tratamento antes do descarte. Na separação também podem ser utilizados filtros ou sistemas de precipitação eletrostática (ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2007; FREITAS et. al., 2010; PATEL, PATEL, SUTHAR, 2009; SAMBORSKA et al., 2005).

Amari & Maa (2006), Eslamian et al. (2009) e Mezhericher et al (2007) descrevem o processo como um fenômeno fisicoquímico. No início, a umidade da gota é muito grande e sua temperatura se mantém à temperatura do bulbo úmido, que é bem abaixo da do ar imediatamente ao redor da gota. Com a perda do solvente por evaporação, a concentração do soluto aumenta, a temperatura da gotícula se eleva e seu diâmetro diminui. Nessa, fase, devido à remoção da água fracamente ligada, o movimento das proteínas é reduzido, minimizando mudanças conformacionais. O soluto, então, começa a precipitar na superfície

da gota formando uma crosta e uma vez que esta se torna rígida, o diâmetro exterior não se altera e se inicia a depleção do líquido a partir do núcleo da partícula.

Tanto as gotículas atomizadas quanto as partículas de pó secas irão manter uma temperatura bem abaixo da temperatura de entrada do ar de secagem ao longo do processo. Enquanto o solvente evapora, um efeito de arrefecimento do ar circundante às partículas acontece. Somente nos últimos estágios de secagem, quando a atividade de água do material de secagem é baixa, a temperatura das partículas pode subir, mas continuará ainda inferior à temperatura do ar que sai do equipamento (MILLQIST-FUREBY et al., 1999). Desse modo, a desnaturação normalmente não é observada no processo de *spray drying*. Por esse motivo, o processo pode ser aplicado a materiais termolábeis como alguns fármacos, microrganismos, alimentos e outras substâncias como proteínas e enzimas. Contudo, há de se utilizar uma temperatura que não seja tão alta que proporcione morte dos microrganismos, altere as propriedades dos materiais ou modifique a estrutura secundária das proteínas, alterando sua conformação de modo irreversível.

A temperatura de entrada (Te) e de saída (Ts) do ar de secagem estão entre as variáveis operacionais que podem ser ajustadas para o controle também de algumas características do produto como propriedade de fluxo, morfologia, tamanho e nível de aglomeração de partículas. Dentre outras variáveis citadas na literatura estão vazão e pressão do ar, condições de atomização; vazão de alimentação do líquido; e formulação (AMERI & MAA, 2006; NAMALDI, ÇALIK, ULUDAG, 2006; RÉ, 2006; SAMBORSKA, WITROWA-RAJCHERT, GONCALVES, 2005).

A temperatura é a variável mais crítica do processo, por ser fator limitante na conservação das propriedades de substâncias termolábeis. Como em um *spray dryer* operando em modo corrente (em que a atomização e o ar de secagem seguem na mesma direção) a partícula pode alcançar as temperaturas mais altas na Ts, é preferível o controle da Ts, ao invés da Te. A temperatura também é importante para controlar o teor de umidade da partícula, que é um dos fatores determinantes da manutenção da estabilidade da substância encapsulada (AMERI & MAA, 2006; ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2007).

Com relação às condições de atomização, a temperatura, a pressão e a vazão do ar de secagem são responsáveis pela taxa de evaporação do solvente, o que, juntamente com a formulação está relacionado à umidade, ao tamanho e à morfologia da partícula (AMERI &

MAA, 2006). O tamanho das partículas também está relacionado ao orifício do bico ou disco atomizador, pois dele depende o tamanho das gotículas geradas. Contudo, ainda mais importante, juntamente com a pressão e a vazão do ar de secagem, o tamanho do orifício determina as taxas de cisalhamento, que podem gerar um significante estresse sobre a proteína, afetando sua conformação e consequentemente sua atividade biológica. Já a vazão de alimentação do líquido interfere no rendimento, na taxa de secagem e na morfologia das partículas (AMERI & MAA, 2006; ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2007; SAMBORSKA, WITROWA-RAJCHERT, GONÇALVES, 2005).

Quanto à formulação, dentre os materiais utilizados, existem os agentes encapsulantes e os de secagem que, juntamente com as outras variáveis, são muito importantes para o rendimento do processo e em características do produto. Quando necessário, adjuvantes crioprotetores e estabilizantes podem ser adicionadas à formulação para garantir proteção frente a mudanças de temperaturas extremas e garantir a estabilidade dos produtos durante o processo e durante sua armazenagem (AMERI & MAA, 2006; DEPAZ, 2002; SCHONHERR & RIEDE, 1994).

Desse modo, torna-se importante o estudo não só dos parâmetros do bioprocesso fermentativo para produção de peptidase e lipase pelo fungo *Fusarium oxysporum*, mas também o estudo de variáveis operacionais no processo de microencapsulação, visando garantir a estabilidade e vida útil aceitável das enzimas, conservar sua atividade biológica e investigar outros prováveis benefícios obtidos por meio da técnica.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo geral deste trabalho foi estudar parâmetros fermentativos para produção de peptidases e lipases pelo fungo *Fusarium oxysporum*, caracterizar as enzimas produzidas e promover aumento de sua estabilidade utilizando a técnica de microencapsulação por *spray drying*.

Objetivos específicos:

- Investigar duas variações de resíduo agroindustrial (farelo de trigo e farelo de algodão) como meio de cultura para fermentação semissólida pelo fungo *Fusarium oxysporum* com o objetivo de obter a melhor produção de peptidases e lipases.
- Investigar os benefícios do processo de microencapsulação no manuseio e na estabilidade do extrato enzimático produzido pelo fungo *F. oxysporum*, visando uma possível aplicação industrial destas micropartículas.
- Realizar a caracterização bioquímica e físico-química do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum* e das micropartículas deste extrato para avaliar seu potencial biotecnológico.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fluxograma

A Figura 7 apresenta o fluxograma das etapas realizadas para obtenção do extrato enzimático produzido por *Fusarium oxysporum*, caracterização e microencapsulação das enzimas.

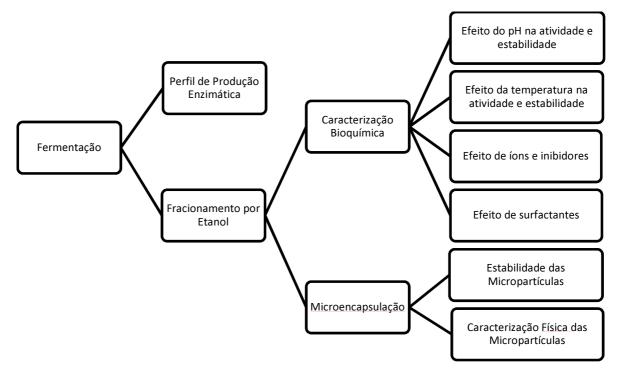


Figura 7. Fluxograma das etapas de fermentação, caracterização e microencapsulação do extrato enzimático produzido por *Fusarium oxysporum*

3.2 Fermentação

3.2.1 Inóculo

O fungo utilizado neste trabalho pertence à micoteca do Laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, e, em colaboração com o Departamento de Micologia da UFPE, foi identificado como *Fusarium*

oxysporum, baseando-se em sua morfologia e em testes bioquímicos. A cultura foi mantida em tubos inclinados de PDA (*Potato Dextrose Agar*) a 4°C, com repiques mensais.

Para preparação do inóculo, utilizaram-se frascos inclinados tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de PDA, com crescimento por 7 dias a 30°C. A suspensão de micélios foi obtida adicionando a cada frasco 20 mL de solução salina (0,1% de sulfato de amônia, 0,1% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de amônia) (MERHEB-DINI et al., 2009) esterilizada (121°C, 20 min) e macerando o fungo com auxílio de espátula.

3.2.2 Fermentação semissólida

Adaptando metodologias de Lotong & Suwanarit (1985) e Merheb-Dini, et al. (2009), foram utilizados sacos plásticos de polipropileno como recipiente de cultivo, preenchidos com Farelo de Trigo (FT) e/ou Farelo de Algodão (FA) em diferentes proporções (Tabela 2) e um volume de solução salina correspondente a 60% de umidade (m/v).

Tabela 2. Proporções de meio de cultura utilizadas para bioprocesso de fermentação semissólida do fungo *Fusarium oxysporum*

| Meio de Cultura | Massa de FT (g) | Massa de FA (g) |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| FT | 5,00 | - |
| FA | - | 5,00 |
| FT: FA (1:1) | 2,50 | 2,50 |
| FT: FA (3:1) | 3,75 | 1,25 |
| FT: FA (1:3) | 1,25 | 3,75 |

Os sacos plásticos de polipropileno utilizados eram autoclaváveis e possuíam dimensão de 12 × 20 cm. Um plástico rígido tubular (polietileno de alta densidade) de 5 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro foi conectado à extremidade aberta de cada um dos sacos por fita adesiva. Devido à rigidez do tubo, o invólucro adquiriu forma semelhante a um frasco com gargalo, o que possibilitou que fosse fechado com algodão (Figura 8).

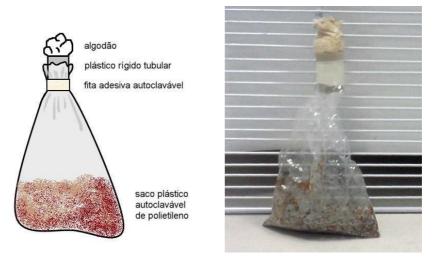


Figura 8. Esquema e fotografia do preparo de saco plástico de polipropileno para ser utilizado em bioprocesso de fermentação semissólida em escala laboratorial

Os sacos preenchidos com os farelos foram autoclavados a 121°C por 20 minutos, e após chegarem à temperatura ambiente foram inoculados com 1 mL de suspensão de micélio. Os sacos foram incubados em câmara climatizada (BOD), a 30°C, por período de 24 a 168 horas. Para extração das enzimas, a cada 24 horas um saco foi removido da câmara e a este foram adicionados 40 mL de água destilada a 4°C. O material macerado foi filtrado e centrifugado a 5000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato de fermentação (EF), foi coletado para a quantificação das atividades enzimáticas.

3.3 Perfil de produção enzimática

3.3.1 Determinação da atividade proteolítica com caseína

Para todas as variações de meio de cultura, a atividade proteolítica foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Sarath, Motte e Wagner (1996) com modificações. A mistura da reação foi composta por 200 μL de EF; 100 μL de tampão NaH₂PO₄ (Fosfato de Sódio Monobásico, Synth, Brasil) 50 mM, pH 6,5 e 1000 μL de Caseína 1% (Sigma-Aldrich, Alemanha). A reação foi conduzida a 40°C, por 20 minutos. A interrupção da reação enzimática foi realizada com adição de 600 μL de TCA 10% (ácido tricloroacético, Synth, Brasil).

Os tubos de reação foram centrifugados a 10.000 g, por 15 minutos, a 25°C. A absorbância do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda 280 nm, contra seus respectivos brancos. A atividade enzimática foi expressa em unidade de atividade/mL (UA/mL), sendo a unidade de atividade igual à quantidade de enzima necessária para promover a liberação de 1 µmol tirosina/minuto sob condições definidas de ensaio (MEYERS & AHEARN¹, 1977 apud GUPTA et al, 2002).

3.3.2 Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada de acordo com o protocolo de Kanwar et al. (2005) com modificações. Uma solução estoque de *p*-nitrofenilpalmitato 20 mM (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi preparada em isopropanol (Synth, Brasil). Para cada 25 μL da solução estoque, a solução diluída foi obtida em 875 μL de tampão Tris-HCl 50 mM (Sigma-Aldrich, Alemanha), pH 8,0.

A mistura da reação foi composta por 50 μL de EF e 450 μL da solução diluída de *p*-nitrofenilpalmitato. A reação foi conduzida a 40°C, por 20 minutos. A interrupção da reação enzimática foi realizada com adição de 166 μL de solução de etanol:acetona (1:1) (ambos Synth, Brasil) a 4°C. Os tubos de reação foram centrifugados a 10.000 *g*, por 1 minuto, a 25°C. A absorbância do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda 410 nm, contra seus respectivos brancos. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de *p*-nitrofenol liberado pela hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato por 1 mL de enzima sob condições definidas de ensaio (KANWAR et al., 2005).

3.4 Fracionamento por etanol

Com a finalidade de diminuir a quantidade de impurezas no extrato para ser microencapsulado, este foi submetido a uma purificação parcial com etanol (92,6° GL). Para determinar a melhor condição de precipitação, diferentes proporções de EF e etanol foram testadas. Definida a melhor proporção EF:etanol, o fracionamento foi conduzido a -20°C por 24h. Após ter sido centrifugado a 5000 g por 20 minutos, e desprezado o sobrenadante, o

_

¹ MEYERS, S.P. & AHEARN, D. G. Extracellular proteolysis by *Candida lipolytica*. **Mycologia**, v. 69, p. 646 – 651, 1977.

precipitado foi ressuspenso em Tampão Acetato 25 mM, pH 5,0. O extrato ressuspenso foi denominado extrato enzimático (EE).

3.5 Caracterização bioquímica

3.5.1 Determinação da atividade proteolítica com azocaseína

A determinação da atividade proteolítica do EE foi realizada com Azocaseína (Sigma-Aldrich, Alemanha). A mistura da reação foi composta por 100 μL de EE; 100 μL de tampão no pH adequado; e 200 μL de Azocaseína 1% no pH adequado. A reação foi conduzida a 40°C, por 5 minutos. A interrupção da reação enzimática foi realizada com adição de 800 μL de TCA 10%. Os tubos de reação foram centrifugados a 10.000 g, por 15 minutos, a 25°C. Foram transferidos 400 μL do sobrenadante para um tubo de ensaio e a este foram adicionados 466,5 μL de NaOH 1 M (Synth, Brasil). A absorbância do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda 440 nm, contra seus respectivos brancos (DUCROS et al., 2009).

3.5.2 Determinação da atividade lipolítica

A determinação da atividade lipolítica foi realizada conforme descrito na seção 3.3.2, substituindo o EF por EE.

3.5.3 Efeito do pH na atividade e estabilidade

O pH ótimo foi avaliado realizando ensaios de atividade enzimática a 40°C em diferentes valores de pH, nas seguintes soluções tampão 50 mM: Acetato, pH 4,5 – 5,0; MES (Sigma-Aldrich, Alemanha), pH 5,5 – 6,5; HEPES (Sigma-Aldrich, Alemanha), pH 7,0 – 8,0; BICINE (Sigma-Aldrich, Alemanha), pH 8,5 – 9,0; e CAPS (Sigma-Aldrich, Alemanha), pH 9,5 – 10,5. Para determinação da atividade proteolítica, foi preparada uma solução de azocaseína 1% em cada um dos valores de pH citados. Para determinação da atividade lipolítica, a solução estoque de 4-Nitrofenilpalmitato foi diluída nos mesmos tampões. A realização dos ensaios seguiu conforme descrito nas seções 3.5.1 e 3.5.2.

A estabilidade foi analisada por exposição do EE a diferentes valores de pH (4,5 a 10,5, com incrementos de 0,5). Para atividade proteolítica, 100 μL de EE foram expostos a

50 μL de tampão de exposição (50 mM) nos diferentes valores de pH, por 24 h em temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 50 μL de tampão de reação (150 mM) no pH ótimo determinado, 200 μL de azocaseína 1% e a reação seguiu conforme seção 3.5.1. Para atividade lipolítica, 50 μL do EE foram expostos a 50 μL de tampão de exposição (50 mM) por 24h e após esse período foram adicionados 450 μL de substrato e a reação seguiu conforme seção 3.5.2.

3.5.4 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade

Uma vez definido o pH ótimo, a temperatura ótima foi determinada realizando-se as mesmas reações em temperaturas de 25 a 90°C, com incrementos de 5°C.

A estabilidade térmica foi examinada pela incubação do EE em temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C nos tempos 5, 15, 30 e 60 minutos, seguida das reações de determinação de atividade enzimática conforme descrito nas seções 3.5.1 e 3.5.2.

3.5.5 Efeito de inibidores e íons

Para determinar o efeito de inibidores sobre a atividade enzimática do extrato, foram utilizados PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma-Aldrich, Alemanha), Pepstatina (Sigma-Aldrich, Alemanha), EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*, Sigma-Aldrich, Alemanha) e Ácido Iodoacético (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 100 mM (estoque), segundo protocolo descrito por Dunn (1989). Para o ensaio frente a íons, foram preparadas soluções de: CuCl₂, NiSO₄ MnCl₂, CaCl₂, KCl, MgCl₂, LiCl e AlCl₃ a 100 mM (estoque).

Em cada tubo de reação, foram adicionados o EE e as soluções dos íons ou dos inibidores, obtendo concentração final de 10 mM (Tabela 3). Os tubos foram incubados por 5 minutos a 40°C. Decorrido este período, foram adicionados os reagentes e a reação foi realizada por 5 minutos a 40°C, sendo interrompidas com TCA 10% e Etanol:Acetona para atividade proteolítica e lipolítica respectivamente.

Tabela 3. Reagentes para ensaio de efeito de íons e inibidores sobre do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum* em bioprocesso de fermentação semissólida

| Reagentes | Atividade Proteolítica - Volume (μL) | Atividade Lipolítica - Volume (μL) |
|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| Extrato enzimático | 100 | 50 |
| Inibidores / Íons | 10 | 5 |
| Tampão* | 100 | - |
| Azocaseína 1% / Substrato para lipase | 200 | 450 |
| TCA 10% / Etanol:Acetona | 800 | 166 |

^{*}Atividade proteolítica: tampão NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6,5; atividade lipolítica: tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0

3.5.6 Efeito de surfactantes

Para determinar o efeito de surfactantes sobre a atividade enzimática do EE, este foi incubado em CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*, Sigma-Aldrich, Alemanha), SDS (*Sodium dodecyl sulphate*, Sigma-Aldrich, Alemanha), Tween[®]80 (Polissorbato 80, Sigma-Aldrich, Alemanha) e TritonTMX-100 (*Polyethylene glycol* tert-*octylphenyl ether*, Sigma-Aldrich, Alemanha), nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5 e 3,0%.

Para determinação da atividade proteolítica, foram incubados 100 μL de EE em 100 μL da mistura de surfactante + tampão de reação e mantidos a 40°C por 5 minutos. Após esse tempo, a reação seguiu conforme seção 3.5.1. Para a atividade lipolítica, 50 μL de EE foram incubados em 20 μL da mistura surfactante + tampão e mantidos a 40°C por 5 minutos. Após esse tempo, a reação seguiu conforme seção 3.5.2.

3.6 Microencapsulação

Para a realização dos experimentos de microencapsulação, o material utilizado foi o extrato enzimático (seção 3.4).

As micropartículas foram obtidas utilizando o aparelho *spray dryer*, modelo MSD 0.5 (Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brasil), com capacidade de secagem de até 0,5 L/h. Sua câmara de secagem cilíndrica é feita de vidro borossilicato, possui 51 cm de altura e diâmetro interno de 13 cm. A temperatura de saída, bem como a vazão de alimentação do líquido

podem ser controladas por um controlador digital. O equipamento opera em modo corrente e possui bico atomizador do tipo duplo fluído, com orifício de saída de 1,2 mm, responsável pela produção das gotículas.

Foram realizados os seguintes ensaios preliminares de secagem a 60°C:

- 1) Apenas EE;
- 2) Mistura (1:1) de EE com o adjuvante de encapsulamento manitol (Cromoline Química Fina, Brasil);
- 3) Mistura (1:1) de EE com o adjuvante de encapsulamento dextrina (Corn Products Brasil, Brasil) e
- 4) Mistura (1:1) de EE com o adjuvante de secagem dióxido de silício coloidal Aerosil®200 (Evonik Ind., Alemanha).

Para calcular a proporção de cada mistura, foi efetuada a análise do teor de sólidos do EE (2,03%) por balança analisadora de umidade com lâmpada de halogênio (Ohaus MB 45). O volume de líquido do EE foi utilizado conforme o valor correspondente (em gramas) necessário para cada obter a proporção determinada para cada experimento.

Após serem observados os resultados da secagem, os dois últimos adjuvantes foram selecionados para atuarem combinados no delineamento Box-Behnken – ferramenta de planejamento experimental para otimização de resultados com três fatores e três níveis, que permite a determinação do efeito de interação entre os fatores.

Os fatores escolhidos foram proporção extrato enzimático/adjuvante (EE/Ad), proporção Aerosil[®]/Dextrina (Ar/Dx) e temperatura de saída (Ts) (Tabela 4).

Tabela 4. Desenho experimental para microencapsulação do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum* em bioprocesso de fermentação semissólida

| Experimento | | veis Fatoria Codificados | | Níveis Fatoriais Não Codificados | | | | | |
|-------------|-------|-----------------------------|---------|-------------------------------------|-------|---------|--|--|--|
| Expe | EE/Ad | Ar/Dx | Ts (°C) | EE/Ad | Ar/Dx | Ts (°C) | | | |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 3/1 | 3/1 | 80 | | | |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 1/1 | 3/1 | 80 | | | |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 3/1 | 1/1 | 80 | | | |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 1/1 | 1/1 | 80 | | | |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 3/1 | 2/1 | 60 | | | |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 1/1 | 2/1 | 60 | | | |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 3/1 | 2/1 | 100 | | | |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 1/1 | 2/1 | 100 | | | |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 2/1 | 3/1 | 60 | | | |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 2/1 | 1/1 | 60 | | | |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 2/1 | 3/1 | 100 | | | |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 2/1 | 1/1 | 100 | | | |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 2/1 | 2/1 | 80 | | | |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 2/1 | 2/1 | 80 | | | |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 2/1 | 2/1 | 80 | | | |

As condições operacionais utilizadas na microencapsulação podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições iniciais do equipamento de spray dryer

| Parâmetros | Valores |
|-------------------------------|---------------------------|
| Vazão de alimentação | 4 mL/min |
| Vazão do ar de secagem | 2,75 m ³ /min |
| Vazão do ar de atomização | 50 L/min |
| Pressão do ar de atomização | 4,5 kgf/cm ² |
| Teor de sólidos na formulação | 2,0% |
| Temperatura de secagem | Variável (60, 80 e 100°C) |

Os pós obtidos foram submetidos a ensaios de estabilidade para determinar a atividade enzimática remanescente após processo e armazenamento, bem como a caracterização física das micropartículas produzidas.

3.6.1 Estabilidade das micropartículas de extrato enzimático

As micropartículas obtidas foram acondicionadas em frascos plásticos e armazenadas a 4 e 25°C. As atividades proteolítica e lipolítica foram determinadas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 dias e comparadas às do EE antes do processo.

3.6.2 Caracterização física das micropartículas obtidas por spray drying

Os pós resultantes do processo de *spray drying* foram submetidos às análises de umidade, densidade aparente, densidade compactada e ângulo de repouso, além de serem observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.6.2.1 Umidade

Para análise da umidade do material seco utilizou-se a balança analisadora de umidade com lâmpada de halogênio (Ohaus MB 45) – medida do tipo gravimétrica. A umidade foi determinada imediatamente após o preparo das micropartículas e após 30 dias de armazenamento.

3.6.2.2 Densidade aparente (da)

A densidade aparente é a razão da massa de pó e seu respectivo volume. Adaptando a metodologia encontrada na USP 30/NF25, em uma proveta de 10,0 mL, foram adicionadas amostras dos pó referentes a cada ensaio e aferido seus volumes. A partir da relação com a massa de cada amostra, determinou-se a densidade aparente.

3.6.2.3 Densidade de compactação (dc)

Foram adicionadas amostras de pó a uma proveta de 10,0 mL e em seguida esta foi submetida a elevação e queda sobre o próprio peso, repetindo-se o movimento 100 vezes para

cada amostra (adaptado de USP 30/NF25, 2007). A relação entre a massa do pó e o volume ocupado por ele após a compactação possibilitou a obtenção da densidade de compactação.

3.6.2.4 Determinação do fator de Hausner (FH) e índice de Carr (IC)

O fator de Hausner e o índice de Carr foram determinados por meio de cálculos (GUO, BEDDOWA, VETTE, 1985). O FH é o quociente da razão entre a densidade compactada e a densidade aparente, como mostra a fórmula: FH = $\frac{dc}{da}$

Os materiais que apresentam FH inferior a 1,25 são facilmente compressíveis em contrapartida aos que apresentam valores superiores.

Materiais com índice de Carr inferior a 15% apresentam boas características de compressão (USP 30/NF25, 2007). O IC foi determinado segundo a equação:

$$IC = \left(\frac{dc - da}{dc}\right) \times 100$$

3.6.2.5 Determinação do ângulo de repouso (a)

A determinação do ângulo de repouso tem sido utilizada como um método indireto de classificar o fluxo de um pó, em função da sua relação com a coesão entre as partículas. Para a determinação do ângulo de repouso de cada amostra de pó, utilizou-se um funil e uma base cilíndrica com 4,0 cm de diâmetro. O funil foi colocado a uma distância de 4,0 cm do cilindro (Figura 9). Amostras de pó foram vertidas no funil até que toda a base do cilindro fosse preenchido e em seguida mediu-se, com o auxílio de uma régua com graduação de 1,0 mm, a altura do cone formado (AULTON, 2005).

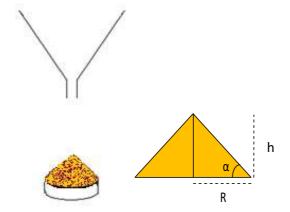


Figura 9. Desenho esquemático para determinação do ângulo de repouso (imagem adaptada de AUTON, 2005)

O valor do ângulo formado (α) foi obtido pela seguinte equação: tg (α) = $\frac{h}{R}$

Onde "h" = altura e "R" = raio. Ângulos abaixo de 40° indicam bom fluxo.

3.6.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As características morfológicas das micropartículas foram observadas por MEV, utilizando um microscópio SS-550 (Shimadzu, Japão). Antes de serem submetidas à análise, as amostras foram revestidas com ouro sob uma atmosfera de argônio, utilizando um revestidor Bal-Tec SCD 050 (Fürstentum Liechtenstein). As fotomicrografias foram efetuadas a uma voltagem de aceleração de 20,0 kV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fermentação semissólida

Para produção das enzimas, o fungo *Fusarium oxysporum* foi inoculado em diferentes meios de cultura, utilizando FT, FA, ou combinação dos dois substratos para FSS. A Figura 10 demonstra o crescimento do fungo no período de 168h (7 dias) em FT.

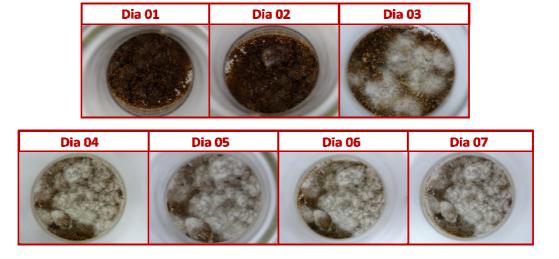


Figura 10. Fotografias do crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* durante 196 horas, em bioprocesso de fermentação semissólida, utilizando farelo de trigo como substrato

No início de um processo de FSS, o crescimento do microrganismo é essencialmente biologicamente limitado. Ele ocorre de acordo com a capacidade do fungo de crescer sobre uma superfície sólida, em condições predefinidas como pH, temperatura e umidade. Logo, microcolônias vizinhas começam a se encontrar, o que provoca interações negativas entre elas, por exemplo, mudança na sua direção de crescimento ou até mesmo diminuição ou parada da expansão. Com o passar do tempo, o estresse sobre o fungo é aumentado devido à diminuição de oxigênio, aumento de temperatura, falta de nutrientes e aumento de produtos residuais e/ou toxinas, o que pode desencadear processos tais como a diminuição de esporulação, de crescimento celular ou morte (MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006). Dados da atividade enzimática do extrato produzido nos diferentes experimentos indicam que

o tempo de incubação necessário para obtenção das enzimas desejadas seria em torno de 96h (4 dias) (Figura 11).

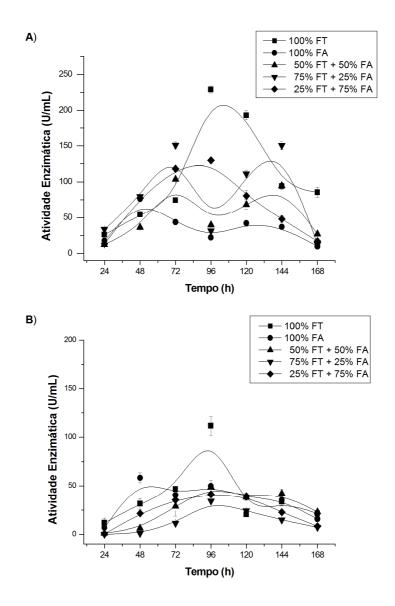


Figura 11. Atividades enzimáticas em 168 h de crescimento de *Fusarium oxysporum* em diferentes meios de cultura. A) Atividade proteolítica; B) Atividade Lipolítica. FT = Farelo de Trigo; FA = Farelo de Algodão

Tanto para produção de peptidase, quanto de lipase, o fungo *F. oxysporum* demonstrou maior atividade no uso de FT como meio de crescimento. Os maiores picos de produção foram 228,88 U/mL para a atividade proteolítica e 111,48 U/mL para a atividade lipolítica, ambos em 96 horas. O uso dos dois substratos combinados não se mostrou interessante, contudo, o uso do FA isoladamente pode ser útil se o objetivo do processo for obter lipases em um extrato enzimático com menor conteúdo proteolítico.

Na utilização de resíduos agroindustriais, a natureza do substrato é um dos fatores que mais afeta o processo fermentativo. Além do conteúdo nutricional (fontes de carbono e nitrogênio), o tamanho e a forma das partículas do substrato são muito importantes, pois vão determinar o tamanho dos espaços interpartículas e o grau de continuidade entre elas. Isso está diretamente relacionado à penetração do microrganismo e à acessibilidade aos nutrientes, fatores que podem afetar o desempenho do processo (MITCHELL, KRIEGER, BEROVIC, 2006; TREICHEL et al., 2010; YIKE, 2011).

Nossos experimentos demonstraram que, visualmente, o FA pôde reter consideravelmente menos umidade que o FT durante o período de incubação. De acordo com Javed et al (2012) devido às suas características físicas, o FT tem capacidade de reter altos níveis de umidade. Experimentos de Rajmalwar & Dabholkar (2009) demonstraram que na produção de peptidases em FSS, a utilização de FA resultou em pior rendimento, quando comparado a outros cinco diferentes resíduos agroindustriais (soja, amendoim, gergelim, linhaça e mostarda), tanto em experimentos que utilizaram água, quanto nos que utilizaram outros diluentes como agentes umedificantes.

Segundo Bhargav et al. (2008), a maioria dos pesquisadores tem utilizado FT para da produção máxima de lipases. Javed et al (2011) ressalta que quase todos os tipos de enzimas podem ser obtidos utilizando FT como substrato, tanto para FSS, quanto para FSm. Este resíduo agroindustrial é rico em carboidratos, proteínas, lipídios e minerais e é de fácil aquisição, uma vez que as demandas mundiais por trigo são muito grandes e praticamente todos os países com cultura agrícola o produzem abundantemente (JAVED et al., 2011).

Esses resultados demonstram que a seleção do meio de cultura apropriado pode prover a produção enzimática desejada. Em adição, o estudo destaca a importância do FT para a produção de enzimas por fungos em FSS.

4.2 Caracterização do extrato enzimático

Mudanças nas condições ambientais em que a enzima se encontra podem alterar seu comportamento por favorecer ou prejudicar sua atividade temporaria ou permanentemente. Por exemplo, a alteração da estrutura enzimática compromete a complementaridade entre enzima e substrato, fazendo com que a enzima perca sua função (VOET & VOET, 2006).

Desse modo, diferentes situações foram avaliadas para determinação das melhores condições promotoras da atividade enzimática.

4.2.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade

No ensaio de atividade frente a diferentes valores de pH, as peptidases e lipases produzidas demonstraram maiores atividades em pH predominantemente alcalino (Figura 12). A melhor atividade lipolítica foi observada em pH 8,5. Já a atividade proteolítica apresentou maiores valores entre o pH de 6,0 e 8,5, intervalo no qual não houve diferença estatisticamente significativa entre as atividades (ANOVA, P < 0,05), indicando uma ampla faixa de pH de alta atividade proteolítica.

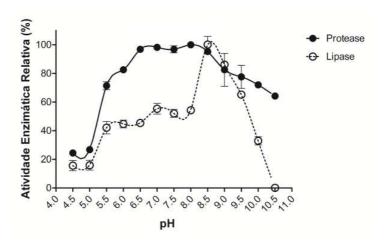


Figura 12. Efeito de pH na atividade de peptidases e lipases do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum* em bioprocesso de fermentação semissólida

Tais resultados estão em conformidade com outros estudos, que também demonstraram a produção de lipases com alta atividade em pH alcalino por *Fusarium globulosum* (GULATI et al., 2005) e *Fusarium oxysporum* (RIFAAT et al., 2010; PRAZERES, CRUZ, PASTORE, 2006). Estudos com *Fusarium culmorum* indicaram uma produção de peptidases com atividade ótima em faixa de pH alcalino (PEKKARINEN, JONES, NIKU-PAAVOLA, 2002).

Para estabilidade proteolítica, a menor estabilidade, no período de 24h, foi observada entre os valores de pH 7,5 a 9,5 (média de 88,03%) , intervalo no qual não há diferença estatisticamente significativa (ANOVA, P < 0,05). Parte da faixa de pH de atividade ótima

(6,5-8,5) se encontra nesse intervalo. Para estabilidade lipolítica não há diferença estatisticamente significativa (ANOVA, P < 0,05) na faixa de pH de 4,5 a 6,5 e observa-se a menor estabilidade no pH 8,5, com atividade lipolítica de 60,27%. Este é justamente o valor de pH em que há atividade ótima (Figura 13).

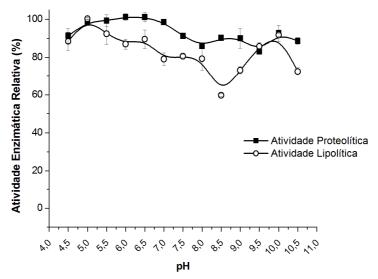


Figura 13. Efeito do pH na estabilidade de peptidases e lipases do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum* em bioprocesso de fermentação semissólida

Pekkarinen et al. (2002) observou que a faixa de pH de 8,3 a 9,6 apresentou maior atividade proteolítica para *Fusarium culmorum* e que no ensaio de estabilidade, toda atividade foi perdida no pH 8,5. Possivelmente, nos valores de pH em que há melhor atividade, as enzimas encontram-se em conformação de reação, com o sítio ativo exposto, ficando mais susceptíveis à ação proteolítica de outras enzimas e consequentemente menos estáveis. O autor destaca que a albumina do soro bovino e, supostamente, outras proteínas, aparentemente protegem a peptidase de autólise ou inibem mudanças conformacionais que diminuiriam a sua estabilidade.

4.2.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade

Quanto ao efeito da temperatura, a 40°C, o EE apresentou condição ótima de reação lipolítica, demonstrando uma brusca queda de atividade com o aumento de temperatura (Figura 14). Produção de lipases por *F. oxysporum* com atividade ótima em temperaturas

próximas a 40°C também foi observada por Hoshino et al. (1992). Para peptidases, a faixa de temperatura entre 55 e 75°C apresentou os maiores valores de atividade e nesta faixa não houve diferença estatisticamente significativa (ANOVA, P < 0,05).

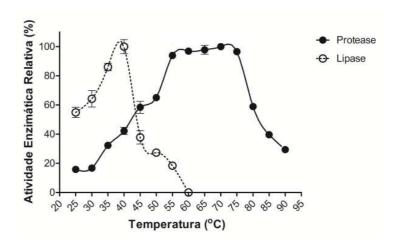


Figura 14. Efeito da temperatura na atividade de peptidases e lipases do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum* em bioprocesso de fermentação semissólida

Para verificar o efeito de inativação das enzimas mediante aumento de temperatura, estas foram submetidas à incubação em diferentes temperaturas antes de realizar o ensaio de atividade. A estabilidade das enzimas é demonstrada na Figura 15.

O perfil de estabilidade térmica da peptidase indica alta estabilidade em temperaturas até 45°C, mantendo aproximadamente 70% de atividade residual após 60 minutos de incubação a 45°C. Já para incubação a 50°C, a atividade cai para 40% após 30 minutos. Estudos de Pekkarinen et al. (2002) apontaram que a peptidase produzida por *Fusarium culmorum* apresentou instabilidade ao ser incubada em temperaturas a partir de 45°C.

Para lipases é demonstrada maior estabilidade em temperaturas até 40°C. Após 60 minutos, observa-se aproximadamente 60% de atividade remanescente após incubação a 40°C e 50% de atividade a 45°C. Maia et al. (1999), observou a maior estabilidade nas temperaturas de 25 e 30°C para lipases produzidas por *Fusarium solani*, com inativação da enzima após incubação em 40°C por 60 minutos.

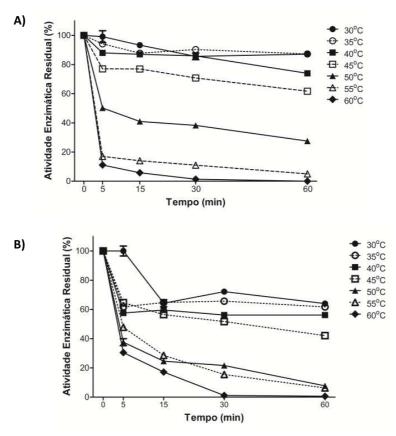


Figura 15. Efeito da temperatura na estabilidade de A) peptidases e B) lipases do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxyxporum* em bioprocesso de fermentação semissólida

A análise desses parâmetros é importante para o planejamento de temperatura e tempo de exposição durante os processos industriais e o armazenamento do produto. Para garantir um considerável aumento da estabilidade das enzimas, sugere-se retirar a água do meio enzimático, por meio de técnicas que possibilitem que estas estejam em formulações sólidas em detrimento de formulações líquidas (AMERI & MAA, 2006; NAMALDI, ÇALIK, ULUDAG, 2006).

4.2.3 Efeito de inibidores e íons

O estudo de inibição enzimática possibilita determinar as classes de peptidases quanto ao mecanismo de ação catalítica em serino, aspártico, cisteíno e metalopeptidase (DUNN, 1989). Além da avaliação do efeito de inibidores na atividade proteolítica, também foi estudado o efeito de tais inibidores na atividade lipolítica (Figura 16).

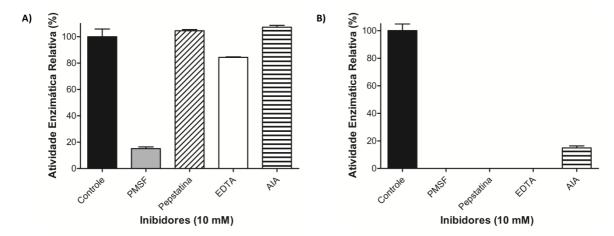


Figura 16. Efeito de inibidores nas atividades A) proteolítica e B) lipolítica do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxyxporum* em bioprocesso de fermentação semissólida. AIA = Ácido Iodoacético

Os resultados demonstraram que a atividade proteolítica foi fortemente inibida por PMSF, indicando que a peptidase produzida pertence à classe das serinopeptidases. Isso está de acordo com o estudo de Pekkarinen et al. (2002) para a peptidase produzida pelo fungo *Fusarium culmorum*. As serinopeptidases são o grupo de enzimas mais conhecido, por ser estudado há mais de 50 anos e é um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, uma vez que representa cerca de 35% das vendas de enzimas microbianas. A aplicação principal destas enzimas está na indústria dos detergentes (NAMALDI et al., 2006; VOET & VOET, 2006).

Foi observada modulação negativa da atividade lipolítica em presença de todas as substâncias estudadas. Segundo Sharma et al. (2001) lipases são "serino hidrolases". Brady et al. (1990) indica em seus estudos que a tríade catalítica da lipase é composta por três aminoácidos – Ser, His, Asp (ou Glu) – os mesmos que serinopeptidase, e que o PMSF inibe as lipases por possuírem a serina como resíduo ativo. A inibição da lipase por ácido iodoacético também foi observada por outros autores (WEINSTEIN, WYNNE, 1935; LIU et al., 2008). Segundo Shariff et al. (2011), a lipase de *Bacillus* sp. foi totalmente inibida com 5 mM de pepstatina, o que indica que é possível que esta substância iniba algumas lipases.

Embora não explique o mecanismo de ação, um trabalho de revisão de Pahoja & Sethar (2002) descreve experimentos de pelo menos seis autores em que a atividade lipolítica foi fortemente inibida por EDTA. O efeito de total inibição das enzimas estudadas por EDTA está de acordo com os resultados encontrados nos ensaios de atividade enzimática frente a

íons (Figura 17), já que esta substância é quelante de íons e estes podem atuar como estabilizadores ou ativadores das enzimas.

No estudo sobre o efeito de íons metálicos na atividade proteolítica e lipolítica (Figura 17), observou-se modulação positiva da atividade para a maioria dos íons em ambas as enzimas (lipases e peptidases), exceto com os íons Ni^{2+} e Cu^{2+} que modularam negativamente a atividade proteolítica, reduzindo a atividade enzimática respectivamente a 36% e 53%. Para a atividade proteolítica não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e os ensaios com Mn^{2+} e Al^{3+} , enquanto para a atividade lipolítica, não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum dos íons estudados (ANOVA, $\mathrm{P} > 0.05$).

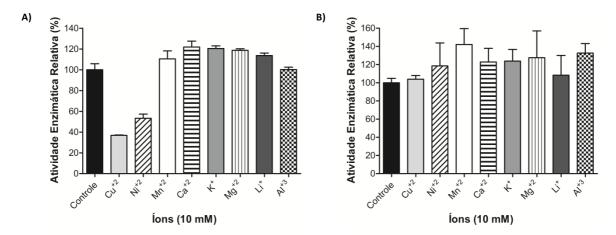


Figura 17. Efeito de íons nas atividades A) proteolítica e B) lipolítica do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxyxporum* em bioprocesso de fermentação semissólida

Íons podem ligar-se a resíduos de aminoácidos e influenciar na estrutura da proteína, sendo determinantes na atividade e estabilidade da enzima (MERHEB-DINI et al., 2009). Para serem capazes de realizar certas reações, algumas enzimas associam-se a pequenas moléculas que funcionam como co-fatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas (VOET & VOET, 2006).

Tanto o estudo de efeito de inibidores quanto o de efeito de íons é de grande importância, uma vez que, além de elucidar o mecanismo de ação das enzimas, esses dados sugerem o possível comportamento das enzimas mediante a utilização de reagentes e componentes biológicos na formulação pretendida para o produto final (YIKE, 2011).

4.2.4 Efeito de surfactantes

Por fim, foi analisada a atividade enzimática frente a quatro diferentes tipos de surfactantes: um catiônico (CTAB), um aniônico (SDS) e dois não iônicos (Tween[®]80 e TritonTMX-100) (Figura 18).

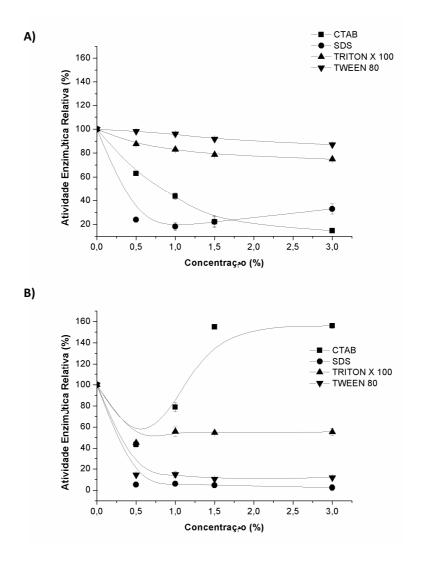


Figura 18. Efeito de surfactantes nas atividades A) proteolítica e B) lipolítica do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxyxporum* em bioprocesso de fermentação semissólida

Na maior concentração de surfactantes (3,0%), a atividade proteolítica foi mantida em 87,02% com Tween[®]80 e 74,94% com TritonTMX-100. Já para SDS, a atividade foi fortemente inibida em todas as concentrações, mas apresentou um ligeiro aumento na concentração 3,0%. O CTAB a 0,5% manteve 62,94% da atividade, apresentando queda de atividade com o aumento da concentração.

Nos experimentos com lipases, o TritonTMX-100 manteve a atividade em torno de 50%, sem diferença estatisticamente significativa entre as concentrações analisadas (ANOVA, P > 0,05). SDS e Tween[®]80 promoveram forte inibição da lipase. Já o CTAB apresentou resultados bastante interessantes – aumento da atividade para 155,99%.

Um trabalho de revisão de Pahoja & Sethar (2002) descreve experimentos de quatro autores em que lipases foram inibidas por TritonTM100-X, um por Tween-80 e um por SDS. Estudos de Alfani et al. (2000), apontam "superatividade" da α-quimotripsina (uma serinopeptidase), quando exposta a um meio rico em CTAB. Segundo o autor, esse comportamento de promoção da atividade pode ser explicado pelo fenômeno de micelas reversas ou por uma mudança conformacional na enzima, tendo como resultado maior afinidade pelo substrato.

Surfactantes são compostos anfifílicos que podem reduzir a superfície e as tensões interfaciais de fluidos imiscíveis. Com isso, são capazes de aumentar a solubilidade, mobilidade, disponibilidade, e subsequente degradação de compostos orgânicos hidrofóbicos ou insolúveis (VAN HAMME, SINGH, WARD, 2006). Por esse motivo, são amplamente utilizados nas formulações de detergentes. Os valores de atividade enzimática das lipases e peptidases alcalinas produzidas pelo fungo *F. oxysporum*, indicam um considerável potencial de aplicação dessas enzimas na indústria de detergentes. Contudo, os ensaios de efeito dos surfactantes indicam que a escolha do tipo de surfactante para formulação deve ser de acordo com o objetivo de maior atuação proteolítica ou lipolítica do produto. Outra alternativa é a formulação de sofisticados detergentes enzimáticos sem surfactantes sintéticos. Esses detergentes encontram aplicação em limpeza a seco, produtos para lavar louça, limpeza de tubulações e tratamento de efluentes, desengordurantes, entre outros (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

Além da indústria de detergentes, outras possíveis aplicações para enzimas alcalinas são indústria de couro, indústria de papel, agroquímicos, síntese de biopolímeros e biodísel (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

4.3 Fracionamento por etanol

Para diminuir a quantidade de impurezas do extrato antes do processo de microencapsulação, este foi submetido a uma purificação parcial com etanol (92,6°GL). A proporção de extrato de fermentação:etanol com melhor condição de precipitação foi 1:2.

4.4 Microencapsulação

O experimento de secagem do EE isolado (rendimento = 29,06%) e da sua combinação com manitol (1:1) (rendimento = 4,68%) produziu um pó que se tornou uma massa viscosa em contato com o ar e durante o manuseio. Assim, novos ensaios foram realizados utilizando dextrina e Aerosil® como adjuvantes.

4.4.1 Estabilidade das micropartículas de extrato enzimático

A estabilidade, tanto do EE quanto das micropartículas, foi avaliada pela quantificação da atividade enzimática. Os resultados são apresentados como porcentagem de atividade mantida em relação à atividade inicial do EE, avaliada antes do processo de microencapsulação.

Após 15 dias, o EE não encapsulado havia perdido toda a sua atividade quando armazenado à temperatura ambiente. Após 30 dias sob refrigeração, manteve apenas 57,90 e 36,45% da atividade proteolítica e lipolítica respectivamente (Figura 19).

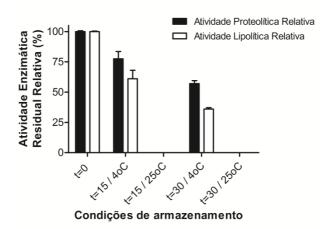


Figura 19. Estabilidade do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum* em diferentes condições de armazenamento (4 e 25°C)

Para as micropartículas, não houve correlação efetiva entre EE/Ad e a atividade enzimática ou entre Ar/Dx e atividade enzimática. Por outro lado, a temperatura de secagem demonstrou uma influência importante (Figura 20), indicando que as altas temperaturas não são recomendadas, já que podem inativar as enzimas. O efeito de degradação enzimática por altas temperaturas de secagem também foi observado por Namaldi et al. (2006), na microencapsulação de serinopeptidases de *Bacillus subtillis* e por Cui et al. (2006) utilizando transglutaminases de *Streptomyces hygroscopicus*.

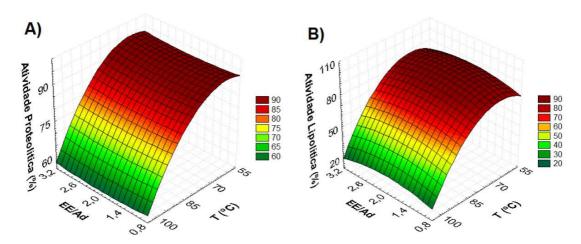


Figura 20. Superfície de resposta para A) Atividade proteolítica e B) Atividade lipolítica das micropartículas do extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxyxporum*

Dados de atividade enzimática (Tabela 6 e Tabela 7) indicam claramente que a técnica de microencapsulação aumenta a estabilidade das enzimas, quando comparada à estabilidade do EE não processado (Figura 19).

Os resultados apontam uma queda de atividade enzimática imediatamente após o processo de microencapsulação do EE, seguida por ligeira queda até 30 dias de armazenamento. Após o processo, a diminuição foi menor nos experimentos com utilização de temperaturas mais brandas.

Pode-se dizer que a partir de 30 dias houve uma estabilidade na preservação da atividade enzimática, já que não existe diferença estatisticamente significativa (ANOVA, P <

0,05) entre os valores de atividade observados para uma mesma amostra armazenada sob as mesmas condições, nos diferentes tempos analisados (30, 60 e 120 dias).

Isso pode ser explicado pela morfologia das micropartículas. Em geral, as micropartículas produzidas por *spray drying* são matriciais, ou seja, uma mistura molecular entre a substância ativa e os agentes encapsulantes (RÉ, 1998). Desse modo, existem enzimas tanto na superfície, quanto no interior de cada partícula. Assim, no início do armazenamento, devido ao seu contato com o ambiente externo, as enzimas da superfície começaram a ser rapidamente inativadas até o tempo de 30 dias, enquanto as enzimas localizadas no interior foram preservadas. A presença de proteínas na superfície dos pós produzidos por *spray drying* e sua relação com a atividade enzimática remanescente também foi apontada por Millqvist-Fureby et al. (1999), na microencapsulação de tripsina com diferentes carboidratos.

Após 120 dias, os maiores valores residuais de atividade proteolítica observados foram 91,62% sob refrigeração (experimento 10) e 85,99% à temperatura ambiente (experimento 9). Para atividade lipolítica obteve-se o máximo de 85,75% sob refrigeração (experimento 10) e 77,72% à temperatura ambiente (experimento 9). Apesar de que para a maioria das amostras houve diferença na preservação da atividade nas diferentes condições de armazenamento, a escolha de refrigeração deve ser ponderada, levando-se em consideração o custo e diferença de atividade mantida nas duas condições, uma vez que há uma forte tendência de preservação da enzima após 30 dias de armazenamento.

Cabe ressaltar ainda que essa análise é válida apenas para o armazenamento das micropartículas do EE e não devem ser extrapoladas para o produto no qual elas podem ser aplicadas, uma vez que interações com outros componentes da formulação e características como pH do produto podem interferir na estabilidade enzimática.

Tabela 6. Estabilidade das peptidases nas micropartículas após armazenamento a 4 e 25°C.

Ensaios realizados nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 dias de armazenamento

| dias | 25°C | 73,09 | 78,80 | 76,50 | 76,94 | 86,41 | 87,05 | 43,65 | 47,63 | 85,99 | 80,67 | 47,39 | 56,52 | 70,08 | 64,75 | 66,30 |
|--------------|------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| t = 120 dias | 4°C | 85,15 | 87,09 | 87,01 | 86,82 | 88,16 | 89,24 | 53,87 | 60*55 | 89,88 | 91,62 | 28,80 | 69,26 | 62.08 | 79,30 | 83,88 |
| dias | 25°C | 73,16 | 79,58 | 76,93 | 77,48 | 86,22 | 88,12 | 45,35 | 48,99 | 86,80 | 81,36 | 46,74 | 59,14 | 70,03 | 65,62 | 66,67 |
| t = 60 dias | 4°C | 85,76 | 87,81 | 87,54 | 87,65 | 88,80 | 89,74 | 54,36 | 58,20 | 89,54 | 92,52 | 66'09 | 70,94 | 81,44 | 79,59 | 84,01 |
| dias | 25°C | 72,80 | 80,24 | 77,81 | 96'11 | 87,39 | 88,30 | 48,33 | 92,05 | 86,60 | 81,16 | 50,91 | 60,64 | 69,91 | 66,26 | 67,17 |
| t = 30 dias | 4°C | 86,17 | 87,54 | 87,39 | 87,23 | 91,34 | 92,10 | 55,93 | 59,27 | 90,43 | 93,62 | 62,31 | 72,64 | 82,52 | 79,33 | 84,50 |
| dias | 25°C | 83,59 | 88,15 | 85,87 | 85,87 | 90'68 | 90,12 | 55,78 | 56,23 | 87,84 | 90'68 | 59,42 | 00'69 | 60,08 | 74,62 | 77,81* |
| t = 15 dias | 4°C | 88,45 | 88,30 | 89,51 | 88,15 | 93,62 | 91,95 | 57,75 | 60,18 | 91,34 | 93,77 | 63,83 | 72,49 | 83,89 | 78,88 | 85,87* |
| - | 2-1 | 86,63 | 91,19 | 91,79 | 91,19 | 94,53 | 92,71 | 61,55 | 88*65 | 93,31 | 92,55 | 64,74 | 74,62 | 84,19 | 81,31 | 85,71 |
| Experimento | | | CA | (T) | 48 | w | 9 | 7 | 90 § | જ | 01 | = | 12 | 13 | 14 | 15 |

Tabela 7. Estabilidade das lipases nas <u>micropartículas</u> após armazenamento a <u>4</u> e 25ºC.

| de armazenamento |
|---------------------------------|
| dias |
| 120 |
| 60 e |
| , 30, |
| 15 |
| Ensaios realizados nos tempos 0 |

| S | 25°C | 80,09 | 58,19 | 64,26 | 66,93 | 66,01 | 68,48 | 25,99 | 26,18 | 77,72 | 71,47 | 26,16 | 27,24 | 69,51 | 72,24 | 68,48 |
|--------------|------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t = 120 dias | 13 | 99 | 58 | 99 | 99 | 99 | 89 | 25 | 26 | 77 | 7.1 | 26 | 27 | 69 | 72 | 89 |
| t=1 | 4°C | 73,83 | 73,74 | 77,80 | 75,67 | 72,81 | 79,75 | 21,73 | 36,88 | 84,69 | 85,75 | 34,76 | 35,71 | 84,76 | 79,68 | 77,67 |
| t = 60 dias | 25°C | 62°29 | 86*85 | 63,96 | 67,93 | 62,79 | 58*69 | 27,33 | 27,59 | 78,15 | 71,41 | 28,44 | 28,66 | 09*69 | 72,96 | 68,74 |
| t = 6 | 4°C | 74,27 | 74,52 | 78,14 | 76,43 | 73,95 | 80,94 | 23,94 | 38,68 | 85,71 | 85,37 | 36,26 | 37,95 | 85,51 | 80,66 | 77,73 |
| t = 30 dias | 25°C | 67,16 | 59,36 | 67,84 | 66,75 | 66,23 | 89'69 | 27,45 | 30,06 | 79,13 | 71,93 | 29,23 | 31,99 | 70,65 | 72,00 | 71,70 |
| t=3 | 4°C | 75,83 | 75,04 | 77,66 | 75,53 | 74,70 | 81,00 | 25,48 | 39,64 | 85,39 | 86,63 | 38,06 | 39,23 | 87,10 | 80,36 | 79,84 |
| t = 15 dias | 25°C | 08'69 | 08'89 | 72,20 | 69,20 | 72,60 | 79,20 | 31,80 | 38,60 | 86,00 | 80,00 | 37,20 | 37,60 | 77,40 | 76,80 | 77,40 |
| t = 1: | 4°C | 76,00 | 77,60 | 76,80 | 77,60 | 76,00 | 81,40 | 35,40 | 41,20 | 90,40 | 85,40 | 38,40 | 39,40 | 85,40 | 79,40 | 80,00 |
| 0 - + | | 79,60 | 75,40 | 82,60 | 77,80 | 84,40 | 85,40 | 39,00 | 43,00 | 97,20 | 84,40 | 40,20 | 40,00 | 86,20 | 89,80 | 81,40 |
| озиэші | | ۲, | (7) | ₩ | જ | ő | ĩ | 00 3 | o∛ | 10 | :: | 12 | 13 | 14 | 15 | |
| | | | | (| %) t | soiti | loqi | т әр | sbiv | üΑ | | | | | | |

4.4.2 Caracterização física das micropartículas de extrato enzimático

A Tabela 8 demonstra a caracterização física das micropartículas obtidas por *spray drying* e o rendimento dos experimentos. Mesmo que não exista diferença estatisticamente significativa (ANOVA, P < 0,05) entre os ensaios realizados a 80 e 100°C, há uma tendência de correlação positiva entre a temperatura e os rendimentos.

Tabela 8. Caracterização física das micropartículas de extrato enzimático produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum*

| Experimento | | s Fatoriais Codificado | | Rendimento | FH | IC | Ângulo de Repouso (α) | Umidade | |
|-------------|-------|---------------------------|--------|------------|------|-------|--------------------------|---------|--|
| Ехре | EE/Ad | Ar/Dx | T (°C) | (70) | | | Repouso (u) | (70) | |
| 1 | 3/1 | 3/1 | 80 | 60,94 | 1,14 | 12,53 | 33,67 | 4,36 | |
| 2 | 1/1 | 3/1 | 80 | 60,00 | 1,17 | 14,72 | 30,97 | 4,41 | |
| 3 | 3/1 | 1/1 | 80 | 61,50 | 1,18 | 14,98 | 31,29 | 4,25 | |
| 4 | 1/1 | 1/1 | 80 | 62,81 | 1,13 | 11,73 | 30,54 | 4,38 | |
| 5 | 3/1 | 2/1 | 60 | 52,56 | 1,10 | 8,84 | 35,28 | 4,72 | |
| 6 | 1/1 | 2/1 | 60 | 53,69 | 1,16 | 13,90 | 30,97 | 4,63 | |
| 7 | 3/1 | 2/1 | 100 | 62,38 | 1,12 | 10,56 | 36,31 | 3,83 | |
| 8 | 1/1 | 2/1 | 100 | 62,51 | 1,12 | 10,46 | 35,18 | 3,66 | |
| 9 | 2/1 | 3/1 | 60 | 53,94 | 1,14 | 12,33 | 36,62 | 4,67 | |
| 10 | 2/1 | 1/1 | 60 | 57,75 | 1,09 | 8,66 | 34,56 | 4,54 | |
| 11 | 2/1 | 3/1 | 100 | 61,06 | 1,10 | 8,91 | 31,87 | 3,44 | |
| 12 | 2/1 | 1/1 | 100 | 63,00 | 1,08 | 7,14 | 34,03 | 3,37 | |
| 13 | 2/1 | 2/1 | 80 | 62,81 | 1,16 | 13,98 | 34,66 | 4,29 | |
| 14 | 2/1 | 2/1 | 80 | 61,31 | 1,15 | 13,33 | 34,24 | 4,35 | |
| 15 | 2/1 | 2/1 | 80 | 61,60 | 1,17 | 14,25 | 34,56 | 4,32 | |

EE/Ad = Extrato enzimático/Adjuvante; Ar/Dx = Aerosil/Dextrina;

T=temperatura; FH=Fator de Hausner; IC=Índice de Carr

De acordo com observações de Tewa-Tagne et al. (2007), a utilização de dióxido de silício coloidal como agente de secagem no processo de encapsulação proporciona um aumento de rendimento em comparação ao processo sem o agente. Em nossos estudos, os rendimentos dos experimentos foram consideravelmente superiores aos obtidos nos ensaios preliminares – secagem do EE isolado (rendimento = 29,06%) e da sua combinação com manitol (1:1) (rendimento = 4,68%).

Foi observada a influência do dióxido de silício também na morfologia das micropartículas (Figura 21). Ensaios que utilizaram o adjuvante em maior concentração apresentaram micropartículas com forma esférica mais uniforme e com aspecto mais áspero do que as micropartículas dos ensaios com menor concentração do adjuvante.

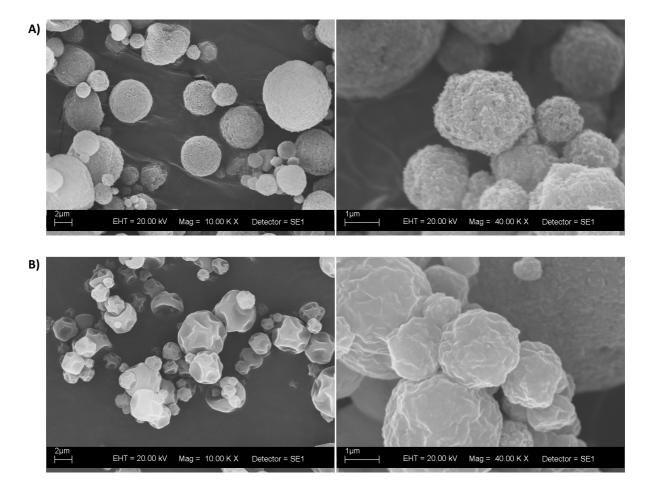


Figura 21. Aspecto das micropartículas observadas por MEV. A) Micropartículas obtidas em experimento com alta concentração de dióxido de silício (experimento 2); B) Micropartículas obtidas em experimento com baixa concentração de dióxido de silício (experimento 3)

Ainda segundo Tewa-Tagne et al. (2007), quando a concentração de sílica não é suficiente, ocorre a obtenção de partículas caracterizadas por formas irregulares e com grande adesividade.

Quanto aos valores de FH e IC, de acordo com Guo, Beddowa e Vette (1985), materiais com valores de FH e IC abaixo de 1,25 e 15, respectivamente, possuem características de boa compressão e todas as amostras cumprem esses requisitos. No que diz respeito ao ângulo de repouso, já que os ângulos abaixo de 40° indicam fluxo livre, todas as

formulações apresentaram bom fluxo. Esses parâmetros são muito importantes quando se considera o escalonamento, já que em diversos processos industriais é necessário o transporte de pós, alimentação de equipamentos, enchimento de matrizes, empacotamento uniforme, compressão, e outras atividades que dependem dessas propriedades das partículas (AULTON, 2006).

O teor de umidade foi determinado logo após o processo de microencapsulação e foi baixo para todas as amostras (cerca de 4%). Esta é uma característica fortemente desejável, uma vez que a diminuição da concentração de água livre aumenta a estabilidade das enzimas durante estocagem (AMERI & MAA, 2006; NAMALDI, ÇALIK, ULUDAG, 2006).

Embora armazenadas em recipientes plásticos bem fechados, após 30 dias, as amostras 1, 3, 5 e 7 apresentaram aspecto granulado quando observadas a olho nu. Enquanto as outras amostras permaneceram como pó fino e aumentaram a umidade em menos de 1% no período, as amostras dos ensaios 1, 3, 5 e 7 apresentaram aumento dos níveis de umidade para cerca de 11% (Figura 22).

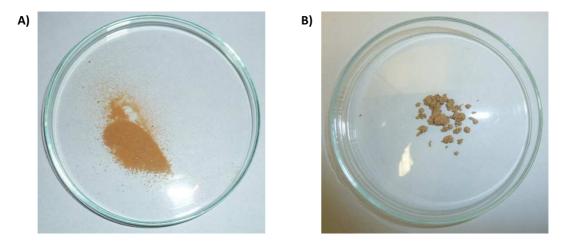


Figura 22. Aspecto dos pós após 30 dias de armazenamento em recipientes plásticos vedados. A) Micropartículas obtidas em experimento com alta concentração de adjuvantes (experimento 2); B) Micropartículas obtidas em experimento com baixa concentração de adjuvantes (experimento 3)

Imagens de MEV demonstraram que após 30 dias de armazenamento, as amostras dos ensaios que utilizaram os adjuvantes em maior concentração apresentaram menor aglomeração entre as partículas do que as amostras que continham baixa concentração de adjuvantes (Figura 23).

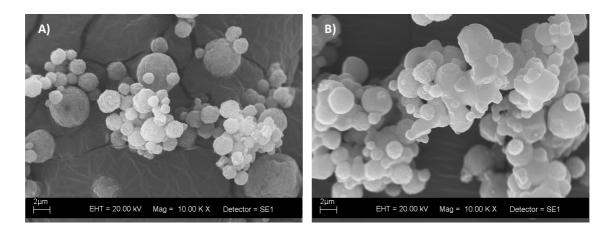


Figura 23. Aspecto das micropartículas observadas por MEV após 30 dias de armazenamento em recipientes plásticos vedados. A) Micropartículas obtidas em experimento com alta concentração de adjuvantes (experimento 2); B) Micropartículas obtidas em experimento com baixa concentração de adjuvantes (experimento 3)

De acordo com os valores de atividade enzimática das amostras que mudaram seu aspecto (amostras 1, 3, 5 e 7) após armazenamento (Tabelas 6 e 7), infere-se que as enzimas encapsuladas não foram consideravelmente afetadas. Provavelmente a umidade adquirida foi adsorvida nas micropartículas, causando a aglomeração observada e afetando as enzimas localizadas na superfície, enquanto as enzimas no interior foram mais preservadas.

Em conjunto, estes resultados destacam a importância de se observar a formulação quanto à concentração de adjuvantes em relação à concentração de extrato enzimático para que sejam obtidas as melhores condições de armazenamento, transporte e manuseio do produto.

5. CONCLUSÕES

O estudo sobre a utilização de resíduos agroindustriais para produção de peptidases e lipases pelo fungo *Fusarium oxysporum* em bioprocesso de fermentação semissólida demonstrou maior produção de enzimas no uso de farelo de trigo como meio de crescimento do que no uso de farelo de algodão ou a mistura dos dois substratos. Os picos de atividade foram 228,88 U/mL para a atividade proteolítica e 111,48 U/mL para a atividade lipolítica, ambos em 96 h. Os resultados permitem dizer que a produção enzimática desejada pode ser alcançada pela seleção adequada do meio de cultura mais apropriado.

A caracterização das enzimas permitiu classificar a peptidase como serinopeptidase e observou a inibição da lipase por todos os inibidores estudados. Ambas enzimas são alcalinas, com atividade ótima entre o pH de 6,0 e 8,5 para peptidase e no pH 8,5 para lipase. A estabilidade enzimática frente ao pH foi determinada por exposição no período de 24 h e demonstrou atividade residual mínima de 88,03% para peptidase (pH 7,5 – 9,5) e de 60,27% em pH 8,5. A temperatura ótima proteolítica foi na faixa 55 a 75 °C, enquanto a lipolítica foi de 40 °C. O perfil de estabilidade térmica da peptidase indicou cerca de 70% de atividade remanescente após 60 minutos de incubação a 45°C e cerca de 60% para lipase. Para ambas as enzimas, observou-se modulação positiva da atividade frente à maioria dos íons estudados, com exceção de Ni²⁺ e Cu²⁺ para peptidase. O surfactante SDS promoveu forte inibição das duas enzimas. O Tween®80 também provocou inibição da lipase, enquanto o CTAB promoveu uma superatividade, chegando a 155,99%. A caracterização enzimática permite sugerir a aplicação industrial dessas enzimas em detergentes enzimáticos com ou sem surfactantes sintéticos, além da indústria de couro, indústria de papel, agroquímicos, síntese de biopolímeros e biodísel.

Os resultados da microencapsulação por *spray drying* demonstraram que esta é uma técnica importante para melhorar a manipulação e estabilidade das enzimas produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*, com conservação de até 91,62% da atividade proteolítica e 85,75% da atividade lipolítica após 120 dias de armazenamento. As micropartículas obtidas apresentaram boas propriedades de fluxo e baixa umidade. A temperatura do processo foi a condição operacional mais importante para a estabilidade, enquanto a quantidade de adjuvantes em relação à quantidade de extrato enzimático influenciou nas condições de manipulação. O estudo destacou que a seleção dos parâmetros de processo e formulação

adequados pode fornecer as características mais desejadas para o uso industrial das micropartículas produzidas.

Com adaptações apropriadas, os resultados obtidos nesse estudo podem ser extrapolados para outros experimentos com diferentes fungos e enzimas.

6. REFERÊNCIAS

ALFANI, F.; CANTARELLA, M.; SPRETI, N.; GERMANI, R.; SAVELLI, G. α-Chymotrypsin Superactivity in Cetyltrialkylammonium Bromide-Rich Media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 88, p. 1 – 15, 2000.

AMERI, A.; MAA, Y. F. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 763 – 768, 2006.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 240 – 251, 2007.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C; RIELLY, C. D.; STAPLEY, A. G. F. Effects of Process Variables on the Denaturation of Whey Proteins during Spray Drying. **Drying Technology**, v. 25, p. 799 – 807, 2007.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulamento de Antocianinas: uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, ano IX, n. 36, p. 18 – 24, 2006.

BHARGAV, S. PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED. S. Solid-state Fermentation: An Overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 49 – 70, 2008.

BRADY, L. BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSE, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, 767-770, 1990.

CUERO, R. G.; SMITH, J. E.; LACEY, J. A novel containment system for laboratory – scale solid particulate Fermentations. **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 7, p. 463 – 466, 1985.

DAIGLE, D. J.; CONNICK JR., W. J.; BOYETTE, C. D.; JACKSON, M. A.; DORNER, J. W. Solid-state fermentation plus extrusion to make biopesticide granules. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 10, p. 715 – 719, 1998.

DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. **Industrial Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 269 – 283, 2007.

DENISOV, Y.; FREEMAN, S.; YARDEN, O. Inactivation of Snt2, a BAH/PHD-containing transcription factor, impairs pathogenicity and increases autophagosome abundance in *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology,** v. 12, n. 5, p. 449 – 461, 2011.

DEPAZ, R. A.; DALE, D. A.; BARNETT, C. C.; CARPENTER, J. F.; GAERTNER A. L.; RANDOLPH, T. W. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 765 – 774, 2002.

DUCROS, E.; FERRARI, M.; PELLEGRINO, M.; RASPANTI, C.; BOGNI, C. Effect of aeration and agitation on the peptidase production by *Staphylococcus aureus mutant* RC128 in a stirred tank bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 143-148, 2009.

DUNN, B.M. Determination of Protease Mechanism. In: BEYNON, R.J.; BOND J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach.** New York: Oxford University, 1989.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochemical **Engineering Journal**, v. 13, p. 113 – 125, 2003.

ESLAMIAN, M.; AHMED, M.; ASHGRIZ, N. Modeling of Solution Droplet Evaporation and Particle Evolution in Droplet-to-Particle Spray Methods. **Drying Technology**, v. 27 n. 1, p. 3 – 13, 2009.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103 – 223, 2008.

FREEDONIA GROUP. **World Enzymes to 2015**. Cleveland, 2011. Disponível em: http://www.freedoniagroup.com/DocumentDetails.aspx?ReferrerId=FG-01&studyid=2824>. Acesso em 20/01/2012.

FREITAS, L. A. P.; ANDRADE, T. C.; TEIXEIRA, C. C.; TACON, L. A.; TSUKADA, M. Innovative applications of spray drying. In: SAN JOSÉ, M. J. **Advances in Chemical Engineering.** Kerala: Transworld Research Network, 2010, v. 1, p. 1-13.

GULATI, R., ISAR, J., KUMAR, V., PRASAD, A. K., PARMAR, V. S. SAXENA, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 251 – 262, 2005.

GUO, A., BEDDOWA, J. K.; VETTE, A. F. A simple relationship between particle shape effects and density, flow rate and hausner ratio. **Powder Technology**, v. 43, n. 3, 279 – 284, 1985.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology** and **Biotechnology**, v. 60, p. 381-395, 2002.

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme** and Microbial Technology, v. 39, n. 2, p. 235 – 251, 2006.

HOSHINO, T., SASAKI, T., WATANABE, Y., NAGASAWA T, YAMANE, T. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 4, p. 660 – 664, 1992.

HSIEH, C.; YANG, F. G. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 105 – 109, 2004.

JAVED, M. M.; ZAHOOR, S., SHAFAAT, S.; MEHMOODA, I.; GUL, A.; RASHEED, H.; BUKHARI, A. I.; AFTAB, M. N.; IKRAM-UL-HAQ. Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. **African Journal of Microbiology Research,** v. 6, n. 4, p. 724 – 733, 2012.

KANWAR, S. S.; KAUSHAL, R. K.; JAWED, A.; GUPTA, R.; SWAPANDEEP, S. C. Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: A comparative study. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 42, p. 233 – 237, 2005.

KAVANAGH, K. Fungi – biology and applications. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2005.

LARKIN, R. P.; HOPKINS, D. L.; MARTIN, F. N. Effect of Successive Watermelon Plantings on *Fusarium oxysporum* and other Microorganism in Soils Suppressive and Conductive to *Fusarium* Wilt of Watermelon. **Ecology and Epidemiology**, v. 83, n. 10, p. 1097 – 1105, 1993.

LEMANCEAU, P.; PETER A. H. M. BAKKER, P. A. H. M.; JAN DE KOGEL, W.; ALABOUVETITE, C.; SCHIPPERS, B. Antagonistic Effect of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 upon Pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 74-82, 1993.

LIEVENSE, L. C.; VAN'T RIET, K. **Advances in Biochemical Engineering**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg., 1993.

LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, JING. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 445 – 451, 2008.

LOTONG, N.; SUWANARIT, P. Production of Soy Sauce Koji Mold Spores Spore Inoculum in Plastic Bags. **Apllied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1224 – 1226, 1983.

MAIA, M. M. D.; MORAIS, M. M. C.; MORAIS, M. A.; MELO, E. H. M.; LIMA FILHO, J. L.; Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia,** v. 30, p. 304 – 309, 1999.

MARTINS, R. M.; PEREIRA, S. V.; SIQUEIRA, S. S.; SALOMÃO, W. F.; FREITAS, L. A. P. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing

turmeric extract. **Food Research International**, 2011. No prelo. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.03

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, C.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLI, L. M.; OKAMOTO, D. N.; RODRIGUEZ, G. O. B.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9210 – 9217, 2009.

MEZHERICHER, M; LEVY, A.; BORDE, I. Theoretical Drying Model of Single Droplets Containing Insoluble or Dissolved Solids. **Drying Technology**, v. 25, n. 6, p. 1025 – 1032, 2007.

MILLQVIST-FUREBY, A.; MALMSTEN, M.; BERGENSTÅHL, B. Spray-drying of trypsin — surface characterisation and activity preservation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 188, p.243 – 253, 1999.

MISRA, A. K.; MISHRA, A. S.; TRIPATHI, M. K.; PRASAD, R.; VAITHIYANATHAN, S.; JAKHMOLA, R. C. Optimization of Solid State Fermentation of Mustard (*Brassica campestris*) Straw for Production of Animal Feed by White Rot Fungi (*Ganoderma lucidum*). **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 20, n. 2, 208 – 213, 2007.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals of design and operation. **Springer-Verlag Nerlin Heidelberg**, 2006.

NAMALDI, A.; ÇALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. **Drying Technology**, v. 24, n. 11, p. 1495 – 1500, 2006.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 479 – 504, 1994.

OKAFOR, N. **Modern industrial microbiology and biotechnology**. Enfield: Science Publishers, 2007.

PAHOJA, V. M. & SETHAR, M. A. A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganisms. **Pakistan Journal of Applied sciences**, v. 2, n. 4, p. 474 – 484, 2002.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81 – 84, 2003.

PATEL, R. P.; PATEL, M. P.; SUTHAR, A. M. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology**, v.2, n. 10, p. 44 – 47, 2009.

PATTANAGUL, P.; PINTHONG, R.; PHIANMONGKHOL, A.; THARATHA, S. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus sp.* **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 20 – 23, 2008.

PEKKARINEN, A. I.; JONES, B. L.; NIKU-PAAVOLA, M. L. Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 798 – 807, 2002.

PRAKASH, S; URBANSKA, A. M. Colon-targed delivery of live bacterial cell biotherapeutics including microencapsulated live bacterial cells. **Biologics: Targets & Therapy**, v. 2, n. 3, p. 355 – 378, 2008.

PRAZERES, J. N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of Alkaline Lipase From *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 505 – 509, 2006.

RAJMALWAR, S. & DABHOLKAR, P. S. Production of protease by *Aspergillus* sp. using solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 17, p. 4197 – 4198, 2009.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V., Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **American Society for Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 597 – 635, 1998.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology,** v. 16, n. 6, p 1195 – 1236, 1998.

RÉ, M. I. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. **Drying Technology**, v. 24, n. 4, p. 433-446, 2006.

RIFAAT, H. M.; EL-MAHALAWY, A. H. EL-MENOFY, H. A. DONIA, S. A. production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 5, n. 3, p 39 – 53, 2010.

ROSA, E. D; TSUKADA, M.; FREITAS, L.A.P. **Secagem por atomização na indústria alimentícia: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto, 2006. Disponível em: http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/secagem%20de%20materiais.pdf>. Acesso em 13/07/2011.

ROSSANEZI, G. Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de cetorolaco de trometamina obtidas por *Spray drying*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2008. 64 p.

SAMBORSKA, K.; WITROWA-RAJCHERT, D.; GONÇALVES, A. Spray-Drying of α-Amylase—The Effect of Process Variables on the Enzyme Inactivation. **Drying Technology**, v. 23, n. 4, p. 941 – 953, 2005.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R.S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R.J.; BOND J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach.** New York: Oxford University, 1996.

SAVOLAINEN, M.; KHOO, B.; GLAD, K.; DAHLQVIST, C.; JUPPO, A. M. Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, p. 151 – 161, 2002.

SCHONHERR, M. & RIEDE, T. The use of auxiliaries in drying technology. **Drying Technology**, v. 12, p. 1387 – 1400, 1994.

SHARIFF, F. M.; ZALIHA, R., N.; RAHMAN, R. A.; BASRI, M.; SALLEH, A B. A Newly Isolated Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 2917 – 2934; 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627 – 662, 2001.

SHU, Z. Y.; JIANG, H.; LIN, R. F.; JIANG, Y. M.; LIN, L.; HUANG, J. Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 1 – 8, 2010.

SILVA, R. R. Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2011. 58 p.

SINGH, M. N.; HEMANT, K. S. Y.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H. G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 65 – 77, 2010.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, K.; LARROCHE, C.; PANDEV, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541 – 549, 2010.

SIQUEIRA, F. G.; MARTOS, E. T.; SILVA, R.; DIAS, E. S. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on banana stalk and Bahia grass based substrates. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, 199 – 204, 2011.

TEWA-TAGNE, P.; DEGOBERT, G.; BRIANÇON, S.; BORDES, C.; GAUVRIT, J. Y.; LANTERI, P.; FESSI, H. Spray-drying Nanocapsules in Presence of Colloidal Silica as Drying Auxiliary Agent: Formulation and Process Variables Optimization Using Experimental Designs. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 4, p. 650 – 661, 2007.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182 – 196, 2010.

USP 30/NF 25. The United States Pharmacopeia, 2007.

VOET, D.; VOET, J. **Bioquímica**. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 459 – 546.

WEINSTEIN, S. S.; WYNNE, A. M. Studies on pancreatic lipase. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 649 – 660, 1935.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, 299 – 332, 2011.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123 – 137, 2009.