UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases
produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii***

Tales Alexandre Costa e Silva

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases
produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii***

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Tales Alexandre Costa e Silva

Orientadora: Profa. Dra. Suraia Said

Ribeirão Preto
2010

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

Costa-Silva, Tales Alexandre

Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*. Ribeirão Preto, 2010.

88 p.: il; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP – Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Said, Suraia.

1. Lipase. 2. “Spray dryer”. 3. Purificação e caracterização enzimática.
4. *Cercospora kikuchii*. 5. Estabilização enzimática.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tales Alexandre Costa e Silva

Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Suraia Said

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Esta conquista dedico à minha
querida avó Edith Fernandes da Silva (in memoriam)
exemplo de ser humano. Saudades!
Também aos meus pais, Claudionor e Neuza,
por serem a sustentação de todos os meus sonhos.
A vocês, os meus eternos agradecimentos!*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Suraia Said pela orientação e pelos conhecimentos transmitidos. Sua competência e postura profissional serão sempre referências para mim.

À técnica do Laboratório de Enzimologia Industrial, Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti, por sua amizade e inestimável colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas de Laboratório, Cláudio Battiston Loureiro e Henrique Pereira Ramos, pela formação conjunta através das discussões e contribuições.

A todos do Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento em Processos Farmacêuticos (LAPROFAR), por toda contribuição na parte de secagem e por me receberem de forma tão generosa.

A todos os Funcionários do Laboratório de Bioquímica, pela contribuição na parte de purificação enzimática.

Ao Professor Dr. Richard John Ward do Departamento de Química – FFCLRP-USP, pela disponibilização das resinas cromatográficas.

A todos os funcionários da FCFRP/USP que sempre me atenderam com carinho e competência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

Aos meus amigos(as) Luana Alves, Mariana Benício, Úrsula Barbosa, Bianca Fiche, e Neto Meira por todo companheirismo, amizade e compartilhamento de uma época muito especial em minha vida.

A toda minha família por ser o incentivo e a razão em tudo que faço.

A todas aquelas pessoas, aqui não mencionadas, mas que nas quais pude encontrar solidariedade e afeto.

Por fim a Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade do conhecimento.

*"Não sou bom com números
Com frases feitas
E com morais de história
Gosto do que me tira o fôlego
Venero o improvável
Almejo o quase impossível
Meu coração é livre, mesmo amando tanto
Tenho um ritmo que me complica
Uma vontade que não passa
Uma palavra que nunca dorme
Não sou fácil
Não coleciono inimigos
Mudo de humor conforme a lua
Me desinteresse à toa
Tenho o desassossego dentro do peito
E um par de asas que nunca deixo!!*

Bonito mesmo é essa coisa da vida: um dia, quando menos se espera, a gente se supera. E chega mais perto de ser quem, na verdade, a gente é. "

"FERNANDA MELLO"

RESUMO

COSTA-SILVA, T.A. **Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii***. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos, mono e diacilgliceróis e glicerol. Em contraste com as esterases, lipases são ativadas apenas quando estão adsorvidas a uma interface óleo-água. Lipases têm sido amplamente utilizadas em muitos processos industriais, tais como química orgânica, formulações de detergentes e de produtos como cosméticos e farmacêuticos. A principal preocupação na produção de enzimas comerciais é a proteção da sua estabilidade em solução aquosa. A água facilita ou medeia uma variedade de vias de degradação física e química, durante as etapas de purificação, transporte e armazenamento. Por conseguinte, formulações sólidas são desenvolvidas para alcançar uma vida útil aceitável para essas substâncias. “Spray drying” é comumente usado como uma técnica de desidratação na indústria farmacêutica para fabricação de produtos em pó diretamente do estado líquido. No presente trabalho, a purificação e caracterização bioquímica de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*, bem como os efeitos de adjuvantes no processo de secagem destas enzimas foram estudados. A lipase bruta foi purificada à homogeneidade através de cromatografia de interação hidrofóbica e gel filtração. A lipase foi purificada 5,54 vezes, com rendimento de 9% e a atividade específica de 223,6 U/mg. O peso molecular da enzima foi estimado em 65,1 kDa por SDS-PAGE e 73,5 kDa utilizando cromatografia de gel filtração, indicando que provavelmente trata-se de um monômero. A lipase mostrou um pH ótimo em 4,6 e uma temperatura ótima de 35°C. Cerca de 80,2% de sua atividade foi mantida após incubação a 40°C durante 2 horas. A $V_{\max}$ e K_m foram 10,28 mmol/min/mg de proteína e 0,03240 mM, respectivamente, utilizando pNPP como substrato. As lipases presentes no extrato bruto e as lipases ligadas ao micélio foram caracterizadas para avaliar o potencial de utilização em biocatálise. A lipases no extrato bruto apresentaram atividade máxima a 60°C e pH 6,2, enquanto que as lipases ligadas ao micélio apresentaram atividade máxima a 50°C e pH 5,4. Nos estudos de efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, as lipases no extrato bruto mantiveram-se estáveis a 50°C, com 85,3% de atividade residual após 2 horas de incubação. As lipases ligadas ao micélio mantiveram pelo menos 75,1% de atividade residual após 2 horas de incubação a 80°C. Estes resultados mostram que as lipases de *C. kikuchii* têm propriedades cinéticas e termoestabilidade desejáveis para aplicações em biocatálise. As lipases presentes no extrato bruto foram secas em “spray dryer” com diferentes adjuvantes, e sua estabilidade foi avaliada. A recuperação da atividade enzimática após a secagem, com a adição de 10% de lactose, β -ciclodextrina, maltodextrina, manitol, goma arábica, e trealose variou de 63 a 100%. A atividade da enzima foi totalmente perdida durante a secagem do extrato bruto na ausência de adjuvantes. A maioria dos adjuvantes utilizados manteve pelo menos 50% da atividade enzimática a 5°C e 40% a 25°C, após 8 meses de armazenagem. As lipases secas com 10% de β -ciclodextrina mantiveram 72% da atividade a 5°C no mesmo período. A partir destes resultados preliminares foi realizada a otimização do processo de secagem utilizando β -ciclodextrina, maltodextrina e lactose como adjuvantes. A análise estatística dos resultados experimentais permitiu a determinação das condições

ótimas para a retenção da atividade enzimática (R_{AE}), a saber: concentração de adjuvantes de secagem de 12,05%, temperatura de entrada do gás de secagem em 153,6°C e vazão do extrato enzimático alimentado de 9,36 g/min, para β -ciclodextrina e maltodextrina como adjuvantes. Para lactose, o estudo mostrou que o aumento da quantidade de adjuvante de secagem e/ou diminuindo a temperatura do gás de entrada tem um efeito positivo sobre a retenção da atividade enzimática do produto seco. Após o processo de purificação foi realizada a secagem da enzima parcialmente purificada e da lipase pura, com estes três adjuvantes. A manutenção da atividade enzimática variou 90,6-100% quando foram utilizadas as condições ótimas para cada adjuvante de secagem. Concluindo, as lipases produzidas por *C. kikuchii* podem ser eficientemente secas por “spray dryer”, uma vez que a atividade enzimática foi mantida no extrato bruto, na lipase pura e na lipase semi-purificada submetidas à secagem.

Palavras-chave: Lipase; *Cercospora kikuchii*; Caracterização enzimática; “Spray dryer”; Estabilização enzimática; Fungo endofítico.

ABSTRACT

COSTA-SILVA, T.A. **Biochemical characterization and spray drying of lipases produced by the endophytic fungus *Cercospora kikuchii***. 2010. 88f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Lipases are enzymes that catalyze the hydrolysis of triacylglycerols to fatty acids, mono and diacylglycerols, and glycerol. In contrast to esterases, lipases are activated only when they are adsorbed to an oil–water interface. They have been widely used in many industrial processes such as organic chemical, detergent and cleaning formulations and in products like cosmetics and pharmaceutical products. The main concern in the production of commercial enzymes is to protect their stability in aqueous solution. Water facilitates or mediates a variety of physical and chemical degradation pathways, active during protein purification, shipping and storage. Consequently, dry solid formulations are developed to achieve an acceptable protein shelf life. Spray drying is commonly used as a dehydration technique in the pharmaceutical industry for making powdery products directly from the liquid. In the present work, the purification and biochemical characterization of lipases produced by endophytic fungus *Cercospora kikuchii* as well as the effects of adjuvants on the spray drying process of these enzymes were studied. The crude lipase was purified to homogeneity by hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. The lipase purified was 5.54-fold with 9% recovery and the specific activity was 223.6. The molecular mass of the lipase was estimated to be 65.1 kDa using SDS-PAGE and 73.5 using gel filtration chromatography, indicating that the lipase is a monomer. The lipase demonstrated an optimum pH at 4.6, an optimum temperature of 35°C. About 80.2% of its activity was retained after incubation at 40°C for 2 hours. The $V_{\max}$ and K_m were 10.28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and 0.03240 mM, respectively, using pNPP as substrate. The lipases present in crude extract and the mycelium-bound lipases were characterized in order to evaluate the potential for use in biocatalysis. The crude extract showed maximum activity at 60°C and pH 6.2 while the mycelium-bound lipases showed maximum activity at 50°C and pH 5.4. In tests of the temperature effect on the enzymatic activity, the lipases in the crude extract was stable at 50°C, with 85.3% residual activity after 2 hours of incubation. The mycelium-bound lipases maintained at least 75.1% of residual activity after 2 h incubation at 80°C. These results show that the lipases of *C. kikuchii* have kinetic properties and stability characteristics suitable to applications in biocatalysis. The lipases present in crude extract were spray dried with different adjuvants, and their stability was evaluated. The recovery of the enzyme after drying with 10% of lactose, β -cyclodextrin, maltodextrin, mannitol, gum arabic, and trehalose ranged from 63% to 100%; but the enzyme activity was lost in the absence of adjuvants. Most of the adjuvants used kept up at least 50% of the enzymatic activity at 5°C and 40% at 25°C after 8 months. The lipase dried with 10% of β -cyclodextrin retained 72% of activity at 5°C. From these preliminary results the optimization of drying process using β -cyclodextrin, maltodextrin and lactose as adjuvants was carried out. Statistical optimization of the experimental results allowed the determination of the processing conditions that maximized the retention of the enzymatic activity (R_{AE}), namely: concentration of drying adjuvants of 12.05 %, inlet temperature of the drying gas of 153.6°C, and flow rate of the enzymatic extract fed to the dryer of 9.36 g/min, for the β -cyclodextrin and maltodextrin as adjuvants. For lactose as adjuvant the

study showed that increasing the amount of drying adjuvant and/or decreasing the inlet gas temperature has positive effect on the retention of enzymatic activity of the dried product. After the purification process was carried out the drying of the partially purified enzyme and pure lipase, using these three adjuvants. The retention of enzymatic activity ranged from 90.6 to 100% when was used the optimal conditions for each drying adjuvant. Concluding, the lipases produced by *C. kikuchii* may be efficiently spray dried since its activity enzymatic was retained in crude extract, pure lipase and in semi-purified lipase after drying.

Keywords: Lipase; *Cercospora kikuchii*; Enzyme characterization; Spray drying; Enzyme stabilization; Endophytic fungus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de hidrólise catalisada por lipases.....	3
Figura 2. Doenças causadas pela infecção do fungo <i>Cercospora kikuchii</i> em soja....	7
Figura 3. Girassol mexicano, <i>Tithonia diversifolia</i> . Vista parcial da planta e suas flores.....	8
Figura 4. Esquema geral de produção, purificação, caracterização e secagem das lipases produzidas pelo fungo endofítico <i>Cercospora kikuchii</i>	16
Figura 5. Reação de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila por lipases, com liberação de <i>p</i> -nitrofenol e ácido palmítico.....	18
Figura 6. Equipamento “spray dryer” utilizado.....	23
Figura 7. Perfil de separação cromatográfica da lipase produzida por <i>C. kikuchii</i> - Interação Hidrofóbica.....	28
Figura 8. Perfil de separação cromatográfica da lipase produzida por <i>C. kikuchii</i> - 1ª Coluna de gel filtração.....	29
Figura 9. Perfil de separação cromatográfica da lipase produzida por <i>C. kikuchii</i> - 2ª Coluna de gel filtração.....	30
Figura 10. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes do filtrado da cultura, do Pool IV obtido da Coluna Butyl-Sepharose Fast Flow e Pool I e II das Colunas de Gel Filtração.....	31
Figura 11. Estimativa da massa molecular relativa da lipase pura de <i>Cercospora kikuchii</i> por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	34
Figura 12. Estimativa da massa molecular relativa da lipase pura de <i>Cercospora kikuchii</i> por filtração em gel Sephacril S-200HR.....	35
Figura 13. Efeito da temperatura sobre a atividade da lipase purificada de <i>Cercospora kikuchii</i>	36
Figura 14. Estabilidade frente à temperatura da lipase purificada de <i>Cercospora kikuchii</i>	36
Figura 15. Efeito do pH na atividade enzimática da lipase purificada de <i>Cercospora kikuchii</i>	38
Figura 16. Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase purificada de <i>C. kikuchii</i>	39
Figura 17. Efeito da temperatura na atividade lipolítica do extrato bruto de <i>C. kikuchii</i>	40

Figura 18. Estabilidade à temperatura da atividade lipolítica do extrato bruto de <i>C. kikuchii</i>	41
Figura 19. Efeito do pH na atividade lipolítica do extrato bruto de <i>C. kikuchii</i>	42
Figura 20. Efeito da temperatura na atividade lipolítica das lipases ligadas ao micélio de <i>C. kikuchii</i>	43
Figura 21. Estabilidade à temperatura da atividade lipolítica das lipases ligadas ao micélio de <i>C. kikuchii</i>	43
Figura 22. Efeito do pH na atividade lipolítica das lipases ligadas ao micélio de <i>C. kikuchii</i>	46
Figura 23. Superfície de resposta obtida para a retenção da atividade enzimática em função da proporção de adjuvante e da temperatura do ar de secagem.....	53
Figura 24. Conteúdo de umidade (X_p) em função da temperatura do gás de saída (T_{gs}).....	55
Figura 25. R_{AE} em função da proporção de adjuvantes utilizados (ADJ) e da temperatura do gás de entrada (T_{ge}), para os adjuvantes maltodextrina (MD) e β -ciclodextrina (β -CD).....	58
Figura 26. R_{EC} em função da porcentagem de adjuvantes usados (ADJ) e da temperatura de entrada do gás de secagem (T_{ge}), para os dois tipos de adjuvantes, sendo o parâmetro W_s fixado em 9,36 g/min.....	60
Figura 27. T_{gs} em função da vazão de alimentação (W_s) e da temperatura do gás de entrada, para ambos adjuvantes, sendo o parâmetro ADJ fixado em 1,682	61
Figura 28. Possíveis fatores de estresse para uma proteína durante a secagem em “spray drying”.....	62
Figura 29. Superfície de resposta do conteúdo de umidade em função da temperatura de gás de entrada (T_{ge}) e a vazão de alimentação da solução enzimática no “spray dryer” (W_s), para ambos os adjuvantes utilizados, sendo a variável ADJ fixada em 12,05%.....	64
Figura 30. Fotomicrografias do extrato bruto do fungo endofítico <i>C. kikuchii</i> : (A) lactose (ensaio 3); (B) β -ciclodextrina (ensaio 4); (C) maltodextrina (ensaio 8).....	65
Figura 31. Estabilidade de lipases presentes no extrato bruto na presença dos seguintes adjuvantes: goma arábica, trealose, β -ciclodextrina, lactose, manitol, maltodextrina DE10 e maltodextrina DE20 – durante estocagem em diferentes temperaturas: 5, 25 e 40 °C.....	67

Figura 32. Resultados obtidos da distribuição granulométrica acumulativa para a lipase pura de *C. kikuchii* seca em “spray dryer”: A – β -ciclodextrina; B – lactose; C – maltodextrina DE10.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais fungos produtores de lipases.....	5
Tabela 2. Classificação científica do fungo <i>Cercospora kikuchii</i>	6
Tabela 3. Variáveis analisadas no planejamento experimental.....	25
Tabela 4. Procedência e grau de pureza dos reagentes utilizados no trabalho.....	26
Tabela 5. Resumo do processo final de purificação: Butyl-Sepharose Fast Flow.....	28
Tabela 6. Resumo do processo final de purificação de uma lipase de <i>C. kikuchii</i>	30
Tabela 7. Características e métodos para a purificação de várias lipases fúngicas.....	33
Tabela 8. Características bioquímicas de lipases fúngicas purificadas e produzidas em diferentes condições de fermentação.....	37
Tabela 9. Características bioquímicas de lipases fúngicas presentes no extrato bruto produzidas em diferentes condições de fermentação.....	42
Tabela 10. Atividade lipolítica residual após secagem em “spray dryer” utilizando diferentes adjuvantes.....	49
Tabela 11. Parâmetros operacionais e resultados obtidos para os ensaios de secagem em “spray dryer” do extrato bruto de <i>C. kikuchii</i> utilizando lactose, maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina como adjuvantes.....	51
Tabela 12. Análise de variância realizada para os resultados de retenção da atividade enzimática.....	52
Tabela 13. Equação modelada para os resultados experimentais da retenção da atividade enzimática.....	53
Tabela 14. Análise de variância realizada para os resultados da recuperação do produto seco.....	53
Tabela 15. Análise de variância realizada para os resultados de umidade do produto seco.....	54
Tabela 16. Parâmetros de regressão, desvio padrão e p-valor para R_{AE}	56
Tabela 17. Análise de variância realizada para a Equação 6, ajustados para os dados experimentais da recuperação da atividade enzimática R_{AE}	57
Tabela 18. Resultado da secagem da lipase pura e semi-purificada produzida pelo fungo endofítico <i>Cercospora kikuchii</i> através de “spray dryer”.....	68
Tabela 19. Valores mínimos de atividade de água (A_w) para o crescimento e produção de toxinas por diferentes patógenos.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADJ - Concentração do adjuvante

A_w - Atividade de água

DE – Dextrose equivalente

K_m - Constante de Michaelis-Menten

p NPP - Palmitato de p -nitrofenila

R_{AE} - Retenção da atividade enzimática

R_{EC} - Recuperação do produto

EXC - Tipo de adjuvante

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

T_{ge} - Temperatura de entrada do gás de secagem

T_{gs} - Temperatura de saída do gás de secagem

X_p - Conteúdo de umidade do produto

W_s - Fluxo de extrato alimentado do secador

V_e - Volume de eluição

V_o - Volume morto

V_{max} - Velocidade máxima

Subscrito

C - variável codificada

L - efeito linear

Q - efeito quadrático

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão bibliográfica	3
1.1.1 Lipase: definição e classificação	3
1.1.2 Fontes de obtenção	4
1.1.3 <i>Cercospora kikuchii</i>	6
1.1.4 Aplicação de lipases	8
1.1.5 Separação e purificação de lipases	11
1.1.6 Secagem de enzimas	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Microrganismo, manutenção e condições de cultivo	15
3.2 Avaliação da atividade enzimática	17
3.3 Determinação de proteínas totais	18
3.4 Determinação da atividade enzimática das lipases ligadas ao micélio	18
3.5 Separação e purificação	19
3.5.1 Recuperação, concentração e diálise do fluido de cultura	19
3.5.2 Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica	19
3.5.3 Cromatografia de gel filtração	19
3.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	20
3.5.5 Determinação da massa molecular aparente por filtração em gel	20
3.5.6 Determinação do peso molecular em SDS-page	21
3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos e de estabilidade das lipase produzidas pelo fungo endofítico <i>Cercospora kikuchii</i>	21
3.6.1 Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade da lipase purificada	21
3.6.2 Determinação do pH ótimo da lipase purificada	21
3.6.3 Determinação dos parâmetros cinéticos – k_m e v_{max}	22
3.6.4 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das lipases do extrato bruto e ligadas ao micélio	22
3.6.5 Efeito do pH na atividade enzimática das lipases do extrato bruto e ligadas ao micélio	22
3.7 Processo de secagem do extrato bruto, da enzima semi-purificada e da lipase pura	22
3.7.1 “Spray dryer”	22
3.7.2 Avaliação do processo de secagem em “spray dryer” e caracterização da	

enzima seca	23
3.7.2.1 Avaliação da atividade enzimática após a secagem	23
3.7.2.2 Determinação da umidade residual (base seca)	24
3.7.2.3 Análise granulométrica	24
3.7.2.4 Análise das partículas por microscopia eletrônica de varredura.....	24
3.7.2.5 Recuperação do produto	25
3.8 Otimização dos ensaios de secagem	25
3.9 Avaliação da estabilidade após secagem em “spray dryer”	26
3.10 Reagentes	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Separação e purificação de uma das lipases de <i>Cercospora kikuchii</i>	27
4.2 Determinação do peso molecular por filtração em gel e SDS-PAGE	34
4.3 Determinação dos parâmetros cinéticos e de estabilidade: extrato bruto, lipase ligada ao micélio e lipase pura	35
4.3.1 Caracterização bioquímica e cinética da lipase pura	35
4.3.1.1 Temperatura ótima e termoestabilidade	35
4.3.1.2 Determinação do pH ótimo da lipase pura	38
4.3.1.3 Determinação dos parâmetros cinéticos – k_m e v_{max}	39
4.3.2 Determinação da melhor temperatura e termoestabilidade das lipases presentes no extrato bruto	40
4.3.2.1 Efeito do pH na atividade enzimática das lipases presentes no extrato bruto	42
4.3.3 Efeito da temperatura sobre a atividade e termoestabilidade das lipases ligadas ao micélio.....	43
4.3.3.1 Efeito do pH sobre a atividade das lipases ligadas ao micélio do fungo endofítico <i>Cercospora kikuchii</i>	45
4.4 Secagem da solução enzimática em “spray dryer”	48
4.4.1 Estudo da viabilidade de secagem em “spray dryer” do extrato bruto na presença de diferentes adjuvantes	48
4.4.2 Otimização dos ensaios de secagem	50
4.4.3 Morfologia das partículas	64
4.4.4 Avaliação da estabilidade enzimática após secagem do extrato bruto em “spray dryer”	66
4.4.5 Secagem da lipase purificada e semi-purificada em “spray dryer”	68
4.4.5.1 Distribuição granulométrica da lipase pura e seca	69
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a sociedade vem sendo alertada para a resolução de sérios problemas de degradação ambiental e de grandes alterações no clima. Com isso o homem se vê obrigado a mudar sua conduta com relação aos processos de produção de bens-ecoeficiência, tornar-se ciente da necessidade de diminuição do consumo energético, nomeadamente carvão e petróleo e de novas posturas com relação aos dogmas tradicionais de economia e mercado, para viabilização das demandas acima. Essa crescente necessidade de abordagens mais seletivas e menos imediatistas do uso dos recursos naturais do planeta, vem pavimentando o caminho para o avanço qualitativo e quantitativo dos processos biotecnológicos em contraposição aos processos químicos. Estes últimos, tradicionalmente adotados pela engenharia química, utilizam compostos químicos muitas vezes tóxicos, como matérias-primas ou insumos da sua cadeia produtiva. Dentro deste contexto destaca-se a tecnologia enzimática que é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (BON *et al.*, 2008).

A produção de enzimas microbianas envolve processos de fermentação em estado líquido ou sólido tendo como agentes microrganismos selvagens ou recombinantes. Estes processos viabilizam economicamente a produção de enzimas em quantidades industriais. No caso da fermentação em estado líquido, também chamada fermentação submersa, o mosto fermentado é centrifugado ou filtrado para a recuperação das enzimas presentes no sobrenadante das culturas, ainda que, em alguns casos, a enzima de interesse esteja localizada no interior das células microbiana, sendo necessária a sua extração. No caso da fermentação em estado sólido, os biocatalisadores são geralmente extraídos da massa do substrato fermentado. Estes procedimentos permitem a obtenção de preparações com altos níveis da atividade catalítica desejada e os efluentes industriais, ricos em biomassa, podem ser utilizados, por exemplo, como fertilizantes. Assim, os processos de produção de enzimas são um claro exemplo de atividades relacionadas com o desenvolvimento sustentável, em que os procedimentos industriais, baseados no uso de recursos naturais, devolvem à natureza, em uma dinâmica cíclica, os recursos extraídos. Esta preocupação com as questões ambientais, com a qualidade dos produtos e com o consumo de energia vem incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias mais limpas e eficientes. A utilização de enzimas surgiu como uma alternativa para a substituição gradual dos catalisadores químicos pelos biológicos.

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente em vários setores produtivos, como nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, incluindo setores que utilizam outros solventes que não água como no caso da produção de biodiesel.

Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e as de interesterificação de lipídeos por meio das lipases. Estas enzimas constituem um dos mais importantes grupos de biocatalisadores devido ao seu amplo potencial de aplicação biotecnológica. Estas têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos, de detergentes, farmacêuticas, agroquímica e oleoquímica (KRIEGER *et al.*, 1999, PANDEY *et al.*, 1999, SAXENA *et al.*, 1999, CABRAL *et al.*, 1998, JAEGER *et al.*, 1994). As lipases podem ser obtidas principalmente de glândulas de animais, de sementes, látex e tecidos vegetais, mas as aplicadas industrialmente são, em sua maioria, de origem microbiana. Novos genes ainda serão identificados assim como lipases com novas e interessantes propriedades. Em paralelo, a combinação da otimização das condições de síntese e de reação das lipases poderá incrementar sua produção e aplicação industrial. A nova era da biocatálise, atualmente amparada pela biosustentabilidade coloca, sem dúvida, as lipases como biocatalisadores do futuro e a grande diversidade brasileira, principalmente de microrganismos, justifica a busca por novos produtores de enzimas com características especiais, que possam ser aplicadas nos segmentos industriais que necessitam dessa tecnologia.

Assim, este trabalho tem como objetivo a purificação e caracterização bioquímica de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*, assim como a secagem destas enzimas utilizando o processo de “spray dryer”. Contribui desta maneira, para o desenvolvimento do conhecimento em área de importância significativa dentro da biotecnologia: a tecnologia enzimática.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Lipase: definição e classificação

Lipases (EC 3.1.1.3) catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de ésteres formando glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (Figura 1) (JAEGER e REETZ, 1998).

Figura 1. Reação de hidrólise catalisada por lipases.

As esterases (EC 3.1.1.1) muitas vezes são difíceis de diferenciar das lipases, porém sua atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água (ALVAREZ-MACARIE *et al.*, 1999). Muitos estudos foram realizados na tentativa de diferenciar estes dois grupos de enzimas pertencentes à classe das hidrolases e ainda assim não conseguiram chegar a uma conclusão definitiva. Uma das primeiras tentativas de diferenciação foi fundamentada através das características cinéticas dessas enzimas. O mais conhecido fenômeno que surgiu dos estudos de cinéticas das reações lipolíticas tornou-se conhecido como ativação interfacial, o qual descreve o fato de que a atividade das lipases aumenta em presença de substratos insolúveis. Diante disso, ao contrário das esterases, as lipases foram definidas como carboxilesterases agindo em substratos emulsificados. A determinação da estrutura tridimensional destas enzimas forneceu uma interessante explicação para a ativação interfacial: o sítio ativo das lipases seria recoberto por uma “tampa” de natureza hidrofóbica, o qual sofreria uma mudança conformacional ao interagir com a interface lipídeo/água. Essa mudança conformacional seria necessária para que o sítio ativo da enzima fosse exposto e ocorresse assim a atividade lipolítica (BRADY *et al.*, 1990; SCHRAG *et al.*, 1991; SARDA e DESNUELLE, 1958; BRZOZOWSKI *et al.*, 1991). Por muitos anos a propriedade de ativação interfacial e a presença da “tampa” na estrutura da enzima passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases.

Mais recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial: lipases como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antartica* B não apresentam a ativação interfacial, porém possuem uma tampa cobrindo o sítio ativo (JAEGER e REETZ, 1998). Outra dificuldade na classificação das lipases utilizando o fenômeno da ativação interfacial é que este pode ser influenciado pelas condições experimentais e pelos substratos utilizados (FERRATO *et al.*, 1997).

A definição atual mais aceita é que as lipases são carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono e aquelas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são classificadas genericamente como esterases (JAEGER *et al.*, 1999; JAEGER *et al.*, 1994).

No presente trabalho o estudo de caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” foram focados sobre as triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3), cuja definição clássica descreve estas enzimas como glicerol éster hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial entre as carboxil éster hidrolases.

1.1.2 Fontes de obtenção

As enzimas lipolíticas provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (HASAN *et al.*, 2006).

As lipases diferem grandemente em sua origem (bacteriana, fúngica, vegetal, animal) e propriedades cinéticas. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) são as mais utilizadas, devido a sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. Os fungos são destacados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como “GRAS” (Generally Regarded as Safe) (JAEGER *et al.*, 1994). Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e suas

enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *R. oryzae*, *Penicillium camembertii*, *P. roqueforti* e da levedura *Candida rugosa* são comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivos em preparações digestivas e para síntese quiral.

Dentre os fungos, destacam-se aqueles que vivem no interior de plantas, os chamados fungos endofíticos, que vêm despertando muito interesse em aplicações biotecnológicas (ARNOLD *et al.*, 2000; CANNON e SIMMONS, 2002; STROBEL *et al.*, 2004). A existência de fungos no interior de tecidos vegetais sadios já é conhecida há muito tempo; porém, somente a partir da década de 70, com os estudos de Berstein e Carroll (1977) e Carroll e Carroll (1978), nos quais várias espécies de fungos endofíticos foram recuperadas de acículas sadias de várias coníferas, ocorreu o despertar para estudos com endofíticos. Assim, o interesse em estudar fungos endofíticos vem aumentando nos últimos anos, com destaque para a avaliação de seu potencial como produtores de metabólitos tanto primários quanto secundários com atividade biológica, para aproveitamento em vários segmentos industriais (SCHULZ *et al.*, 2002; STROBEL, 2002; AZEVEDO *et al.*, 2000; RUBINI *et al.*, 2005; SCHULZ e BOYLE, 2005).

É importante ressaltar que não há até o presente momento, nenhum relato de produção de lipases feita por fungos endofíticos, mostrando a relevância de se explorar esses microrganismos como fontes produtoras de enzimas. A Tabela 1 apresenta os principais fungos produtores de lipase.

Tabela 1. Principais fungos produtores de lipases.

Microrganismo	Referência
<i>Fusarium heterosporum</i>	Nagao <i>et al.</i> , (1996)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hiol <i>et al.</i> , (2000)
<i>Geotrichum candidum</i>	Gulati <i>et al.</i> , (1999)
<i>Geotrichum sp</i>	Macedo <i>et al.</i> , (1997)
<i>Neurospora sp.</i>	Gulati <i>et al.</i> , (1999)
<i>Neurospora crassa</i>	Ruiz <i>et al.</i> , (2003)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lima <i>et al.</i> , (2004b)
<i>Penicillium candidum</i>	Ruiz <i>et al.</i> , (2003)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ferrer <i>et al.</i> , (2000)
<i>Penicillium coryophilum</i>	Baron <i>et al.</i> , (2005)
<i>Penicillium cyclopium</i>	Chahinian <i>et al.</i> , (2000)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Yasuda <i>et al.</i> , (1999)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Ghamgui <i>et al.</i> , (2004)

Continuação Tabela 1

Microrganismo	Referência
<i>Rhizopus oligosporous</i>	Dalsenter <i>et al.</i> , (2005)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Rodriguez <i>et al.</i> , (2006)
<i>Aspergillus carneus</i>	Saxena <i>et al.</i> , (2003)
<i>Aspergillus niger</i>	Mahadik, <i>et al.</i> , (2002)
<i>Aspergillus nidullans</i>	Mayordomo <i>et al.</i> , (2000)
<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	Hiol <i>et al.</i> , (1999)
<i>Mucor sp.</i>	Mahadik, <i>et al.</i> , (2002)

1.1.3 *Cercospora kikuchii*

O fungo utilizado neste trabalho foi o *Cercospora kikuchii* e sua classificação científica esta apresentada na Tabela 2 (MATSUMOTO e TOMOYASU, 1925). Este fungo causa a doença denominada mancha púrpura em sementes de soja e penetra no tegumento da semente pelo funículo (Figura 2). O patógeno ataca todas as partes da planta e pode ser responsável por severas reduções no rendimento e na qualidade da semente (ALMEIDA *et al.*, 1997).

Tabela 2. Classificação científica do fungo *Cercospora kikuchii*.

Classificação Científica	
Reino	Fungi
Filo	Ascomicota
Classe	Dotideomicetos
Ordem	Capnodiales
Família	Micosphaerellaceae
Gênero	Cercospora
Espécie	<i>C. kikuchii</i>
Classificação Binominal	
<i>Cercospora kikuchii</i>	

A mancha púrpura nas sementes é encontrada em todas as áreas produtoras de soja do Brasil, porém este patógeno é mais facilmente encontrado nas regiões mais quentes e chuvosas. Temperaturas variando de 22 a 30°C são favoráveis à doença. A sobrevivência do fungo se dá em sementes e restos culturais, sendo normalmente introduzido em novas áreas por meio das sementes (YORINORI, 1982). O sintoma mais evidente é observado nas sementes, que ficam com manchas de coloração roxa bastante típica, mas nem todas as sementes com este tipo de sintoma apresentam o fungo e sementes aparentemente sadias podem estar contaminadas. Nas folhas, os sintomas aparecem a partir do final da granação e são caracterizados por pontuações castanhos-avermelhadas, que coalescem e formam grandes manchas escuras (HENNING, 2005).

Figura 2. Doenças causadas pela infecção do fungo *Cercospora kikuchii* em soja. A) Crestamento foliar e B – C) Mancha púrpura nas sementes (Fonte: GIESLER, 2010).

Como relatado acima este fungo é isolado na maioria das vezes como um fitopatógeno, principalmente de soja. Entretanto, o fungo utilizado neste trabalho foi isolado como sendo endofítico da planta *Tithonia diversifolia* (Figura 3), conhecida também como girassol mexicano. Este é o primeiro relato de isolamento desse fungo como endofítico e a sua associação com plantas oleaginosas pode explicar a sua capacidade de produzir lipases.

Figura 3. Girassol mexicano, *Tithonia diversifolia*. Vista parcial da planta e suas flores (Fonte: LUSTOSA, 2005).

1.1.4 Aplicação de lipases

Recentemente, o interesse em pesquisas com lipases, principalmente de origem microbiana, tem crescido devido ao seu grande potencial biotecnológico. Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Efetivamente, suas características de especificidade, regiosseletividade e enantiosseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluentes (CASTRO-UCHOA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Conseqüentemente, uma considerável atenção vem sendo dada ao uso das lipases em aplicações industriais como destacado a seguir:

Indústria de Alimentos:

As lipases microbianas têm sido utilizadas para a obtenção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos. Os ácidos graxos livres podem ou não sofrer modificações químicas e, dependendo do tamanho da cadeia carbônica e do grau de insaturação, conferem um peculiar sabor e aroma para os alimentos, representando um importante papel nas propriedades físico-químicas, organolépticas e nutricionais de diversos produtos (JAEGER e REETZ, 1998). A literatura reporta a hidrólise do óleo de fígado de bacalhau para a produção de ácidos graxos ômega 3 – insaturados, destinados às dietas de grupos clínicos especiais (PANDEY *et al.*, 1999). O enriquecimento de óleos com ácidos graxos poliinsaturados, como por exemplo, ácido linolênico, confere a estes atividades anti-carcinogênicas e anti-escleróticas, sendo chamados atualmente de alimentos nutracêuticos (MARTINS, 2007).

Indústria Oleoquímica:

O uso de lipases para a hidrólise de gorduras em âmbito industrial proporciona vantagens como a diminuição de gastos com energia e a minimização da degradação térmica dos compostos, quando comparado às vias químicas tradicionais. Estas são provavelmente as principais atrações que levam à substituição das tecnologias químicas atuais pelas biológicas. As gorduras e os óleos são produzidos em grande escala pelo

mundo, gerando em torno de 60 milhões de toneladas, sendo que mais de 2 milhões são utilizadas em processos que consomem uma grande quantidade de energia tais como hidrólise, glicerólise e alcoólise (HASAN *et al.*, 2006).

Indústria de Detergentes:

O campo de aplicação das lipases mais importante comercialmente é a indústria de detergentes. Aproximadamente 1000 toneladas de lipases são adicionadas a 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos a cada ano, competindo com os surfactantes normalmente empregados, pela maior eficiência na remoção de manchas, em superfícies e em tecidos, pela menor temperatura necessária à lavagem e pela biodegradabilidade (MARTINS, 2007; MENDES *et al.*, 2005).

Tratamento de Efluentes:

O derramamento de óleo em oceanos e rios e em grandes áreas de terra tem sido uma constante nos dias atuais. O despejo do rejeito da indústria de laticínios e indústria oleoquímica, principalmente nos leitos fluviais, ocorre de forma criminosa no Brasil, seja pela falta de uma legislação mais rígida ou pelo descaso das autoridades competentes. As lipases surgem como uma excelente alternativa para o tratamento do rejeito industrial composto por material graxo (ALONSO, 2007).

Indústria Farmacêutica e Química Fina:

As indústrias farmacêuticas e de química fina vêm utilizando cada vez mais as lipases em seus processos produtivos. As características de regio, enantio e quimiosseletividade das lipases permitem a sua utilização na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos compostos. Além disso, essas enzimas apresentam, em geral, excelente estabilidade na presença de solventes orgânicos, nos quais os substratos dessas reações são solúveis (BON *et al.*, 2008).

Recentemente foi evidenciado o esforço da indústria farmacêutica em produzir compostos opticamente puros, em detrimento da produção das misturas racêmicas, que por sua vez levava a uma série de implicações, como a ocorrência de vários efeitos colaterais indesejados. Isto porque a maioria dos fármacos sintetizados possui um ou mais centros quirais, e ainda continua a ser comercializada como uma mistura racêmica (ALONSO, 2007; XIN *et al.*, 2001; HUTT *et al.*, 1984).

Usando a estereosseletividade das lipases, ácidos e álcoois racêmicos podem ser resolvidos através de reação de esterificação e transesterificação. Esta crescente conscientização da importância da quiralidade na atividade biológica tem estimulado a busca por métodos de síntese industriais de enantiômeros puros, como anti-inflamatórios, agentes anti-hipertensivos que inibem as enzimas conversoras de angiotensina e bloqueadores de canais de cálcio (TREVISAN, 2004; GHOSH *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2005).

Na área de química fina, a empresa alemã BASF desenvolveu um processo que emprega a lipase da bactéria *Burkholderia plantarii* imobilizada em poliacrilato, para a produção de (R)-feniletilmetoxiamida em uma escala superior a 100 toneladas por ano, com rendimentos superiores a 90%. Este composto é um intermediário para a obtenção de fármacos e pesticidas (LIESE *et al.*, 2006). Slotema *et al.* (2003) descreveram um processo economicamente viável de produção contínua de oleamida, um agente lubrificante, via amidação do ácido oléico com amônia, catalisada pela lipase da levedura *Candida antarctica* em 2-metil-2-butanol. Calculou-se uma produtividade de 4,5 toneladas/ano de oleamida por quilograma de enzima, indicando uma contribuição da enzima no custo do processo de apenas 4%.

Indústria de Polpa e Papel:

O alcatrão, constituído em grande parte por ceras e triglicerídeos, e que causa problemas na manufatura de polpa e papel, pode ser removido com o auxílio de lipases. A Nippon Paper Industries desenvolveu um método de controle de alcatrão que usa lipase de *Candida rugosa* para hidrolisar até 90% dos triglicerídeos da madeira (SHARMA, 2001; BAJPAI, 1996).

Reações de transesterificação e produção de biodiesel:

Óleos vegetais (soja, milho, algodão, palma etc.) são considerados uma excelente fonte de energia renovável e potencialmente inesgotável. O biodiesel é considerado um possível substituto para o diesel convencional, visto que é composto por metil ou etil éster que podem ser produzidos a partir de triacilglicerol presentes em óleos vegetais por reações de transesterificação com metanol ou etanol (MEHER *et al.*, 2006; LARA *et al.*, 2004; VILLENEUVE *et al.*, 2000; SCHUCHARDT *et al.*, 1998).

É importante ressaltar que muitas das aplicações das lipases citadas anteriormente necessitam de estudos mais detalhados e estão em número bastante reduzido em relação às possibilidades de utilização destas enzimas no futuro. A sua plena utilização esbarra

na redução dos custos dos processos de produção e purificação, na busca por novas cepas produtoras, no melhoramento genético destas cepas, além da mutagênese sítio dirigida, ou da modificação química das lipases afim de que produzam maiores quantidades destas enzimas em tempos menores e com características desejáveis (MARTINS, 2007).

1.1.5 Separação e purificação de lipases

Macromoléculas de uma forma geral e independente da fonte que as originam, podem ser extraídas e purificadas por métodos que sofrem adaptações dependendo do grau de separação e purificação desejados (SAID e PIETRO, 2010).

Para desenvolvimento de um protocolo racional de purificação enzimática, algumas informações sobre a lipase em questão são altamente desejáveis como a massa molecular da enzima e seu ponto isoelétrico. Entretanto, estes dados só estarão disponíveis quando a enzima estiver purificada. Um protocolo experimental de purificação é elaborado, em geral, por tentativa e erro e com base no que existe na literatura. Como regra geral a maioria dos protocolos de purificação de lipase segue as seguintes etapas: nos primeiros passos de purificação são utilizadas colunas de grande capacidade de troca e baixo custo. Estão aí incluídas as colunas de troca iônica e de interação hidrofóbica. Nas etapas finais de purificação em geral são usadas colunas de filtração em gel, que garantem a remoção de agregados e produtos de degradação sofrida pelas enzimas ao longo do processo de purificação (PALEKAR *et al.*, 2000). Muitas vezes o processo de purificação de uma lipase é dificultado pela natureza hidrofóbica dessas enzimas. Como resultado disso ocorre uma forte agregação protéica o que acaba dificultando a separação de uma lipase da outra, fazendo-se necessário a utilização de mais passos cromatográficos para desagregação das enzimas. Essa formação de agregados de alta massa molar é comumente relatada nos estudos de purificação de lipases (SNELLMAN *et al.*, 2002; MAQBOOL *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2001; IMAMURA e KITaura, 2000; JINWAL *et al.*, 2003; LITTHAUER *et al.*, 2002; NISHIO *et al.*, 1986; BERTON *et al.*, 1997; STUER *et al.*, 1986; GILBERT *et al.*, 1991; LESUISSE *et al.*, 1993; RÚA *et al.*, 1997; DÜNHAUPT *et al.*, 1992; DHARMSTHITI *et al.*, 1999; LOTRAKUL *et al.*, 1997). A formação de agregados pode ocorrer devido à presença de lipídeos ou à característica hidrofóbica (resíduos de aminoácidos hidrofóbicos) que a estrutura protéica das lipases apresenta. Outro problema é a alta viscosidade do fluído de cultura devido, provavelmente, à presença de lipolissacarídeos. Essas moléculas podem ter

sido excretadas como um complexo enzima-lipolissacarídeo ou secretadas separadamente para depois formar uma associação com a enzima através de interações hidrofóbicas. Para contornar esse problema da agregação protéica, normalmente são utilizados detergentes ou solventes orgânicos. Entretanto esses procedimentos, assim como a aumento do número de passos cromatográficos, acabam levando a uma grande perda da atividade enzimática. De modo geral, para purificar lipases microbianas, alcançando rendimentos de 30% e fatores de purificação em torno de 320 vezes, 4 a 5 passos de purificação são necessários (GUPTA *et al.*, 2004; SAXENA *et al.*, 2003).

O grau de purificação necessário de uma preparação enzimática vai depender de sua aplicação, assim produtos destinados a usos terapêuticos, por exemplo, são obviamente os que requerem maior grau de pureza e, portanto, a complexidade do processo de purificação é elevada. Para a utilização de enzimas em outros processos de biocatálise, desde que as impurezas presentes no extrato enzimático não interfiram na reação catalisada e na utilização do produto final, processos parciais de purificação podem ser suficientes (GUPTA *et al.*, 2004; KORNBERG, 1990).

1.1.6 Secagem de enzimas

Uma das grandes dificuldades na produção de proteínas para fins comerciais é sua baixa estabilidade em soluções aquosas. A água facilita uma série de degradações físicas e/ou químicas durante o processo de extração e purificação da proteína. Dessa forma, a obtenção de proteínas na forma de pó é uma relevante área de pesquisa. No caso de enzimas, a forma desidratada oferece uma série de vantagens, dentre as quais maior estabilidade, proporcionando maior prazo de validade para o produto (DE PAZ, 2002). As formulações sólidas possuem além de um prazo de validade maior, também maior praticidade no manuseio, transporte e estocagem à temperatura ambiente (LIAO *et al.*, 2003).

O processo de secagem em “spray dryer”, também chamado de secagem por nebulização, é objeto de grande interesse em diversas áreas de conhecimento como nas ciências alimentícias, farmacêuticas e na área química. Com a utilização do “spray dryer” é possível a transformação de produtos líquidos e pastosos para a forma de pós secos em uma única etapa. Os pós produzidos por “spray dryer” reúnem padrões elevados de qualidade com relação à granulometria do produto, umidade final, homogeneidade, densidade e forma, sendo que estas características podem ser alteradas por modificações nos parâmetros do processo (SOUZA, 2003). Embora envolva uma tecnologia cara que

necessita de altos investimentos em instalações e operações, muitas são as razões pelas quais a mesma é muito utilizada. Essas razões incluem a produção de materiais com propriedades físicas desejadas, a capacidade de processar diferentes tipos de matérias primas e a possibilidade de secagem sobre condições assépticas evitando possíveis contaminações durante o processamento (ETZEL, 1996).

Este tipo de secagem teve seus primeiros passos na metade do século 18, quando foi patenteada a primeira operação de secagem de ovos (1865). Porém, o início de sua utilização como processo em nível industrial data da década de 1920. Os primeiros produtos de que se tem notícia que foram obtidos, em larga escala, pela secagem por nebulização foram o leite e o sabão em pó. A partir de então, seu uso disseminou-se nas indústrias em geral, sendo hoje, especialmente aplicado para a secagem em larga escala de produtos nas áreas alimentícia e farmacêutica. Sua versatilidade operacional permite desde escalas laboratoriais da ordem de mililitros por hora até dezenas de toneladas por hora na produção industrial. Além disto, dada sua versatilidade e o pequeno tempo de residência dos produtos na câmara de secagem, tornou-se o principal equipamento para a secagem de materiais que apresentam sensibilidade ao calor, como alimentos e materiais de origem biológica. Dentre estes cabe citar os extratos e produtos oriundos de plantas como corantes e de microorganismos como enzimas e proteínas. Outro campo onde a secagem por nebulização tem adquirido destaque recentemente é na microencapsulação de substâncias.

Alguns produtos termo-sensíveis requerem atenção especial no projeto e operação do equipamento. Por exemplo, enzimas podem sofrer inativação térmica durante o processo de secagem, problema que pode ser minimizado pela redução no diâmetro das gotas atomizadas, pela utilização de baixos teores de sólidos na solução e baixas temperaturas do ar de saída, além do uso de adjuvantes que protegem a estrutura da enzima (ETZEL, 1996).

Como pode ser constatada nas informações contidas nesta seção, lipases são enzimas versáteis e largamente utilizadas. Lipases mais seletivas e estáveis têm sido produzidas por seleção natural ou por engenharia de proteínas, que melhoram as propriedades destas enzimas. Apesar do futuro promissor, o progresso é relativamente lento, em razão do custo ainda elevado das lipases e da falta de enzimas com propriedades que atendam a várias das possíveis aplicações. A expectativa é que as lipases futuramente sejam tão importantes como catalisadores industriais, como são as proteases e carboidrases atualmente.

2. OBJETIVOS

Este projeto foi a continuação do trabalho de Iniciação Científica realizada pelo ex-aluno Marco Antônio Nogueira, bolsista FAPESP (Número do processo: 06/50955-3). Em seu estágio de Iniciação Científica o estudante padronizou em nosso laboratório o método de avaliação de lipase, selecionou um fungo endofítico produtor e padronizou as condições ideais para produção destas enzimas. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo geral:

- Estudar as lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*, utilizando óleo de soja como substrato e estabilizar a enzima através do processo de secagem por “spray dryer”.

Objetivos específicos:

- Produzir o extrato enzimático por fermentação submersa;
- Desenvolver e otimizar um protocolo de purificação, utilizando técnicas cromatográficas de interação hidrofóbica e de gel filtração;
- Caracterizar cinética e bioquimicamente a lipase purificada;
- Comparar as propriedades bioquímicas das lipases presentes no extrato bruto, das lipases ligadas ao micélio com as da enzima extracelular purificada;
- Secar e caracterizar bioquimicamente após secagem em “spray dryer” tanto a lipase presente no extrato bruto quanto a purificada;
- Otimização dos parâmetros de secagem por “spray dryer” da lipase presente no extrato bruto e caracterização bioquímica do produto obtido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte desse trabalho referente à produção, purificação e caracterização das lipases foi desenvolvida no Laboratório de Enzimologia Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. O processo de secagem em “spray dryer” foi realizado no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Farmacêuticos (LAPROFAR) desta mesma unidade. O esquema geral do desenvolvimento deste trabalho está representado na Figura 4. Foram estudadas as lipases contidas no extrato bruto (portanto as lipase extracelulares), a lipase purificada do extrato bruto extracelular e as lipases ligadas ao micélio. Assim este trabalho dividiu-se em três partes principais:

Primeira parte: Produção e purificação das lipases;

Segunda parte: Caracterização das propriedades cinéticas e bioquímicas das lipases do extrato bruto, daquela ligada ao micélio e da purificada;

Terceira parte: Estudo da secagem em “spray dryer” do extrato bruto e da enzima pura e semi-purificada, além da caracterização das lipases secas.

3.1 MICRORGANISMO, MANUTENÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foi utilizado, no presente trabalho, o fungo endofítico *Cercospora kikuchii*, isolado da planta *Tithonia diversifolia*, o qual foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Mônica T. Pupo (FCFRP-USP) e identificado pela Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Mattos do Laboratório de Taxonomia e Sistemática de Fungos “Coleção de culturas micoteca URM”, Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

A cepa foi mantida por repiques sucessivos em meio inclinado de PDA no Laboratório de Enzimologia Industrial sob supervisão da Profa. Dra. Suraia Said. Os repiques foram realizados utilizando alça de platina, transferindo pedaços de micélio para meio fresco. A cultura foi incubada por sete dias em estufa a 30°C e mantida sob refrigeração ou inoculada no meio de cultura para produção da enzima.

Frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), suplementado com 2% de óleo de soja, como única fonte de carbono, foram inoculados com 2 cm² de micélio do fungo endofítico previamente crescido como descrito acima. As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação constante (120 rpm) por 6 dias. O micélio formado foi removido por filtração a vácuo e a atividade das lipases foi avaliada nos filtrados das culturas.

Figura 4. Esquema geral de produção, purificação, caracterização e secagem das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*.

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O ensaio para a determinação da atividade enzimática foi realizado de acordo com Mayordomo *et al.*, 2000, o qual baseia-se na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100 (Figura 5).

A mistura de reação foi assim constituída:

Solução tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5.....	205 µL
Solução de pNPP 1,5 mg/mL emulsificada.....	45 µL
Mistura enzimática.....	250 µL

Constituição das soluções:

1. Solução tampão fosfato de sódio 50 mM; pH 6,5:

Triton X-100	200 mg
Goma arábica.....	50 mg
Tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5.....	50 mL

1.1 Tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5:

NaH ₂ PO ₄	5,999 g
H ₂ O _{destilada}	1000 mL

2. Solução de p-NPP 1,5 mg/mL:

pNPP.....	15mg
2-propanol.....	10 mL

Antes da adição de 250 µL da enzima a mistura foi pré-aquecida a 40°C. Depois de 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de solução Trisma-base 2% e a densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade (U) de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de p-nitrofenol/minuto nas condições descritas acima. O branco continha os mesmos constituintes da mistura de reação, substituindo-se o volume de enzima por enzima inativada por fervura.

Figura 5. Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

3.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Nas frações coletadas, durante as cromatografias, a presença de proteínas foi determinada pelo coeficiente de distinção teórica da luz no comprimento de onda de 280 nm e sua quantificação no filtrado celular ou em cada etapa-chave da purificação, foi avaliada pelo método de Bradford (1976), baseada na interação entre Coomassie Brilliant Blue G-250 e regiões contendo grupos aromáticos das proteínas, formando um complexo colorido que possui máxima absorção de cor na faixa de 595 nm. Albumina bovina (BSA) foi usada para confecção da curva padrão.

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO

Para determinação da atividade enzimática das lipases ligadas ao micélio, foi utilizado o método descrito por Romero *et al.*, (2007), com pequenas modificações. O “pellet” de uma fermentação de 6 dias foi coletado por filtração a vácuo e lavado exaustivamente com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 até que o filtrado não apresentasse mais atividade lipolítica. Em seguida, a 0,01 g de micélio foi adicionado 455 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 contendo 45 µL da solução de *p*NPP 1,5 mg/mL. Após 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL Trisma base 2%. A mistura de reação foi centrifugada, o precipitado descartado e o sobrenadante foi utilizado para determinar a densidade óptica em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade (U) de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de *p*-nitrofenol/minuto/mg nas condições expressas acima. O branco continha os mesmos

constituintes da mistura de reação, substituindo-se a massa de micélio por uma amostra inativada por fervura (25 min).

3.5 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO

3.5.1 RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E DIÁLISE DO FLUIDO DE CULTURA

O fluido da cultura foi separado do micélio por filtração a vácuo, através de funil de Buchner acoplado a kitassato e bomba a vácuo. Em seguida, com o intuito de eliminar interferentes na etapa de purificação e nas análises enzimáticas, foram utilizados filtros Millipore®, com capacidade de retenção de proteínas com massa molecular igual ou superior a 0,45 μm . O filtrado foi então dialisado contra tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 sob agitação constante em câmara fria a 5°C. O volume de tampão utilizado em cada troca foi 25 vezes maior do que o volume do filtrado e foram realizadas 3 trocas. Em seguida, o filtrado dialisado, foi concentrado com polietilenoglicol.

3.5.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

O extrato bruto (8,73 mg de proteína) de uma cultura incubada por 6 dias, após diálise e concentração com polietilenoglicol conforme descritos no item 3.5.1, foi aplicado em coluna Butyl-Sepharose Fast Flow (2,0 x 30,0 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 acrescentado de 1M de sulfato de amônio. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min⁻¹ a 25°C. As lipases adsorvidas à resina foram eluídas com o mesmo tampão diminuindo gradativamente a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frações de 3,0 mL foram coletadas e mantidas em banho de gelo. A atividade enzimática e o teor de proteína foram avaliados em cada amostra.

3.5.3 CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO

As frações coletadas da cromatografia de interação hidrofóbica, foram reunidas e concentradas pelo método utilizado no fluido da cultura (item 3.5.1) e 1,5 mL foi aplicado em coluna de 1,0 cm x 58 cm empacotada com a resina Sephacryl S-200HR, equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 contendo 150 mM de NaCl, a 25°C. A amostra foi

eluída no mesmo tampão de equilíbrio com fluxo de $9,6 \text{ mL.h}^{-1}$ e as frações foram coletadas em intervalos de 15 minutos.

As frações contendo a enzima foram reunidas e concentradas com polietilenoglicol e 0,2 mL foi novamente aplicado em coluna de Sephacryl S-200HR, equilibrada sob as mesmas condições anteriores. A amostra foi eluída no mesmo tampão da coluna descrita acima com fluxo de $6,0 \text{ mL.h}^{-1}$ e as frações foram coletadas em intervalos de 10 minutos.

O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado a 280 nm e a atividade lipolítica foi determinada nas frações eluídas.

3.5.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS

A placa para eletroforese foi preparada com gel de concentração a 4% e de separação a 12%. A eletroforese desenvolveu-se em tampão Tris-Glicina SDS 25 mM, pH 8,3 (LAEMMLI, 1970), à temperatura ambiente e com corrente de 20mA. As amostras foram diluídas antes da aplicação no gel na proporção de 1:1 em um sistema tampão SDS-descontínuo (HAMES, 1987) sendo constituído por tampão Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,002% de azul de bromofenol. O gel permaneceu sob corrente constante até a saída do corante. O gel foi corado com prata através do método de Blum (1987). As proteínas padrões utilizadas foram: fosforilase B (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

3.5.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR APARENTE POR FILTRAÇÃO EM GEL

A massa molecular da enzima foi estimada por gel filtração utilizando a coluna Sephacryl S-200HR como descrito no item 3.5.3. O perfil de eluição foi acompanhado por medidas da absorbância a 280 nm para as proteínas padrões e pela atividade da enzima.

As proteínas β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 KDa), soroalbumina bovina (66 kDa), α -lactoalbumina (14,2 kDa) e citocromo C (12,4 kDa) foram utilizadas para a padronização da coluna e o azul dextrana para a determinação do volume morto (V_0). O volume de eluição de cada proteína (V_e) e do azul dextrana (V_0) foram medidos e a relação V_e/V_0 determinada. A massa molecular da enzima foi estimada através da reta padrão obtida por inserção em gráfico, dos logaritmos das massas moleculares das proteínas padrões contra a razão V_e/V_0 de cada uma.

3.5.6 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR EM SDS-PAGE

A massa molecular da enzima foi determinado por meio da reta padrão obtida por inserção em gráfico, do logaritmo das massas moleculares das proteínas padrões contra o fator de retenção (dr/dm) e posterior regressão linear onde dr é distância de retenção do soluto (distância percorrida pela proteína) e dm é a distância percorrida pelo solvente.

Como marcadores as seguintes proteínas foram utilizadas, fosforilase B (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE DAS LIPASES PRODUZIDAS PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Cercospora kikuchii*.

As características das lipases contidas no extrato bruto, das lipases ligadas ao micélio e da lipase pura foram estudadas. Os ensaios realizados com o extrato bruto e com as lipases ligadas ao micélio tiveram como objetivo verificar se estas enzimas apresentavam características bioquímicas, que possibilitassem sua aplicação em biocatálise que não requer uma purificação total. Após a purificação, alguns dos ensaios foram repetidos, agora com a finalidade de conhecer as propriedades bioquímicas da enzima pura. Em todos os ensaios as atividades foram determinadas com o método do p NPP (palmitato de p -nitrofenila), que está descrito na seção 3.2.

3.6.1 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA E TERMOESTABILIDADE DA LIPASE PURIFICADA

Para determinação da temperatura ótima, a avaliação da atividade lipolítica foi realizada nos intervalos de temperatura de 15 a 60°C. A termoestabilidade foi determinada através da incubação prévia da lipase por duas horas nas temperaturas entre 40 e 60°C, em seguida procedeu-se a reação enzimática a 35°C.

3.6.2 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DA LIPASE PURIFICADA

Para determinação do pH ótimo da enzima pura a reação enzimática ocorreu nos seguintes valores de pHs: citrato-fosfato (2,2 a 7,8); Tris-HCl (8,2 a 9,0). O estudo foi realizado em triplicada.

3.6.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS – K_m e V_{max}

Para a determinação das constantes cinéticas a enzima pura foi incubada com diferentes concentrações de pNPP variando entre 0,015 e 0,4 mmol/L, na temperatura e pH ótimo de atividade. Os valores de K_m e V_{max} foram determinados plotando os dados no programa Prism5. O substrato utilizado na cinética enzimática foi preparado por diluição.

3.6.4 EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS LIPASES DO EXTRATO BRUTO E LIGADAS AO MICÉLIO

Para determinar o efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica das lipases presentes no extrato bruto e daquelas ligadas ao micélio, a reação enzimática ocorreu em temperaturas entre 15 e 80°C, em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5. A estabilidade à temperatura foi determinada através da incubação prévia das enzimas em temperaturas entre 40 e 80°C. Amostras foram removidas em diferentes tempos de incubação e a atividade lipolítica residual foi determinada na temperatura ideal para cada enzima.

3.6.5 EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LIPASES DO EXTRATO BRUTO E LIGADAS AO MICÉLIO

Para a determinação do melhor pH para hidrólise, as lipases foram incubadas em suas respectivas temperaturas ótimas nos seguintes tampões a 50 mM: citrato-fosfato (2,2 a 7,8); Tris-HCl (8,2 a 9,0). O estudo foi realizado em triplicada.

3.7 PROCESSO DE SECAGEM DO EXTRATO BRUTO, DA ENZIMA SEMI-PURIFICADA E DA LIPASE PURA

3.7.1 “SPRAY DRYER”

A solução enzimática tanto do extrato bruto, da lipase semi-purificada e da enzima pura, foi submetida à secagem em “spray dryer” através da adição de diferentes adjuvantes, com 0,1 % de Tween 20: maltodextrina DE20, maltodextrina DE10, manitol, goma arábica, trealose, sacarose, β -ciclodextrina e lactose.

A operação teve início com a alimentação e aquecimento do gás de secagem. Atingida a temperatura desejada, iniciou-se a alimentação da solução enzimática contendo os adjuvantes de secagem, a uma vazão pré-fixada do ar de atomização. Uma vez a solução enzimática na câmara de secagem, foram efetuadas as medidas, em intervalos regulares, da temperatura de saída do gás, T_{gs} , para se obter o instante em que

o processo entra em regime permanente (em torno de 10 minutos). Em seguida, iniciou-se então a retirada de amostra do produto seco durante aproximadamente 40 minutos. Essas amostras foram utilizadas para as análises físico-químicas do produto da secagem (determinação da umidade, distribuição granulométrica, morfologia e da atividade enzimática residual das amostras secas).

O “spray drying” utilizado no projeto (SD 05 fabricado pela LAB-PLANT, Reino Unido) está apresentado na Figura 6 e sua câmara de secagem possui diâmetro de 215 mm e altura de 500 mm. Os principais componentes do sistema são:

- Sistema de alimentação de suspensão, que é composto por uma bomba peristáltica, e um atomizador de duplo fluido à ar comprimido;
- Sistema de alimentação do ar de secagem, constituído por um compressor e filtro de ar;
- Sistema de controle de temperatura do gás de secagem e,
- Sistema coletor do produto seco (ciclone).

Figura 6. Equipamento “spray dryer” utilizado: 1- reservatório, 2- bomba peristáltica, 3- sistema de atomização, 4- câmara de secagem, 5- ciclone, 6- coletor do produto seco, 7- painel de controle.

3.7.2 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE SECAGEM EM “SPRAY DRYER” E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA SECA

3.7.2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA APÓS A SECAGEM

O ensaio de atividade enzimática após a secagem em “spray dryer” foi realizado como descrito no item 3.2 com pequena modificação: para obtenção da solução enzimática, dissolveu-se 0,1 g de enzima seca em 1 mL de tampão fosfato 50 mM pH 6,5. Em seguida procedeu-se a avaliação da atividade enzimática.

3.7.2.2 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE RESIDUAL (BASE SECA)

A umidade no produto seco foi medida pelo método da estufa (utilizando uma estufa de convecção forçada, à temperatura de $102 \pm 1^\circ\text{C}$, até atingir massa constante) colocando-se uma massa determinada do produto em uma placa de Petri, verificando-se o teor de umidade através da seguinte relação:

$$X_p = \frac{M_{\text{úmido}} - M_{\text{seca}}}{M_{\text{seca}}} \times 100 \quad (1)$$

onde:

$M_{\text{úmido}}$ = massa do material úmido adicionado à Placa de Petri (g);

M_{seca} = massa do material após secagem em estufa até massa constante (g)

X_p = umidade do produto em base seca (g.H₂O/g.material seco).

Os resultados foram obtidos a partir dos valores médios de três determinações.

3.7.2.3 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

A distribuição granulométrica da amostra foi determinada dispersando-se uma quantidade de pó sob uma lâmina de vidro e obtendo-se imagens com a ajuda de um microscópio óptico (Olympus® - modelo BX60MIV). As fotos obtidas foram analisadas por um sistema de análise de imagens utilizando na contagem das partículas o diâmetro médio que se refere ao comprimento médio dos diâmetros medidos em intervalos de dois graus e passando através do centro da partícula (IMAGE PRO-PLUS®, 2009).

3.7.2.4 ANÁLISE DAS PARTICULAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia das partículas foi observada através de microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram dispostas sobre um suporte e cobertas com um filme de ouro. As fotomicrografias foram realizadas com um aumento de 1000 e 15000 vezes.

3.7.2.5 RECUPERAÇÃO DO PRODUTO

A taxa de recuperação do produto ou o rendimento do processo foi calculado através de percentual entre a massa de pó total coletada e a massa de sólidos alimentada no equipamento (SOUZA, 2003).

3.8 OTIMIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE SECAGEM

Com base nas informações obtidas nos ensaios preliminares de secagem descritos no item 3.7.1, selecionou-se lactose, maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina como os adjuvantes de secagem que conferiram os melhores resultados no que se refere à retenção da atividade enzimática. Os experimentos de secagem seguiram um planejamento do tipo composto central feito para cada adjuvante de secagem (EXC) utilizado. Para otimização dos ensaios de secagem foram selecionadas as variáveis que mostraram maior influência no desempenho do secador e nas características do produto seco obtido, sendo a vazão de alimentação do extrato (W_s), a porcentagem de adjuvante utilizada (ADJ) e da temperatura de entrada do gás de secagem (T_{ge}), conforme representado na Tabela 3. A codificação dos níveis das variáveis independentes para o planejamento (composto central) foi feito seguindo as seguintes equações:

$$T_{ge,C} = \left(\frac{T_{ge} - 120,0}{20,0} \right) \quad (2)$$

$$W_{s,C} = \left(\frac{W_s - 6,0}{2,0} \right) \quad (3)$$

$$ADJ_C = \left(\frac{ADJ - 7,0}{3,0} \right) \quad (4)$$

Tabela 3. Variáveis analisadas no planejamento experimental.

Variáveis	- 1.682	- 1	0	1	1.682
W_s (g/min)	2,63	4,0	6,0	8,0	9,36
ADJ (%)	1,95	4,0	7,0	10,0	12,05
T_{ge} (°C)	86,4	100,0	120,0	140,0	153,6

Os ensaios foram delineados através de um planejamento composto central (16 combinações). O planejamento dos experimentos foi gerado com o auxílio do programa Statistica® para Windows versão 8.0 (2007). A caracterização do produto seco foi realizada através da avaliação da atividade enzimática residual, da umidade residual (base seca) e da recuperação do produto.

3.9 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE APÓS SECAGEM EM “SPRAY DRYER”

Após a secagem do extrato bruto, na presença de diferentes adjuvantes, foi avaliada a estabilidade enzimática no pó obtido. O ensaio de atividade enzimática foi realizado conforme o item 3.7.2.1.

3.10 REAGENTES

Os principais reagentes utilizados no presente trabalho, assim como a sua procedência e grau de pureza, estão citados na Tabela 4.

Tabela 4. Procedência e grau de pureza dos reagentes utilizados no trabalho.

Reagente	Marca	Grau de Pureza
Acetona	Merck	P.A
Álcool Isopropílico	Cinética Química	P.A
Acrilamida	Sigma	Para eletroforese
Albumina Bovina (BSA)	Sigma	99%
Azul de Bromofenol	Sigma	Para eletroforese
Bis-Acrilamida	Sigma	Para eletroforese
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	Sigma	Para eletroforese
Etanol	Cinética Química	P.A
Glicerol	Merck	P.A
Goma Arábica	Synth	P.A
Hidróxido de Sódio	Synth	P.A
Mercaptoetanol	Sigma	Para eletroforese
Nitrato de Prata	Reagem	P.A
Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila	Sigma	P.A
Óleo de soja	Marca comercial	Grau alimentício
Persulfato de Amônio	Synth	Para eletroforese
Temed	Sigma	Para eletroforese
Tris	Merck	P.A
Triton X-100	Sigma	Para biol. molecular
Lactose	Sigma	≥ 99,5%
β-ciclodextrina	Sigma	≥ 97,0%
Sacarose	Synth	P.A
Maltodextrina DE10	Corn Products Brasil	Grau alimentício
Maltodextrina DE20	Corn Products Brasil	Grau alimentício
Tiosulfato de Sódio Penta Hidratado	Reagem	P.A

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA DAS LIPASES DE *Cercospora kikuchii*

Nessa etapa do projeto, grande parte do trabalho experimental foi concentrada na busca das melhores técnicas cromatográficas para isolar e purificar as lipases. Dessa forma, diferentes colunas cromatográficas foram testadas. Dentre as colunas inicialmente utilizadas estão as de troca iônica: DEAE-Sepharose Fast Flow e CM-Sepharose Fast Flow. Entretanto devido à natureza hidrofóbica da maioria das lipases, estas colunas não foram efetivas na separação e purificação destas enzimas uma vez que a atividade específica, o índice de purificação e o rendimento foram extremamente baixos. Assim, decidiu-se por colunas de interação hidrofóbica, seguida de coluna de gel filtração. Apresenta-se a seguir o detalhamento dos protocolos experimentais que permitiram isolar e purificar uma das lipases produzidas pelo fungo endofítico *C. kikuchii*.

Coluna de Interação Hidrofóbica:

O extrato bruto (15 mL) dialisado e concentrado, contendo 8,73 mg de proteína, foi aplicado em coluna Butyl-Sepharose Fast Flow com fluxo de 1 mL/min. Este tipo de cromatografia tem sido extensivamente utilizada na purificação de lipases, principalmente devido ao forte caráter hidrofóbico destas enzimas que seria responsável pela formação dos agregados enzimáticos. Dos grupamentos utilizados neste tipo de cromatografia, grupos butila, fenila e octila são os mais frequentemente empregados (SAXENA *et al.*, 2003).

O perfil da cromatografia do extrato bruto na coluna de Butyl-Sepharose Fast Flow, esta representado na Figura 7. A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada pela passagem inicial de tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 50 mM pH 6,5) com a diminuição gradual da concentração de sulfato de amônio (1M e 500 mM), seguido pela passagem somente do tampão de equilíbrio e por fim passagem de água destilada. A cromatografia apresentou 4 Pools de atividade lipolítica, com destaque para o Pool IV que apresentou maior atividade específica e rendimento. O resumo do processo de separação e purificação em coluna de Interação Hidrofóbica esta representado na Tabela 5.

Figura 7. Perfil de separação cromatográfica da lipase produzida por *C. kikuchii* – Interação Hidrofóbica. O fluido da cultura dialisado e concentrado foi aplicado em coluna Butyl-Sepharose Fast Flow (2,0 x 30 cm). Frações de 3,0 mL foram coletadas e analisadas em A_{280} (linha vermelha) e atividade enzimática (linha azul). Frações de 1-50: tampão com 1M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 50-100: tampão com 500 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 100-150: tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5; 150-250: água destilada.

Tabela 5. Resumo do processo de purificação: Butyl-Sepharose Fast Flow

Amostra	U/Total	Ativ. Específica U/mg	Proteína Total (mg)	Ip	Rendimento %
Extrato bruto	352,5	40,35	8,73	1	100,0
Butyl-Sepharose					
Pool I	34,00	11,44	2,97	0,30	9,64
Pool II	26,00	104,0	0,25	2,57	7,37
Pool III	6,250	15,24	0,41	0,37	1,77
Pool IV	282,00	188,0	1,50	4,65	80,0

Ip: Índice de purificação

1ª CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO:

O Pool IV (frações entre 150-250) eluído durante a passagem de água destilada na coluna de interação hidrofóbica foi concentrado com polietilenoglicol e aplicado em uma coluna de gel filtração. A coluna de Sephacryl S-200HR foi pré-equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 acrescentado de 150 mM de NaCl, com um fluxo de 9,6 mL.h⁻¹. As frações foram coletadas em intervalos de 15 minutos. A cromatografia de gel filtração baseia-se na separação de proteínas de acordo com a massa molar e tem sido utilizada para a purificação de muitas lipases microbianas (SAXENA *et al.*, 2003). Trabalhos anteriores mostraram que muitas vezes lipases formam agregados de alta

massa molar, que eluem no volume morto da coluna de gel filtração, o que facilita a purificação posterior (KRIEGER *et al.*, 1999)

O perfil cromatográfico desta primeira coluna de gel filtração revelou dois picos de proteína e somente um deles apresentou atividade lipolítica (Figura 8).

Figura 8. Perfil de separação cromatográfica da lipase produzida por *C. kikuchii* - 1ª Coluna de gel filtração. O Pool IV obtido da coluna de interação hidrofóbica foi concentrado e aplicado em coluna Sephacryl S-200HR (2,0 x 30 cm) pré-equilibrada com 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 6,5 com 150 mM de NaCl. Frações de 2,0 mL foram coletadas e analisadas em A_{280} (linha vermelha) e atividade enzimática (linha azul).

2ª CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO:

As frações contendo atividade lipolítica obtidas da 1ª coluna de gel filtração foram reunidas, concentradas com polietilenoglicol e novamente aplicadas na coluna de Sephacryl S-200HR, equilibrada sob as mesmas condições. A amostra foi eluída no mesmo tampão de equilíbrio da coluna descrito acima com fluxo de $6,0 \text{ mL.h}^{-1}$ e as frações foram coletadas em intervalos de 10 minutos. O perfil cromatográfico desta segunda coluna de gel filtração revelou um único pico de proteína que coincidia com um pico apresentando atividade enzimática (Figura 9).

Figura 9. Perfil de separação cromatográfica da lipase produzida por *C. kikuchii* – 2ª Coluna de gel filtração. O Pool I obtido da 1ª coluna de gel filtração foi concentrado e aplicado numa 2ª coluna Sephacryl S-200HR (2,0 x 30 cm) pré-equilibrada com 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 6,5 com 150 mM de NaCl. Frações de 1,0 mL foram coletadas e analisadas em A_{280} (linha vermelha) e atividade enzimática (linha azul).

O resumo do processo final de purificação assim como o perfil eletroforético dos Pools obtidos pelas três colunas estão representados respectivamente na Tabela 6 e na Figura 10.

Tabela 6. Resumo do processo final de purificação de uma lipase produzida por *C. kikuchii*.

Amostra	U/Total	Ativ. Específica	Proteína Total (mg)	Ip	Rendimento %
Extrato bruto	352,5	40,35	8,73	1	100,0
Interação Hidrofóbica Pool IV	282,0	188,0	1,50	4,65	80,0
1ª Gel Filtração Pool I	94,0	375,0	0,25	9,31	26,6
2ª Gel Filtração Pool II	31,3	223,6	0,14	5,54	9,0

Ip: Índice de purificação

Figura 10. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes do filtrado da cultura, do Pool IV obtido da Coluna Butyl-Sepharose Fast Flow e Pool I e II das Colunas de Gel Filtração. Coluna 1: Pool II 2ª coluna de gel filtração (30 µg); 2: Pool I 1ª coluna de gel filtração (48 µg); 3: Pool IV Butyl-Sepharose Fast Flow (77 µg); 4: fluido de cultura, dialisado e concentrado (137 µg); 5: padrões de massa molecular: fosfolipase B (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

A maioria das aplicações comerciais não exige preparações homogêneas de lipases, no entanto, um certo grau de pureza permite um uso mais eficiente. Além da purificação enzimática permitir a determinação da sequência primária de aminoácidos, esta é fundamental para o estudo da estrutura tridimensional. Os estudos de raios-X de lipases puras permitiram o estabelecimento de relações estrutura-função e contribuíram para um melhor entendimento dos mecanismos de ação cinética na hidrólise, síntese e intercâmbio de grupo de ésteres (GHOSH *et al.*, 1996; TAIPA *et al.*, 1992). Além disso, as preparações de lipases purificadas são necessárias nas indústrias que empregam enzimas para a produção biocatalítica de química fina, produtos farmacêuticos e cosméticos.

Protocolos de purificação disponíveis na literatura são importantes para consulta quando se tenta purificar qualquer novo tipo de preparação enzimática. Na maioria das vezes, uma única etapa cromatográfica não é suficiente para obter o

nível necessário de pureza, assim, uma combinação de passos cromatográficos é necessária. Cromatografia de troca iônica é o método cromatográfico mais comum, usado em 67% dos sistemas de purificação analisados e em 29% destes é utilizada mais de uma vez. De acordo com Saxena (2003) gel filtração é o segundo método de purificação empregado, utilizado em 60% dos sistemas de purificação seguida pela cromatografia de interação hidrofóbica (18%). Apesar da cromatografia de gel filtração possuir uma menor capacidade de interação, ela é muito utilizada nas etapas de polimento final dos protocolos de purificação. Com técnicas de afinidade (incluindo a cromatografia de interação hidrofóbica), o fator de purificação obtido varia 2 a 10 (SAXENA, 2003).

Os procedimentos habituais de purificação de lipases são, por vezes, trabalhosos e demorados, resultando em baixa produtividade final. Algumas novas tecnologias de purificação de lipases têm sido recentemente aplicadas, as quais incluem processos de membrana, imunopurificação, coluna cromatográfica de fase estacionária e sistemas aquosos de duas fases (PALEKAR *et al.*, 2000). Na Tabela 7 estão representadas as características de lipases fúngicas purificadas por diferentes métodos cromatográficos. Analisando essa tabela, verifica-se que os parâmetros utilizados para avaliar a eficiência de um processo de purificação, como recuperação, índice de purificação e atividade específica, apresentam valores muito distintos. Isso acontece mesmo quando se analisa uma mesma espécie de microrganismo. Uma das razões é a diversidade dos métodos cromatográficos, dos meios de cultura, das espécies e do conteúdo dos extratos brutos produzidos, que podem interferir de forma significativa no resultado final da purificação. No caso do protocolo de purificação de uma das lipases do fungo *C. kikuchii*, apesar do rendimento ter sido relativamente baixo, o fator de purificação e principalmente a atividade específica (223,6 U/mg) foram muito satisfatórios. Se considerarmos uma aplicação industrial da lipase que não exija uma purificação total, a utilização da coluna de interação hidrofóbica torna-se ainda mais interessante uma vez que o Pool IV apresentou ótimos resultados para recuperação (80%) e para atividade específica (188,0 U/mg).

Tabela 7. Características e métodos para purificação de várias lipases fúngicas.

Microrganismo	Principais Cromatografias	Rec %	A_E U/mg	Ip	M.M (kDa)	Referência
<i>Rhizopus oryzae</i>	Sephadex G-100	64	189	160	65	Razak <i>et al.</i> , (1997)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	gel filtração; Sephadex G-100	42	25	720	67	Chattopadhyay <i>et al.</i> , (1999)
<i>Rhizopus chinensis</i>	DEAE-Sepharose; gel filtração	27	146	25	28,4	Yasuda <i>et al.</i> , (1999)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Sephadex G-75	22	8800	126	32	Hiol <i>et al.</i> , (2000)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Sephadex G-100	11	11,1	9,7	40	Razak <i>et al.</i> , (1997)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Phenyl Sepharose;	20	15	88	56	Sztajer <i>et al.</i> , (1992)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Phenyl Sepharose;	44	4,6	30	40	Ferrer <i>et al.</i> , (2000)
<i>Penicillium cyclopium</i>	Sephadex G-75; DEAE-Sephadex	30	1000	590	37	Chahinian <i>et al.</i> , 2000
<i>Cunninghamella verticillata</i>	Interação hidrofóbica	33	44	18,9	60	Gopinath <i>et al.</i> , (2002)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Interação hidrofóbica	32	21	42	36	Wu <i>et al.</i> , 1996
<i>N. crassa</i>	Sephadex G-100	23	44	8,6	54	Kundu <i>et al.</i> , (1987)
<i>Aspergillus niger</i>	Sephadex G-75; DEAE-Sepharose	34	1,8	600	35	Sugihara <i>et al.</i> , (1988)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Interação hidrofóbica	41	1180	48	41	Toida <i>et al.</i> , (1995)
<i>Aspergillus terreus</i>	Gel filtração; Q-Sepharose	28	250	11	41	Yadav <i>et al.</i> , (1998)
<i>Penicillium abeanum</i>	Interação hidrofóbica	12	3,7	200	28	Sugihara <i>et al.</i> , (1996)
<i>Botrytis cinerea</i>	Octyl-Sepharose; Sephacryl S-200	21	25	31	60	Commenil <i>et al.</i> , (1995)
<i>Geotrichum candidum</i>	Troca iônica; Sephacryl S-200	62	74	35	61	Veeraragavan <i>et al.</i> , (1990)
<i>Fusarium globulosum</i>	Octyl-Sepharose	31	110	29	73	Saxena, (2003)
<i>Humicola lanuginosa</i>	Sephadex G-75; DEAE-Sepharose	15	3,0	150	39	Omar <i>et al.</i> , (1987)
<i>Pythium ultimum</i>	DEAE-Sepharose; Sephacryl S-200	22	42	66	71	Mozaffar e Weete, (1993)
<i>Cercospora kikuchii</i>	Butyl-sepharose; Sephacryl S-200HR	9	223,6	5,54	65,1/73,5	Costa-Silva (2010)

Rec: recuperação; A_E: atividade específica; Ip: índice de purificação; M.M: Massa molecular.

4.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR FILTRAÇÃO EM GEL E SDS-PAGE

A massa molecular da lipase pura foi estimada através de SDS-PAGE e por cromatografia de gel filtração Sephacril S-200HR. Plotou-se os valores do logaritmo da massa molar dos padrões utilizados *versus* os valores dos fatores de retenção da migração relativa de cada padrão e da enzima. Assim, a análise de regressão linear permitiu estimar a massa molar da lipase pura em 65,1 kDa (Figura 11). Utilizando a cromatografia de gel filtração o peso molecular foi estimado em 73,5 kDa (Figura 12). Uma diferença em torno de 10%, dos valores do peso molecular obtidos com o uso desses dois métodos, é aceitável. Neste caso, a diferença ficou em torno do valor aceito, o que pode indicar que a lipase purificada trata-se de um monômero. O massa molecular da lipase do fungo *Botrytis cinerea* foi estimado em 60 e 72 kDa, utilizando respectivamente SDS-PAGE e coluna de gel filtração, indicando que também se tratava de um monômero (COMMÉNIL *et al.*, 1995). Ocorrência diferente foi relatada para o fungo *Pythium ultimum* em que a massa molecular da lipase foi estimada em 270 kDa utilizando Sephacryl S-200 e em 68 kDa com SDS-PAGE, indicando que se tratava de um tetrâmero (MOZAFFAR e WEETE, 1993). Como apresentado na Tabela 7, a massa molar de lipases fúngicas variam em torno de 28,4 a 76 kDa, podendo no entanto, encontrar citações que extrapolam esses valores. Assim, os valores encontrados para a massa molar da lipase pura, nos dois métodos utilizados, estão dentro do que normalmente é reportado na literatura científica.

Figura 11. Estimativa da massa molecular relativa da lipase pura de *Cercospora kikuchii* por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Equação: $y = -1,9305x + 4,4596$ ($R^2 = 0,9896$)

PM: 73,5 kDa

Figura 12. Estimativa da massa molecular relativa da lipase pura de *Cercospora kikuchii* por filtração em gel Sephacril S-200HR.

4.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE: EXTRATO BRUTO, LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO E LIPASE PURA

4.3.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CINÉTICA DA LIPASE PURA

Após a purificação, a lipase de *C. kikuchii* foi estudada quanto às suas características cinéticas e de estabilidade. Foram determinados os efeitos do pH e da temperatura na atividade, estabilidade frente à temperatura, além do efeito da concentração do substrato na atividade lipolítica.

4.3.1.1 TEMPERATURA ÓTIMA E TERMOESTABILIDADE

Para determinar a temperatura ótima na atividade enzimática da lipase pura, a hidrólise do pNPP foi acompanhada em temperaturas entre 15 e 60°C (Figura 13). Nas condições experimentais utilizadas, a atividade máxima foi obtida na temperatura de 35°C.

Com relação à termoestabilidade, a lipase purificada apresentou maior estabilidade a 40°C e nesta temperatura manteve 80,2% de sua atividade inicial após 2 horas de incubação. Entretanto a enzima ainda reteve 74,3 e 68,5% de sua atividade após 2 horas de incubação nas temperaturas de 45 e 50°C (Figura 14).

Figura 13. Efeito da temperatura sobre a atividade da lipase purificada de *Cercospora kikuchii*. Condições do ensaio: 15 - 60°C, tampão fosfatado sódio 50 mM pH 6,5, concentração de proteína: 7,0 mg/mL, pNPP 0,135 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata.

Figura 14. Estabilidade frente à temperatura da lipase purificada de *C. kikuchii*. Atividade residual após incubação a 40, 45, 50 e 60°C. Condições de ensaio: 35°C, tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, pNPP 0,135 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata.

Várias lipases são reportadas como termoestáveis, característica importante no desenvolvimento de processos que visam a reutilização das enzimas. Fungos termofílicos podem ser fontes potenciais para produzir enzimas termotolerantes. Em estudo realizado por Burkert *et al.* (2004), com lipase obtida de *Geotrichum candidum* NRRL-Y552, a estabilidade foi reduzida quando a temperatura era elevada a níveis superiores a 30°C. Temperaturas de estabilidade maiores foram

relatadas para lipase produzida por *Rhizopus homothallicus* que apresentou tempo de meia vida ($t_{1/2}$ = 0,72 h) a 50°C e para lipase de *Aspergillus niger* 40°C foi a temperatura na qual esta apresentou maior estabilidade (DIAZ *et al.*, 2006; KAMINI *et al.*, 1998). A lipase purificada de *Aspergillus carneus*, demonstrou maior estabilidade entre as temperaturas de 30-50°C (SAXENA *et al.*, 2003). Considerando esta faixa, pode-se citar a estabilidade térmica obtida para enzima de *Candida rugosa* e de uma mistura de isoenzimas comerciais (Sigma), a 30°C (CASA *et al.*, 2006). Na Tabela 8 pode-se visualizar os distintos valores de temperatura e pH ótimos obtidos para lipases fúngicas purificadas e produzidas em diferentes condições de fermentação. Uma comparação com os resultados encontrados na literatura no que se refere à termoestabilidade, a lipase purificada de *C. kikuchii* apresentou valores de atividade residual acima do que normalmente é encontrado para lipases purificadas nas temperaturas de 40 a 50°C. Nestas temperaturas os valores de atividade residual variaram de 80 a 68,5% após duas horas de incubação.

Tabela 8. Características bioquímicas de lipases fúngicas purificadas e produzidas em diferentes condições de fermentação.

Microrganismo	Temp. (°C)	pH	Termoestabilidade	Referência
<i>Penicillium</i>				
<i>aurantiogriseum</i>	60	6 - 8	80%/1h - 28°C	Lima <i>et al.</i> , (2004a)
<i>Penicillium sp.</i>	45	7 - 9	93%/1h - 60°C	Prazeres <i>et al.</i> , (2006)
<i>Aspergillus</i>				
<i>cerneous</i>	37	9	55%/0,16h - 70°C	Saxena <i>et al.</i> , (2003)
<i>Rhizopus</i>				
<i>homothallicus</i>	38	8	$t_{1/2}$ =40min - 50°C	Diaz <i>et al.</i> , (2006)
<i>Antrodia</i>				
<i>cinnamomea</i>	60	11	50%/1h - 40°C	Shu <i>et al.</i> , (2006)
<i>Antrodia</i>	45	9	80%/24h - 25°C	Shu <i>et al.</i> , (2006)
<i>cinnamomea</i>				
<i>Penicillium</i>	42	8,5	nd	Menoncin <i>et al.</i> , (2008)
<i>verrucosum</i>				
<i>Aureobasidium</i>	30	8,5	nd	Liu <i>et al.</i> , (2008)
<i>pullulans</i>				
<i>Mucor miehei</i>	30	7	nd	Huge-Jensen <i>et al.</i> , (1987)
<i>Aspergillus</i>	50	10	60%/1h - 45°C	Yadav <i>et al.</i> , (1998)
<i>terreus</i>				
<i>Penicillium</i>	30	8	70%/1h - 35°C	Sugihara <i>et al.</i> , (1996)
<i>abeanum</i>				
<i>Penicillium</i>	45	8	nd	Ferrer <i>et al.</i> , (2000)
<i>chrysogenum</i>				
<i>Aspergillus niger</i>	45	7	98,7%/30min - 60°C	Shu <i>et al.</i> , (2006b)
<i>Cercospora</i>	35	4,6	80,2%/2h - 40°C	Costa-Silva (2010)
<i>kikuchii</i>				

nd: não determinado

4.3.1.2 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DA LIPASE PURA

A determinação do pH ótimo na atividade da lipase purificada de *C. kikuchii* foi estudada na faixa de 2,2 a 9,0 (Figura 15). A enzima foi ativa em uma ampla faixa de pH, sendo que a atividade máxima foi obtida no pH 4,6 (38,7 U/mL). Entretanto, mesmo em valores extremos como em pH 9,0, detectou-se 50% da atividade dosada em pH 4,6. Analisando o valor de pH ótimo obtido neste trabalho, pode-se constatar que este difere normalmente dos valores indicados na literatura para outras lipases fúngicas. Estas últimas normalmente são mais ativas em pH que variam do neutro ao alcalino (Tabela 8). Neste caso em que o pH ótimo foi mais ácido do que normalmente é relatado, faz com que a lipase purificada de *C. kikuchii* se torne uma alternativa viável para processos catalíticos que exijam valores de pH abaixo da neutralidade.

Figura 15. Efeito do pH na atividade enzimática da lipase purificada de *C. kikuchii*. Tampões utilizados nos ensaios na concentração de 50 mM: Mc Ilvaine pH – 2,2 a 7,8; Tris-HCl pH- 7,8 a 9. Ensaio de atividade: 35°C, 7,0 mg/mL de proteína, pNPP 0,135 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata.

4.3.1.3. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS – K_m e V_{max}

O efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática foi realizado mantendo-se a concentração de enzima e variando-se a concentração de pNPP entre 0,015 e 0,4 mmol/L. Observou-se que a atividade aumenta de acordo com o aumento da concentração do substrato de maneira linear (Figura 16). Para tentar descrever o comportamento cinético da lipase pura de *C. Kikuchii*, os dados foram analisados segundo a equação de Michaelis-Menten ($V_0 = V_{max} \cdot [S] / K_M + [S]$). Esta equação é representada graficamente plotando-se V_0 (velocidade inicial) contra S (concentração de substrato) e descreve uma hipérbole retangular (Figura 16). Assim o valor de K_m e V_{max} para a enzima pura utilizando pNPP como substrato foi estimado em 0,03240 mM e 10,28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente. A comparação dos parâmetros cinéticos aqui estudados com outros da literatura é dificultada uma vez que há uma grande variedade de substratos utilizados. No entanto, Shu *et al.*, (2006b) relataram valores de k_m e V_{max} para o fungo *Aspergillus niger*, utilizando pNPP, em 7,37 mmol/L e 25,91 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ respectivamente.

Figura 16. Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase purificada de *C. kikuchii*. Condições de ensaio: 35 °C, concentração de proteínas: 7,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentração de pNPP: 0,015-0,4 mmol/L, tampão Mc Ilvaine pH 4,6. Ensaios realizados em triplicata.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DA MELHOR TEMPERATURA E TERMOESTABILIDADE DAS LIPASES PRESENTES NO EXTRATO BRUTO

A Figura 17 mostra o efeito da temperatura, em uma faixa entre 15 e 80°C, na atividade enzimática do extrato bruto de *C. kikuchii*. As maiores atividades foram obtidas na faixa de 40°C (47,4 U/mL) a 65°C (35,7 U/mL), com atividade máxima a 60°C (54,5 U/mL).

Para determinar a estabilidade térmica, o extrato bruto foi incubado nas temperaturas de 50 a 80°C. As atividades residuais estão mostradas na Figura 18. Observa-se que as lipases presentes no extrato bruto de *C. kikuchii* apresentaram uma excelente termoestabilidade. Os valores das atividades residuais variaram de 46,0% (80°C) a 85,3% (50°C) após 2 horas de incubação na ausência de substrato.

Figura 17. Efeito da temperatura na atividade lipolítica do extrato bruto de *C. kikuchii*. Condições do ensaio: temperatura entre 15 e 80°C, tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, concentração de proteína: 0,6 mg/mL e *p*NPP 0,135 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata.

Figura 18. Estabilidade à temperatura da atividade lipolítica do extrato bruto de *C. kikuchii*. Atividade residual após incubação nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C. Condições de ensaio: temperatura de 60 °C, tampão fosfato do sódio 50 mM pH 6,5, concentração de proteínas: 0,6 mg/mL e pNPP 0,135 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata.

Os resultados obtidos para a melhor temperatura de atividade enzimática e para a termoestabilidade das lipases contidas no extrato bruto tornam essas enzimas interessantes para uma aplicação industrial que utiliza altas temperaturas. Um exemplo é a indústria oleoquímica e a de detergente. Nesta última, pode-se utilizar temperaturas em torno de 60 °C o que aperfeiçoa o processo de remoção das manchas. No que se refere às lipases fúngicas, aquelas termoestáveis são ainda mais difíceis de encontrar. Exemplo são as lipases de *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus niger* e *Fusarium heterosporum* que mostraram alta atividade em temperaturas em torno de 50 °C (LIMA *et al.*, 2004b; SHIMADA *et al.*, 1993; NAMBOODIRI *et al.*, 2000). Na temperatura de 60 °C, a lipase de *Humicola lanuginosa* manteve 100% da atividade após 20 h de incubação, a de *Aspergillus niger* 80% após 90 minutos, enquanto que a de *Aspergillus terreus* manteve 100% após 24 h (OMAR *et al.*, 1987; YADAV *et al.*, 1998; VAN HEERDEN *et al.*, 2002). Outros exemplos de extratos brutos contendo lipases com suas características bioquímicas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Características bioquímicas de lipases fúngicas presentes no extrato bruto produzidas em diferentes condições de fermentação.

Microrganismo	Temperatura (°C)	pH	Termoestabilidade	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	37	4-10	80%/1h - 50 °C	Kamini <i>et al.</i> (1998)
<i>Aspergillus niger</i>	35	7-10	100%/1h - 40 °C	Romero <i>et al.</i> (2007)
<i>Aspergillus niger</i>	45	5-7	100%/1h - 50 °C	Mahadik <i>et al.</i> (2002)
<i>Aspergillus niger</i>	40	7	80%/24h - 25 °C	Mahadik <i>et al.</i> (2002)
<i>Penicillium</i> sp.	42	4	T _{1/2} =76h - 25 °C	Wolski <i>et al.</i> (2009)
<i>Penicillium verrucosum</i>	44	7	nd	Kempka <i>et al.</i> (2008)
<i>Penicillium</i> sp.	37	5,5	nd	Wolski <i>et al.</i> (2009)
<i>Antrodia cinnamomea</i>	45	8	nd	Shu <i>et al.</i> (2006)
<i>A. cinnamomea</i>	60	7-12	57%/1h - 80 °C	Lin e Ko (2005)
<i>Geotrichum</i> sp.	50	7	75%/1h - 60 °C	Ginalska <i>et al.</i> (2004)
<i>C. kikuchii</i>	60	6,2	85,3%/2h - 50 °C	Costa-Silva (2010)

4.3.2.1 EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LIPASES PRESENTES NO EXTRATO BRUTO

Como pode ser constatado na Tabela 9, apesar da possibilidade de atuação em uma ampla faixa de pH, a maioria das lipases fúngicas presentes em extratos brutos apresentam maior atividade lipolítica em valores próximos ao neutro. Esta característica também foi constatada nas lipases presentes no extrato bruto produzido por *C. Kikuchii* (Figura 19). Foram verificadas altas atividades no intervalo de pH entre 3,8 (38,9 U/mL) e 7,0 (31,5 U/mL), com atividade máxima em pH 6,2 (51,6 U/mL). Em valores extremos de pH (pH 2,2) ainda detectou-se atividade lipolítica (17,5 U/mL).

Figura 19. Efeito do pH na atividade lipolítica do extrato bruto de *C. kikuchii*. Condições de ensaio: 60 °C, 0,6 mg/mL de proteína, 0,135 mg/mL de pNPP. Tampões utilizados nos ensaios 50 mM: Mc Ilvaine pH – 2,2 a 7,8; Tris-HCl pH- 7,8 a 9,0. Ensaios realizados em triplicata.

4.3.3 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE E TERMOESTABILIDADE DAS LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO

Para determinar a melhor temperatura de reação para as lipases ligadas ao micélio, o ensaio enzimático foi realizado em temperaturas que variaram de 15 a 80 °C (Figura 20). Nas condições experimentais utilizadas, essas lipases apresentaram uma grande capacidade de atuação em uma ampla faixa de temperatura. Alta atividade enzimática foi obtida entre 30 (4940 U/mg) e 70 °C (4770 U/mg) com atividade máxima em 50 °C (7060 U/mg). Com relação ao estudo da termoestabilidade, as lipases ligadas ao micélio mantiveram pelo menos 75,1% de atividade residual após 2 horas de incubação a 80 °C (Figura 21).

Figura 20. Efeito da temperatura na atividade lipolítica das lipases ligadas ao micélio de *C. kikuchii*. Condições do ensaio: temperatura entre 15 e 80 °C, tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, *p*NPP 0,135 mg/mL e 0,01 g de micélio seco. Ensaio realizado em triplicata.

Figura 21. Estabilidade à temperatura da atividade lipolítica das lipases ligadas ao micélio de *C. kikuchii*. Atividade residual após incubação nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C. Condições de ensaio: temperatura de 50 °C, tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, *p*NPP 0,135 mg/mL e 0,01 g de micélio seco. Ensaio realizado em triplicata.

A utilização de lipase imobilizada como catalisador industrial tem sido amplamente estudada e revisada (MACRAE e HAMMOND, 1983; MACRAE, 1983; GANDHI, 1997, HAYES, 2006). No entanto, uma pertinente revisão da literatura mostra que há relativamente poucas pesquisas relacionadas às lipases naturalmente imobilizadas, ou seja, aquelas associadas ao micélio ou paredes celulares. Entretanto o interesse pelo uso de lipases naturalmente imobilizadas está cada vez mais evidente, porque a biomassa pode ser diretamente utilizada. Esta imobilização natural ao micélio permite a eliminação de procedimentos complexos de isolamento, purificação e imobilização, que muitas vezes resulta na perda da atividade (ROMERO *et al.*, 2007). Além disso, a estrutura celular pode agir como matriz natural capaz de proteger as enzimas de uma possível ação negativa dos agentes externos, proporcionando um efeito análogo ao exercido pela matriz comum usada para imobilização de enzimas. Além disso, a enzima livre pode apresentar baixa recuperação e rendimento após a imobilização química ou física em comparação com a imobilização natural (MUSTRANTA *et al.*, 1993).

Tendo em conta as inúmeras vantagens oferecidas pelas enzimas naturalmente imobilizadas, o estudo sobre a modificação de lipídios explorando essa propriedade ganhou maior atenção. Lipases ligadas ao micélio de *Aspergillus flavus* foram utilizadas para modificar diversos óleos vegetais através de acidólise, enquanto que as produzidas por *Rhizomucor miehei* foram usadas para transesterificação de óleo de palma (LIEW *et al.*, 2001; LONG *et al.*, 1997). Outros estudos sobre enzimas ligadas a micélio relatados na literatura incluem aqueles de *Rhizopus oryzae* (RAZAK *et al.*, 1999), *R. rhizopodiformis* (BASRI *et al.*, 1997), *Mucor circinelloides* (ANTCZAK *et al.*, 2002; SZCZESNA-ANTCZAK *et al.*, 2004) e *Aspergillus niger* (YU e LI, 2006).

A atividade e a estabilidade em altas temperaturas das lipases de *C. kikuchii* aumentam o potencial dessas enzimas para aplicação em biocatálise. Um destaque maior pode ser dado tanto para as lipases presentes no extrato bruto como para aquelas ligadas ao micélio. O extrato bruto apresentou atividade lipolítica máxima a uma temperatura de 60°C e uma excelente termoestabilidade em altas temperaturas devido à retenção de mais de 55% da atividade após 2 horas de incubação a 70°C. O caso das lipases ligadas ao micélio é ainda mais interessante uma vez que estas apresentaram atividade máxima a uma temperatura de 50°C e apresentou uma atividade lipolítica residual de 75,1% após 2 horas de incubação a uma temperatura

de 80°C. Resultados semelhantes foram relatados para lipases ligadas ao micélio de *Rhizopus oryzae* que apresentou maior atividade em temperatura de 60°C e 95,6% de atividade residual após duas horas de incubação nessa mesma temperatura (TORRES *et al.*, 2007). Em outro estudo, Razak *et al.* (1999) mostraram que a temperatura ideal para a atividade da lipase ligada ao micélio de *R. oryzae* foi de 37°C. A 50°C, manteve mais de 90% de sua atividade inicial após 30 minutos, mas a 70°C, apenas 10% da atividade inicial foi detectada.

Como mencionado anteriormente, a elevada atividade lipolítica e termoestabilidade em altas temperaturas pode estar relacionada ao fato da lipase estar imobilizada no micélio. Isso confere uma diminuição na possível deformação estrutural ocasionada por fatores de estresse, que no caso é a temperatura elevada. Foi demonstrado que quando as lipases do fungo *Aspergillus flavus* estavam ligadas no micélio apresentavam atividade máxima na temperatura de 55°C (LONG *et al.*, 2000). No momento em que estas lipases eram extraídas do micélio a temperatura ideal passava para 35°C, evidenciando o efeito protetor da imobilização natural dessas enzimas ao micélio.

4.3.3.1 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DAS LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO DO FUNGO ENDOFÍTICO *Cercospora kikuchii*

O efeito do pH sobre a hidrólise do pNPP pelas lipases ligadas ao micélio de *C. kikuchii* foi investigado no valores de pH entre 2,2 e 9,0. Mais uma vez essa lipases naturalmente imobilizadas apresentaram um grande potencial de atuação em todos os valores de pH testados (Figura 22). Foram verificadas altas atividades no intervalo de pH entre 3,0 (5260 U/mg) e 7,0 (5170 U/mg), com atividade máxima em pH 5,4 (6950 U/mg). Valores de pH ácidos também foram os ideais para máxima atividade enzimática das lipases ligadas ao micélio dos fungos *R. oryzae* (pH 4) e *Aspergillus niger* MYA 135 (pH 3) (ROMERO *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2007).

2

Figura 22. Efeito do pH na atividade lipolítica das lipases ligadas ao micélio de *C. kikuchii*. Condições de ensaio: 50 °C, 0,01 g de micélio, 0,135 mg/mL de pNPP. Tampões utilizados nos ensaios na concentração de 50 mM: Mc Ilvaine pH – 2,2 a 7,8; Tris-HCl pH- 7,8 a 9,0. Ensaios realizados em triplicata.

Considerando que as características bioquímicas de uma lipase podem variar grandemente na natureza, e até mesmo entre aquelas produzidas pelo mesmo microrganismo, foram feitos experimentos de caracterização da atividade lipolítica das lipases presentes no extrato bruto, daquelas ligadas ao micélio e da lipase purificada produzidas pelo fungo endofítico *C. kikuchii*, a fim de avaliar o potencial de aplicação destas enzimas em biocatálise.

A caracterização bioquímica das enzimas torna-se importante por fornecer dados para compreender a atuação e as eventuais alterações ocorridas, além de fornecer informações que devem ser consideradas no momento da aplicação da enzima na produção de novos compostos biotecnológicos. O potencial de produção de ésteres com lipases microbianas, sem aplicação preliminar de processos de purificação, vem sendo pesquisado para uso em reações biocatalíticas como a síntese do etil oleato (RUIZ *et al.*, 2004), com possibilidade de aplicação para produção sustentável de produtos como o biodiesel de óleos vegetais. Contudo, as lipases devem ser selecionadas para cada aplicação, sendo que estas podem ser baseadas na especificidade do substrato, bem como, temperatura e pH de atividade e estabilidade (CARVALHO *et al.*, 2008).

Quanto à avaliação da estabilidade de enzimas microbianas, muitos resultados são encontrados na literatura, embora a comparação profunda destes torna-se difícil já que diferentes métodos fermentativos, meios e microrganismos são empregados, assim como, diferentes sistemas e graus de purificação. A estabilidade frente a diferentes faixas de pH, normalmente é realizada em torno da neutralidade, mas também em valores de pH extremos (pH 2,0 e 12). O que se observa é que realmente a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa (LIMA *et al.*, 2004c).

Entre as lipases fúngicas, a ocorrência das termoestáveis são ainda mais raras. Pesquisas relatam que a estabilidade térmica da enzima pode estar relacionada com sua estrutura, e pode ser influenciada por fatores como, pH e íons metálicos, por exemplo. Alguns autores indicam que a estabilidade térmica de uma enzima pode ainda ser melhorada na presença de alguns cátions como Ca^{2+} , Na^+ , entre outros (SHARMA *et al.*, 2001). Em alguns casos, a estabilidade térmica de muitas lipases pode ser aumentada através do uso de técnicas de imobilização da enzima, (SHARMA *et al.*, 2001). No caso das lipases ligadas ao micélio existe a vantagem das mesmas já estarem imobilizadas de forma natural nas células fúngicas. Esta propriedade as tornam mais resistentes às mudanças conformacionais que eventualmente poderiam causar perdas de atividade enzimática e consequentemente aumentam o potencial de aplicação destas enzimas no contexto da tecnologia enzimática. Os resultados aqui encontrados para a influência do pH na atividade das lipases produzidas por *C. kikuchii*, ou seja, atividade lipolítica numa faixa relativamente ampla de pH (3,0 a 8,0), também são desejáveis em biocatálise e somam-se às boas características frente às temperaturas apresentadas por essas enzimas. A literatura reporta que o pH neutro é geralmente definido como ótimo para atividade lipolítica (BENJAMIN e PANDEY, 2000), bem como a temperatura de aproximadamente 37°C, temperatura semelhante no caso da lipase purificada neste estudo (BURKERT *et al.*, 2004; FREIRE *et al.*, 1997; BENJAMIN e PANDEY, 2000).

Um ponto relevante, e por isso dever ser ressaltado, é a versatilidade dos microrganismos na produção de enzimas. Diante das diferentes propriedades bioquímicas e cinéticas das enzimas contidas no extrato bruto, das ligadas ao micélio e da purificada, pode-se inferir que se tratam de lipases diferentes. Uma possível razão para a capacidade de síntese de diferentes lipases pelo mesmo

microrganismo é o fato de que este está sujeito a agentes abióticos extremamente diversificados, o que o estimula a produzir enzimas que atendam essas exigências ambientais. Portanto, a diversidade microbiana e o seu potencial genético são fatores que impulsionam a busca por substâncias com alto valor agregado, como é o caso das enzimas.

4.4 SECAGEM DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA EM “SPRAY DRYER”

Esta etapa do trabalho subdividiu-se em três partes principais:

Primeira parte: Estudo da viabilidade do uso de diferentes adjuvantes durante o processo de secagem do extrato bruto em “spray dryer”.

Segunda parte: Seleção dos melhores adjuvantes e otimização dos processos de secagem utilizando planejamento fatorial seguido da análise em superfície de resposta; Estudo da estabilidade da enzima seca no período de estocagem em diferentes temperaturas de armazenamento.

Terceira parte: Secagem da lipase purificada nas condições otimizadas.

4.4.1 ESTUDO DA VIABILIDADE DE SECAGEM EM “SPRAY DRYER” DO EXTRATO BRUTO NA PRESENÇA DE DIFERENTES ADJUVANTES

Diferentes adjuvantes nas concentrações de 2, 6 e 10% com 0,1% de Tween 20: maltodextrina DE20, maltodextrina DE10, manitol, goma arábica, trealose, sacarose, β -ciclodextrina e lactose foram testados. A avaliação da viabilidade da secagem em “spray dryer” da lipase em estudo, com a adição de diferentes adjuvantes, foi realizada através de ensaios da atividade enzimática residual após a secagem.

Como podem ser analisados pela Tabela 10, quase todos os adjuvantes utilizados mostraram-se viáveis para a secagem da lipase quando utilizados na presença de 0,1% de Tween. A presença do Tween é importante porque esta substância ajuda na mobilidade do pó durante o processo, fazendo com que haja menor tempo de secagem além de uma maior recuperação do produto. Dentre as concentrações de adjuvantes testadas, a mais adequada foi a de 10% em todos os casos e os adjuvantes que se mostraram mais promissores foram os carboidratos

maltodextrina DE10, β -ciclodextrina e lactose, pois mantiveram os maiores valores de atividade residual. Assim estes adjuvantes foram selecionados para a otimização das condições de secagem.

Tabela 10. Atividade lipolítica residual após secagem em “spray dryer” utilizando diferentes adjuvantes.

Adjuvante	Concentração (%)	Atividade residual (%)
Maltodextrina DE10	10	50,00
Manitol	10	12,00
Manitol + Maldextrina 1910	10	6,10
Sacarose + 0,1% Tween	10	0,00
Maltodextrina DE10 + 0,1% Tween	10	91,00
	6	32,90
	2	9,60
Lactose + 0,1% Tween	10	100,0
	6	61,20
	2	19,70
Maltodextrina DE20 + 0,1% Tween	10	90,50
	6	34,20
	2	6,70
Manitol + 0,1% Tween	10	87,80
	6	45,00
	2	13,50
Goma arábica + 0,1% Tween	10	87,10
	6	38,50
	2	7,70
Trealose + 0,1% Tween	10	63,30
	6	33,80
	2	10,90
β -ciclodextrina + 0,1 % Tween	10	92,4
	6	51,2
	2	11,5
Sem Adjuvante	-	0,00

4.4.2 OTIMIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE SECAGEM

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística muito utilizada em trabalhos experimentais que visam à otimização de processos. Consiste na realização de um estudo sobre um fenômeno, que possua muitas variáveis que precisam ser analisadas de maneira organizada. Com isso pode-se delinear um caminho que conduza ao objetivo planejado utilizando-se de um número mínimo de experimentos. Por esta técnica é possível constatar quais são as variáveis que exercem maior influência no processo, o efeito individual de cada uma delas e as interações que estas variáveis possuem entre si. Quando rigorosamente aplicado, o método possibilita avaliar os erros experimentais e a modelagem matemática dos resultados experimentais em função das variáveis significantes.

Os ensaios foram delineados através de um planejamento composto central (16 combinações) para cada tipo de adjuvante usado: lactose, maltodextrina e β -ciclodextrina. As variáveis estudadas foram temperatura de entrada do gás de secagem (T_{ge} : 86,4 a 153,6°C), a vazão de alimentação da solução no “spray dryer” (W_s : 2,63 a 9,36 g/min) e a concentração de adjuvantes adicionada ao extrato bruto (ADJ: 1,95 a 12,05%). Os níveis máximos e mínimos das variáveis estudadas foram selecionados de acordo com os resultados obtidos na seção 4.4.1. O desempenho do “spray dryer”, assim como as propriedades da enzima seca, foram avaliados de acordo com a taxa de recuperação do produto, da umidade e morfologia das partículas secas e principalmente através da atividade residual obtida após o processo de secagem.

A Tabela 11 apresenta os parâmetros operacionais e os resultados obtidos para os ensaios de secagem em “spray dryer” do extrato bruto utilizando a lactose, maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina como adjuvantes de secagem.

Tabela 11. Parâmetros operacionais e resultados obtidos para os ensaios de secagem em “spray dryer” do extrato bruto de *C. kikuchii* utilizando lactose, maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina como adjuvantes.

Parâmetros operacionais				Resultados experimentais											
				Lactose				Maltodextrina DE10				β -Ciclodextrina			
Exp.	T_{ge} (°C)	ADJ (%)	W_s (g/min)	T_{gs} (°C)	R_{EC} (%)	R_{AE} (%)	X_P (%)	T_{gs} (°C)	R_{EC} (%)	R_{AE} (%)	X_P (%)	T_{gs} (°C)	R_{EC} (%)	R_{AE} (%)	X_P (%)
1	100	4	4	68,7	65,0	43,0	5,40	68,05	58,70	37,30	5,52	70,0	66,0	39,3	4,52
2	100	4	8	60,0	64,2	35,3	11,40	59,40	61,37	38,36	7,65	60,4	50,9	40,6	6,65
3	100	10	4	69,4	64,7	98,6	6,00	68,00	60,16	77,69	5,12	66,7	49,2	92,0	4,92
4	100	10	8	63,8	64,0	67,3	7,10	59,00	54,82	95,90	4,70	59,0	55,6	97,9	7,12
5	140	4	4	97,1	62,5	24,1	5,70	93,00	54,80	37,32	2,86	84,0	54,7	39,8	2,25
6	140	4	8	86,3	65,6	24,3	4,60	82,00	58,69	39,00	4,37	85,0	65,0	41,0	2,12
7	140	10	2,63	95,3	65,1	68,8	5,50	94,00	64,32	95,90	3,09	84,5	65,5	88,0	2,13
8	140	10	8	85,0	66,6	72,6	6,90	84,70	52,69	100,0	2,87	83,0	78,6	90,0	2,05
9	86,4	7	6	57,3	58,5	47,1	6,80	53,00	57,69	71,00	3,63	63,4	53,5	73,0	4,26
10	153,6	7	6	97,8	86,5	40,0	5,80	94,00	55,73	73,85	3,07	93,5	70,6	71,5	1,69
11	120	1,95	6	79,5	54,8	11,1	6,70	77,50	51,28	6,05	2,74	76,5	60,0	23,0	3,07
12	120	12,05	6	78,5	58,4	85,6	5,40	79,00	63,11	100,0	1,31	75,5	61,2	95,0	3,25
13	120	7	2,63	87,5	66,7	44,0	5,10	82,50	82,46	71,00	4,92	85,4	57,1	71,0	2,31
14	120	7	9,36	68,8	89,1	47,0	6,70	67,00	67,55	70,37	5,08	65,5	51,7	70,8	5,15
15 (C)	120	7	6	78,5	60,0	53,5	4,50	77,50	61,92	65,41	5,10	77,0	58,8	65,3	3,41
16 (C)	120	7	6	85,0	59,6	52,4	6,00	78,00	73,00	65,00	4,60	78,5	57,7	65,0	3,34

Exp.: experimento; T_{ge} : temperatura de entrada; ADJ: Adjuvante; W_s : vazão de alimentação; T_{gs} : temperatura de saída; R_{EC} : recuperação; R_{AE} : retenção da atividade enzimática; X_P : umidade.

Lactose como adjuvante:

Os resultados para a atividade enzimática residual apresentada na Tabela 11 foram submetidos a uma análise de variância (Tabela 12) visando identificar os parâmetros de processo que apresentam significância estatística. Com essa análise foi identificado que somente a concentração de adjuvante e a temperatura do gás de secagem apresentaram efeito significativo sobre a retenção da atividade enzimática. Uma equação relacionando a retenção da atividade enzimática com os parâmetros do processo foi obtida por análise de regressão não linear. A tabela 13 apresenta a equação obtida a qual apresenta um R^2 de 0,927. A Figura 23 mostra a superfície de resposta gerada pela Equação 5 (Tabela 13) em função da retenção da atividade enzimática após o processo de secagem. Como esperado, a retenção da atividade enzimática aumenta proporcionalmente com o aumento na proporção de lactose adicionada à solução alimentada no secador. Também houve uma pequena tendência da redução da atividade enzimática com o aumento da temperatura de entrada do gás de secagem (T_{ge}).

Tabela 12. Análise de variância realizada para os resultados de retenção da atividade enzimática.

Variáveis	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{CALC}
T_{ge}	169,227	2	84,614	0,994
$T_{ge(L)}$	323,717	1	323,717	3,803***
$T_{ge(Q)}$	14,737	1	14,737	0,173
ADJ	3426,345	2	1713,173	20,126*
ADJ _(L)	6850,917	1	6850,917	80,485*
ADJ _(Q)	1,774	1	1,774	0,021
Ws	34,294	2	17,147	0,201
Ws _(L)	65,614	1	65,614	0,771
Ws _(Q)	2,973	1	2,973	0,035
Interações				
$T_{ge(L)} ADJ_{(L)}$	3,538	1	3,538	0,042
$T_{ge(L)} Ws_{(L)}$	231,770	1	231,770	2,723
$ADJ_{(L)} Ws_{(L)}$	49,700	1	49,700	0,584
Erro	510,723	6	85,121	
Total	8062,564	15		

*o termo é significativo ($\alpha = 0,01$); *** o termo é significativo ($\alpha = 0,1$); L = efeito linear; Q = efeito quadrático

Tabela 13. Equação modelada para os resultados experimentais da retenção da atividade enzimática.

Equação (5)	R ²
$R_{AE} = a_0 + a_1 \cdot ADJ + a_2 \cdot T_{ge} + a_3 \cdot W_s + a_{23} \cdot T_{ge} \cdot W_s$ $a_0 = 131,354; a_1 = 7,463; a_2 = -1,051; a_3 = -17,242; a_{23} = 0,1346$	0,927

Figura 23. Superfície de resposta obtida para retenção da atividade enzimática em função da proporção de adjuvante e da temperatura do ar de secagem.

Também foi realizada uma análise de variância para os resultados experimentais da recuperação e umidade do produto seco, apresentados respectivamente nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14. Análise de variância realizada para os resultados da recuperação do produto seco.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{CALC}
T _{ge}	280,527	2	140,263	2,930
T _{ge (L)}	175,893	1	175,893	3,674^{***}
T _{ge (Q)}	104,634	1	104,634	2,186
ADJ	53,555	2	26,777	0,559
ADJ _(L)	6,139	1	6,139	0,128
ADJ _(Q)	47,416	1	47,416	0,990
Ws	379,169	2	189,584	3,960 ^{**}
Ws _(L)	122,657	1	122,657	2,562
Ws _(Q)	256,512	1	256,512	5,358 ^{**}
Erro	430,876	9	47,875	
Total	1292,321	15		

^{**} termo é significativo ($\alpha = 0,05$); ^{***} termo é significativo ($\alpha = 0,01$); L = efeito linear; Q = efeito quadrático

Tabela 15. Análise de variância realizada para os resultados de umidade do produto seco.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrad o médio	F _{CALC}
T _{ge}	7,911	2	3,956	2,234
T _{ge (L)}	5,722	1	5,722	3,232
T _{ge(Q)}	2,189	1	2,189	1,236
ADJ	2,510	2	1,255	0,709
ADJ _(L)	1,164	1	1,164	0,657
ADJ _(Q)	1,346	1	1,346	0,760
Ws	8,715	2	4,358	2,461
Ws _(L)	7,655	1	7,655	4,323***
Ws _(Q)	1,060	1	1,060	0,599
Interações				
T _{ge (L)} ADJ _(L)	4,191	1	4,191	2,367
T _{ge (L)} Ws _(L)	5,797	1	5,797	3,274
ADJ _(L) Ws _(L)	0,702	1	0,702	0,397
Erro	10,624	6	1,771	
Total	38,463	15		

*** termo é significativo ($\alpha = 0,01$); L = efeito linear; Q = efeito quadrático

A análise de variância para os resultados experimentais da recuperação do produto, incluindo efeito linear e quadrático e a interação de dois fatores não evidenciou efeitos significativos das variáveis estudadas. A umidade residual (X_p) é um bom indicador da qualidade do produto. Em geral, é aceitável que o conteúdo de umidade seja menor que 5% para que o risco de crescimento microbiano e degradações químicas sejam diminuídos. O conteúdo de umidade foi determinado pelo método de estufa, mantida a 102°C, colocando-se uma massa determinada do produto em uma placa de Petri e verificando sua massa periodicamente até obtenção de valor constante. A análise de variância feita para os resultados experimentais referentes à umidade não evidenciou efeitos significativos das variáveis estudadas. Entretanto, houve uma tendência de aumento da umidade com o aumento da vazão de alimentação do extrato ao “spray dryer”.

A Figura 24 mostra um gráfico da umidade (X_p) em função da temperatura de saída do gás de secagem. Pode ser observado que a umidade tende a diminuir com o aumento da temperatura do gás de saída.

Figura 24. Conteúdo de umidade (X_p) em função da temperatura do gás de saída (T_{gs}).

Maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina como adjuvantes:

Retenção da atividade enzimática

Uma vez que os resultados de otimização da secagem do extrato bruto utilizando maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina como adjuvantes apresentaram perfis semelhantes, a discussão dos mesmos foi feita de forma conjunta.

Uma análise de variância foi feita para os resultados experimentais apresentados na Tabela 11 visando identificar as variáveis que apresentavam significância estatística (Statistica 8.0 *software* (StatSoft Inc., 2007). Análise de regressão foi aplicada aos resultados experimentais da retenção da atividade enzimática. Primeiramente, um modelo contendo todos os efeitos lineares e quadráticos, assim como os fatores de interação entre as variáveis foi testado. A Tabela 16 mostra os resultados dos coeficientes do modelo, seu desvio padrão e o p-valor usados como instrumentos para checar a significância de cada coeficiente.

O modelo ajustado apresentou um coeficiente de correlação, R^2 , superior a 0,98, e mostrou uma relação F de 93,87, 40 vezes superior ao valor listado para nível alfa de 0,05, suficiente para justificar a adequação do modelo. No entanto, o modelo incluiu diversos parâmetros, não apresentando significância estatística e valor F para a falta de ajuste mostrou-se significativo. Então, decidiu-se apenas

incluir no modelo de regressão, os termos que apresentam significância estatística ao nível alfa menor ou igual a 0,10, e repetir o procedimento de ajuste.

Tabela 16. Parâmetros de regressão, desvio padrão e p-valor para R_{AE} .

Ternos	Estimativa	Erro padrão	p-valor
Intercepto	65,257	1,970	0,000 ⁺
$T_{ge,L}$	0,521	0,756	0,499
ADJ_L	25,767	0,756	0,000 ⁺
$W_{s,L}$	1,247	0,756	0,117
EXC_L	0,595	0,699	0,405
$T_{ge,Q}$	2,339	0,918	0,020 ⁺⁺
ADJ_Q	-3,432	0,918	0,002 ⁺
$W_{s,Q}$	1,793	0,918	0,067 ⁺⁺
$T_{ge,L} \times ADJ_L$	0,553	0,988	0,583
$ADJ_L \times W_{s,L}$	1,561	0,988	0,132
$T_{ge,L} \times W_{s,L}$	-1,093	0,988	0,283
$W_{s,L} \times EXC_L$	-0,510	0,756	0,509
$ADJ_L \times EXC_L$	-1,729	0,756	0,035 [*]
$T_{ge,L} \times EXC_L$	-1,512	0,756	0,061 ⁺⁺

+ termo é significativo a 0,01; *termo é significativo a 0,05; ++ termo é significativo a 0,10; L = efeito linear; Q = quadrático.

A seguinte equação foi ajustada aos dados experimentais:

$$R_{AE} = 65.257 + 25.767 \cdot ADJ_C - 3.432 \cdot ADJ_C^2 + 2.339 \cdot T_{ge,C}^2 + 1.793 \cdot W_{s,C}^2 - 1.729 \cdot ADJ_C \cdot EXC + 1.511 \cdot T_{ge,C} \cdot EXC \quad (6)$$

Equação (6) é válida no seguinte intervalo (variáveis decodificadas):

$$1,95\% \leq ADJ \leq 12,05\%$$

$$86,4^\circ\text{C} \leq T_{ge} \leq 153,6^\circ\text{C}$$

$$2,63 \text{ g/min} \leq W_s \leq 9,36 \text{ g/min}$$

$EXC = -1$ para Maltodextrina, e $+1$ para β -Ciclodextrina (variável categórica)

A Tabela 17 apresenta a análise de variância realizada para o modelo ajustado aos dados experimentais de retenção da atividade enzimática. Esta Tabela mostra que o modelo ajustado apresenta uma razão F de 191,233, 78,0 vezes maior que o valor tabelado para um nível de significância de 0,05 ($F_{6,25} = 2,49$). A relação F entre a falta de ajuste (1,925) foi menor que o valor tabelado ($F_{9,16} = 2,54$), portanto não significativa. Além disso, o modelo é capaz de prever a variação de 97,9 de

dados contra um máximo de 99,0 e apresentou distribuição dos resíduos normal e independente. Estes resultados são fortes indicativos da robustez do modelo para previsão dos resultados experimentais da R_{AE} . Analisando a Equação 6, pode-se observar que o coeficiente do parâmetro quadrático de W_{sc} , é positivo, o que implica que valores máximos de recuperação da atividade enzimática são obtidas nos pontos localizados nas extremidades, respectivamente (-1,682) e (+1,682), para este parâmetro (variáveis codificadas).

Tabela 17. Análise de variância realizada para a Equação 6, ajustada para os dados experimentais da recuperação da atividade enzimática R_{AE} .

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Modelo	18930,683	6	3155,114	191,233	<0,01
Resíduo	412,469	25	16,499		
Falta de ajuste	214,436	9	23,826	1,925	0,12
Erro puro	198,033	16	12,377		
Total	19343,152	31			
% de variância explicada	97,9				
% máxima de variância explicada	99,0				

A Figura 24 apresenta retenção da atividade enzimática como uma função da proporção do adjuvante de secagem adicionado ao extrato bruto (ADJ), e da temperatura de entrada do gás de secagem (T_{ge}), para a maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina. O parâmetro W_{sc} foi fixado em 1,682. Em geral, o uso de maltodextrina apresenta pequeno aumento na retenção da atividade se comparado ao uso de β -ciclodextrina. Porém, esse excipiente é significativamente mais barato do que a β -ciclodextrina, justificando a sua utilização para a manutenção da atividade da enzima. Para ambos os excipientes testados, a análise da Equação 6 e Figura 25 apresenta as seguintes condições otimizadas: ADJ de 12,05%; T_{ge} 153,6°C, e W_s de 9,36 g/min.

Figura 25. Retenção da atividade enzimática em função da proporção de adjuvantes utilizados (ADJ) e da temperatura do gás de entrada (T_{ge}), para os adjuvantes maltodextrina (MD) e β -ciclodextrina (β -CD).

Em relatos de estabilização de proteínas, Carpenter and Crowe (1984) sugeriram que certos carboidratos podem protegê-las devido à formação de ligações de hidrogênio com o produto seco (enzima) servindo, portanto, como um substituinte da água quando a hidratação da proteína é removida. Outros autores têm proposto que o mecanismo da proteção protéica por vários adjuvantes esta relacionada com a formação vítrea no estado sólido. Em outras palavras é a imobilização da proteína e adjuvante em um sólido, resultando na proteção contra a degradação química e conformacional da proteína devido ao fato de que as taxas de difusão, e portanto de reações, estão baixas. Outro efeito adicional da adição de um adjuvante é o efeito de “diluição”, o qual reduz a possibilidade das moléculas protéicas interagirem umas com as outras formando agregados, os quais podem ocorrer também no estado sólido. No caso das lipases, em que muitas vezes a presença desses agregados é relatada devido à natureza hidrofóbica dessas enzimas, a utilização de agentes que impeça essa formação se torna ainda mais interessante. Entretanto, não é fácil distinguir qual dos três efeitos é mais importante ou quais são significativos.

Recuperação da enzima seca, R_{EC}

A eficiência da produção do pó pelo “spray dryer” foi avaliada através da determinação da recuperação da enzima seca, R_{EC} . Os dados experimentais da recuperação do produto e conteúdo de umidade foram analisados individualmente para cada adjuvante utilizado, pois a análise conjunta não apresentou resultados satisfatórios. Para o produto contendo maltodextrina DE10 como adjuvante de secagem, os resultados da análise de variância mostraram que os efeitos quadráticos das variáveis T_{ge} , e ADJ foram significativos. Portanto, considerando estas variáveis, os valores máximos de recuperação do pó são obtidas no ponto central. Para a β -ciclodextrina, os resultados estatísticos da análise de variância indicaram que foram significativos os efeitos lineares dos parâmetros T_{ge} e também das interações entre os efeitos lineares de $T_{ge} \times ADJ$, e $T_{ge} \times W_s$ ($p \leq 0,05$). Efeitos positivos desses parâmetros foram evidenciados, levando à conclusão de que a maior recuperação é obtida em valores superiores da matriz experimental. A Figura 26 mostra a superfície de resposta da recuperação de produtos em função da concentração de adjuvante (ADJ) e temperatura de entrada do gás de secagem (T_{ge}), para os dois carboidratos usados, sendo a variável W_s fixada em 9,36 g/min. Na condição otimizada para a recuperação da atividade enzimática, R_{AE} , espera-se que a taxa de produção da enzima seca fique em 36% e aproximadamente 100%, respectivamente para maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina, confirmando uma melhor produção do pó através do uso da β -ciclodextrina.

A baixa recuperação observada para maltodextrina DE10 pode ser relacionada às propriedades físico-químicas do produto e também ao fato de que o sistema coletor do pó (ciclone) utilizado no “spray dryer” é de escala laboratorial. Este problema poderia ser resolvido durante o processo de “scaling-up”, pela escolha de um sistema coletor mais eficiente assim como o uso de filtros e precipitação eletrostática.

Figura 26. R_{EC} em função da porcentagem de adjuvantes usados (ADJ) e da temperatura de entrada do gás de secagem (T_{ge}), para os dois tipos de adjuvantes, sendo a variável W_s fixada em 9,36 g/min.

Temperatura de saída do gás de secagem, T_{gs} :

A temperatura do gás de saída, T_{gs} , é um importante parâmetro de secagem, afetando tanto a eficiência energética do secador e o conteúdo de umidade do produto. A análise de regressão foi realizada para os resultados experimentais de T_{gs} . Um modelo contendo os efeitos lineares, quadráticos e a interação dos fatores foi primeiramente avaliado. O modelo resultante apresentou um R^2 superior a 0,96, e foi estatisticamente significativo. No entanto, o modelo contém vários termos não significativos. Assim, um novo modelo, incluindo apenas os termos que apresentaram significância ($\alpha \leq 0,10$) foi proposto e a análise de regressão foi repetida, resultando na Equação (7):

$$T_{gs} = 75,77 + 10,96 \cdot T_{ge,C} - 4,22 \cdot W_{s,C} - 1,36 \cdot T_{ge,C} \cdot EXC \quad (7)$$

Equação 3 apresentou um R^2 superior a 0,95, e apresentou um F de 191,786, 64 vezes superior ao valor tabelado de $F_{3,28} = 2,95$. O modelo também apresentou uma distribuição residual aleatória, e pode ser útil para descrever os resultados experimentais da temperatura de saída do gás de secagem. Os efeitos descritos pela Equação 7 são fisicamente esperados, pois o aumento da temperatura de

entrada corresponde a um aumento do calor introduzido no sistema. A diminuição do fluxo de alimentação da composição enzimática reduz a quantidade de líquido a ser evaporado pelo gás de secagem (Figura 27). Em geral, T_{gs} tende a ser ligeiramente superior ao produto preparado com maltodextrina.

Figura 27. T_{gs} em função da vazão de alimentação (W_s) e da temperatura do gás de entrada (T_{ge}), para ambos adjuvantes, sendo o parâmetro ADJ fixado em 1,682.

A secagem pode ser simplesmente definida como a perda de solvente, que normalmente é a água, e esse processo resulta em uma substancial redução da atividade da enzima, indicando exposição das macromoléculas a estresses diversos, como mostrado na Figura 28 (LEE, 2002). Após a atomização, a proteína entra em contato com o ar de secagem aquecido. As proteínas podem desnaturar com mudanças estruturais sob estresse térmico e perder as suas atividades. Este estresse térmico gera uma mudança estrutural irreversível, que está envolvida na desnaturação térmica das proteínas (LEE, 2002; YOSHII *et al.*, 2008). Os mecanismos de degradação de proteínas no estado sólido podem ser divididos em duas categorias: químicos e físicos. Degradação química envolve a modificação covalente da estrutura primária através de ruptura ou formação de uma ligação. Degradação física refere-se a mudanças na estrutura de ordem superior (secundária e superior) por meio de desnaturação e precipitação ou agregação não-covalente (MILLQVIST-FUREBY *et al.*, 1999).

No entanto, considerando o processo de secagem mais detalhadamente, a inativação térmica da proteína parece menos danosa. As partículas de pó seco ficarão em contato com uma temperatura bem abaixo da temperatura de entrada do

ar de secagem durante o processo. Enquanto as gotículas de água evaporam, um efeito de resfriamento será alcançado, o que impede que a temperatura de secagem do material seja muito elevada (NAMALDI *et al.*, 2006). Este estágio de secagem é chamado de período de secagem constante, no qual a evaporação da umidade ocorre mais ou menos a uma taxa constante. Somente nos últimos estágios de secagem, quando o teor de água do material de secagem torna-se baixo, a temperatura das partículas poderá elevar-se, mas ainda permanece abaixo da temperatura do ar que sai do secador (normalmente 15-20°C mais baixa). Além disso, o tempo de secagem é da ordem de milissegundos, e geralmente o tempo de permanência total no secador é da ordem de segundos (ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2007; MASTERS, 1991). A partir desses argumentos juntamente com os resultados de retenção da atividade enzimática aqui apresentados, pode-se inferir que o processo de secagem em “spray dryer” de materiais termossensíveis, como é o caso de enzimas, é plenamente viável.

Figura 28. Possíveis fatores de estresse para uma proteína durante a secagem em spray drying (Fonte: LEE, 2002).

Teor de umidade do produto, X_p :

A análise estatística realizada para todos os resultados do teor de umidade do produto mostrou efeitos significativos da temperatura de entrada do gás de secagem, T_{ge} , e vazão de alimentação do extrato para o “spray dryer”, W_s . Como esperado, o produto aumenta a umidade com o incremento na W_s e/ou redução na T_{ge} .

A Figura 29 mostra as superfícies de resposta do teor de umidade do produto em função da temperatura de entrada do gás de secagem (T_{ge}) e a vazão de alimentação do extrato enzimático injetado no secador (W_s), para ambos os adjuvantes utilizados, sendo a variável ADJ fixada em 12,05%. Como pode ser observado nas superfícies de resposta, para as condições otimizadas para a recuperação da atividade enzimática, R_{AE} (ADJ: 12,05%; T_{ge} : 153.6°C; W_s : 9,36 g/min) os produtos secos apresentaram teor de umidade menor que 2,5%. Em geral, os baixos valores de umidade (e também de atividade de água) são excelentes para a estabilidade dos produtos.

A utilização da água como um indicador de qualidade é de interesse particular, uma vez que esta é um fator determinante tanto a integridade da matriz sólida e nas interações proteína-adjuvante (LINDERS *et al.*, 1996). É bem documentado que produtos farmacêuticos na forma sólida tendem a absorver quantidades significativas de água na presença de uma alta porcentagem de umidade relativa. A presença de água pode acelerar os fenômenos de degradação no estado sólido, como desaminação, oxidação entre outras (TZANNIS *et al.*, 1999). Para proteínas, em especial, a água pode influir em uma matriz complexa de movimentos, que vão desde o movimento oscilatório e rotacional de cada um dos grupos de aminoácidos a movimentos segmentares e flutuações internas que aumentam sua mobilidade e dinâmica, diminuindo assim a sua estabilidade conformacional (TZANNIS *et al.*, 1999). Além disso, a água adsorvida pode ter um tremendo impacto sobre as propriedades físicas do material processado. Neste caso, absorção de água perturba a matriz sólida, reduz a sua temperatura de transição vítrea, pode induzir a cristalização do adjuvante e alterar a sua morfologia e propriedades físico-químicas, fenômenos esses que podem diminuir a estabilidade do produto (LINDERS *et al.*, 1996).

Figura 29. Superfície de resposta do conteúdo de umidade em função da temperatura de gás de entrada (T_{ge}) e a vazão de alimentação da solução enzimática no “spray dryer” (W_s), para ambos os adjuvantes utilizados, sendo a variável ADJ fixada em 12,05%.

4.4.3 MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS

A análise morfológica das partículas foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura em um microscópio eletrônico modelo EVO-50, Zeiss, Cambridge - UK. Essas análises foram realizadas para o pó obtido nos ensaios do planejamento composto central que apresentaram os maiores valores de atividade residual: lactose - ensaio: 3; maltodextrina DE10 - ensaio: 8; β -ciclodextrina - ensaio: 4.

Embora os valores de retenção da atividade enzimática tenham sido similares, através da Figura 30 pode-se constatar que os pós obtidos apresentaram morfologias totalmente distintas. A superfície da partícula quando se utilizou maltodextrina DE10 apresentou-se na forma de sulcos, dando um aspecto murcho às esferas. No caso da β -ciclodextrina as partículas não apresentaram formato definido, sendo que houve uma maior predominância de partículas irregulares e em forma de lascas. Já no caso da lactose as partículas apresentaram uma superfície bem definida na forma de esferas. De acordo com Landström, *et al.*, (2000), essas diferenças nas estruturas externas das partículas podem ser atribuídas à natureza dos adjuvantes utilizados. Por exemplo, a adição de proteínas pode aumentar a porosidade e também modificar a flexibilidade da superfície, da resistência mecânica e da evaporação da água ligada às proteínas. Outro fator com potencial para influencia na superfície das partículas é o comportamento hidrodinâmico das gotículas líquidas, uma vez que sob atomização estas gotículas estão sujeitas às turbulências e movimentações internas (MAA e HSU, 1997).

Figura 30. Fotomicrografias do extrato bruto do fungo endofítico *C. kikuchii*: (A) lactose (ensaio 3); (B) β -ciclodextrina (ensaio 4) e (C) maltodextrina (ensaio 8).

4.4.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA APÓS SECAGEM DO EXTRATO BRUTO EM “SPRAY DRYER”

Os resultados do estudo da estabilidade enzimática após a secagem do extrato bruto encontram-se na Figura 31. Os melhores resultados foram obtidos quando o pó contendo as lipases, foi estocado durante 8 meses a 5°C, na seguinte sequência de atividade residual: β -ciclodextrina (70,0 %), goma arábica (67,1 %), trealose (65,8 %), lactose (60,0 %), maltodextrina DE10 (53,2 %), maltodextrina DE20 (46,6 %) e manitol (41,6 %). A utilização de carboidratos como carreadores favorece um aumento na estabilidade de enzimas, especialmente após utilização do processo de “spray dryer”.

Adjuvantes como lactose, β -ciclodextrina e trealose mostraram uma grande viabilidade na estabilização de enzimas em vários estudos, principalmente devido a uma forma amorfa facilmente atingível que supostamente aumenta a preservação da atividade em várias enzimas após secagem (ALLOE *et al.*, 2007; MILLQVIST-FUREBY *et al.*, 1999; DE PAZ *et al.*, 2002). Belghith *et al.*, (2001) relataram a estabilização de celulasas utilizando maltodextrina como adjuvante. Segundo estes autores a atividade desta enzima permaneceu praticamente constante durante um período de 8 meses, estocada a uma temperatura de 4°C. Outro estudo que relatou o efeito protetor dos adjuvantes contra a perda de atividade enzimática de uma protease alcalina foi relatado por Namaldi *et al.* (2006). Neste estudo o uso de maltodextrina reteve 82% da atividade enzimática quando a protease foi estocada por 6 meses a uma temperatura de 70°C. O efeito protetor ficou ainda mais evidente quando a enzima foi seca na ausência de adjuvante e reteve 50% da atividade quando estocada durante o mesmo período a uma temperatura de 50°C.

Figura 31. Estabilidade de lipases presentes no extrato bruto na presença dos seguintes adjuvantes: goma arábica, trealose, β -ciclodextrina, lactose, manitol, maltodextrina DE10 e maltodextrina DE20 – durante estocagem em diferentes temperaturas: 5, 25 e 40 °C.

4.4.5 SECAGEM DA LIPASE PURIFICADA E SEMI-PURIFICADA EM “SPRAY DRYER”

Após o processo de purificação as lipases purificada (Pool II - 2ª Coluna de Gel Filtração) e semi-purificada (Pool IV – Coluna de Interação Hidrofóbica) foram submetidas ao processo de secagem em “spray dryer”. Para a enzima pura os adjuvantes utilizados foram maltodextrina DE10, lactose e β -ciclodextrina. Já para o Pool IV somente a maltodextrina DE10 foi utilizada como adjuvante. As condições de secagem foram aquelas obtidas durante o processo de otimização, as quais apresentaram os maiores valores de retenção da atividade lipolítica do extrato bruto. Os resultados da secagem da enzima pura esta representado na Tabela 18. Embora a porcentagem de recuperação do produto seco tenha sido menor do que no extrato bruto, a atividade residual da lipase pura na presença dos três adjuvantes foi extremamente alta (90,6 a 96,7%). No caso do Pool IV a retenção da atividade enzimática utilizando maltodextrina DE10 foi total. Estes resultados corroboram mais uma vez para viabilidade de secar a lipase produzida pelo fungo endofítico *C. Kikuchii* através de “spray dryer” na presença de adjuvantes.

Tabela 18. Resultado da secagem da lipase pura e semi-purificada produzida pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* através de “spray dryer”.

ADJ + 0,1% Tween 80	Porcentagem %	W _s g/min	T _{ge} °C	Atividade residual %	R _{ec} %	X _p %	A _w	T _{gs} °C
Lipase Purificada (Pool II - 2ª Coluna de Gel Filtração)								
Lactose	12,05	4,0	100,0	96,7	33,0	7,0	0,3	50,5
Maltodextrina	12,05	9,36	153,6	93,2	35,5	3,2	0,3	61,5
β -Ciclodextrina	12,05	9,36	153,6	90,6	42,5	10,4	0,3	67,3
Lipase Semi-Purificada (Pool IV – Coluna de Interação Hidrofóbica)								
Maltodextrina	12,05	9,36	153,6	100,00	50,2	3,1	0,3	78,3

ADJ - Adjuvante; T_{ge} - Temperatura de entrada; T_{gs} - Temperatura de saída; R_{ec} - Recuperação; A_w - Atividade de água; X_p - Umidade.

A atividade de água (A_w) é uma relação existente entre a pressão de vapor de um produto dado em relação com a pressão do vapor de água pura à mesma temperatura e varia de 0 a 1. Dependendo do valor da A_w, o produto pode permitir que microorganismos se desenvolvam (ver Tabela 19), o que acarreta na contaminação do produto e ate mesmo na produção de toxinas. Assim, a A_w adequada é um parâmetro importante para garantir um maior tempo de prateleira do produto. Um dos motivos que justifica a secagem do extrato enzimático é a diminuição da A_w, e assim diminuir a contaminação microbiológica do mesmo. Pode-

se ver na Tabela 18, que os valores da A_w foram baixos (media de 0,3) para os três tipos de adjuvantes, o que está de acordo com o esperado. A A_w também pode interferir no perfil granulométrico de certos produtos, dependendo das características físico-químicas dos mesmos. A umidade relativa de um produto também é uma característica importante principalmente quando se leva em consideração o período de estoque do mesmo. Normalmente, produtos que contem substâncias protéicas, tornam-se mais estáveis quando possuem baixo teor de umidade apresentando, portanto, uma vida útil maior.

Tabela 19. Valores mínimos de atividade de água (A_w) para o crescimento e produção de toxinas por diferentes patógenos.

Microrganismo	A_w para crescimento	A_w para produção de toxinas
<i>Clostridium botulinum</i> (tipo E)	0,95-0,97	0,97
<i>Clostridium botulinum</i> (tipo A)	0,93-0,95	0,94-0,95
<i>Clostridium perfringens</i>	0,93-0,95	
<i>Salmonella</i> SP.	0,93-0,95	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86	0,87-0,90 (enterotoxina A)
<i>P. veridicatum</i>	0,83	0,83-0,86 (ocartoxina A)
<i>A. parasiticus</i>	0,82	0,87
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,81-0,85	0,87-0,90 (ocratoxina)
<i>A. flavus</i>	0,78-0,80	0,83-0,87 (aflatoxina)
<i>A. ochraceus</i>	0,77-0,83	0,83-0,87 (ocratoxina A)
Bactérias halófilicas	0,75	
Bolores xerofílicos	0,65	
Fungos osmofílicos	0,60	

Fonte: adaptado de BEAUCHAT, (1981).

4.4.5.1 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA LIPASE PURA ESECA

A distribuição granulométrica da enzima purificada e seca em “spray dryer” foi obtida segundo o procedimento apresentado no item 3.7.2.3. A partir das imagens obtidas para amostras do produto e utilizando um “software” analisador de imagens (Image Pro-Plus®) foi possível determinar a distribuição granulométrica e seu diâmetro médio.

A Figura 32 apresenta os resultados de distribuição granulométrica para a lipase pura seca com lactose, maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina. Através da análise da Figura 32 pode-se observar que a lipase pura e seca apresentou uma ampla distribuição granulométrica na presença dos três tipos diferentes de carboidratos.

Figura 32. Resultados obtidos da distribuição granulométrica acumulativa para a lipase pura de *C. kikuchii* seca em “spray dryer”: A – β -ciclodextrina; B – lactose; C – maltodextrina DE10.

5. CONCLUSÕES

A partir das condições experimentais utilizadas nesse trabalho, pode-se concluir:

- Com a utilização de colunas de Interação Hidrofóbica seguida de coluna de filtração em gel, foi possível purificar uma das lipases do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*, com índice de purificação de 5,54 e recuperação de 9 % da atividade.
- A análise eletroforética por SDS-PAGE da fração purificada resultou em uma banda de proteína com peso molecular de 65,1 kDa, enquanto que o peso molecular da enzima estimada por gel filtração revelou uma massa molecular de 73,5 kDa.
- A enzima pura apresentou temperatura ótima de 35°C, pH ótimo de 5,4 e foi estável a 40°C, uma vez que 80,2% de sua atividade foi mantida após 2 horas de incubação.
- O valor de K_m e V_{max} para a enzima pura utilizando pNPP como substrato foi estimado em 0,03240 mM e 10,28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente.
- As atividades enzimáticas máximas do extrato bruto e das lipases ligadas ao micélio foram obtidas respectivamente nas temperaturas de 60 e 50°C.
- As lipases no extrato bruto mantiveram-se estáveis a 50°C, com 85,3% de atividade residual após 2 horas de incubação e as ligadas ao micélio mantiveram pelo menos 75,1% de atividade residual a 80°C, no mesmo tempo de incubação.
- Com relação ao efeito do pH, as atividades enzimáticas máximas do extrato bruto e das lipases ligadas ao micélio foram obtidas respectivamente nos pH 4,6 e 6,2.

- A maioria dos adjuvantes utilizados na presença de 0,1% de Tween mostram-se eficientes para a secagem do extrato bruto devido à elevada recuperação da atividade enzimática que variou de 63,3 a 100%.
- O aumento da concentração de lactose no extrato bruto e a diminuição da temperatura de entrada do gás de secagem têm um efeito positivo na retenção da atividade lipolítica.
- Utilizando-se a maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina como adjuvantes no processo de otimização da secagem da lipase por “spray dryer”, obteve-se a seguinte condição ótima de secagem: concentração de adjuvante de 12,05%, temperatura de entrada do gás de secagem de 153,6°C e vazão do extrato alimentado no secador de 9,36 g/min.
- Nas condições ótimas de secagem da lipase pura, usando lactose, maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina como adjuvantes obtiveram-se respectivamente os seguintes valores de atividade residual: 96,7, 93,2 e 90,6%.
- Na secagem da enzima semi-purificada, utilizando maltodextrina DE10 com adjuvante, obteve-se 100% de retenção da atividade enzimática.
- Vários adjuvantes mostram-se eficientes na preservação da atividade lipolítica após oito meses de estocagem, com destaque para a β -ciclodextrina que resultou em uma atividade residual de 70%, dependente das condições de secagem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ALLOE, W.A.M.; DESTAIN, J.; AMIGHI, K.; THONART, P. Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying during in the presence of additives. **Process Biochemistry**, v.42, p.1357-1361, 2007.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo, 1997.

ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50862)**. Rio de Janeiro, 2007.98p. Dissertação de mestrado - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; BARATTI, J. Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformes*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.63, p.63-70, 1999.

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.

ANTCZAK, T.; GRACZYK, J.; SZCESNA-ANTCZAK, M.; BIELECKI, S. Activation of *Mucor circinelloides* lipase in organic medium. **Journal of Molecular Catalysis B**, v.19, p.287-294, 2002.

ARNOLD, A.E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.S.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v.3, p.267-274, 2000.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, J.W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal Biotechnology**, v.3, p.112-141, 2000.

BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology Program**, v.15, p.392-416, 1996.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BARON, A.M.; SARQUIS, M.I.M.; BAIGORÍ, M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, p.35-32, 2005.

BASRI, M.; HENG, A.C.; RAZAL, C.A.N.; YUNUS, W.M.Z.; AHMAD, M.; RAHMAN, R.N.A.; AMPON, K.; SALLEH, A.B. Alcoholysis of palm oil mid-fraction by lipase from *Rhizopus rhizopodiformis*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, p.113–116, 1997.

BEAUCHAT, L.R. Microbial stability as affected by water activity. **Cereal food world**, v.26, p.345-349, 1981.

BELGHITH, H.; CHAABOUNI, S.E.; GARGOURI, A. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.253–258, 2001.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Biology and Technology**, v.43, p. 453-460, 2000.

BERNSTEIN, M.E.; CARROLL, G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p.644-653, 1977.

BERTON, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. **Biotechnology Letters**, v.19, p.533–536, 1997.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia; produção aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, ed. Interciência, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.156-171, 1976.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P., CHRISTIANSEN, L., HUGE-JENSEN, B.;

NORSKOV, L.E.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of triacylglycerol lipase. **Nature**, v.343, p.767-770, 1990.

BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, G.G.; LAWSON, D.M.; TURKENBURG, J.P.; BJORKLING, F.; HUGE-JENSEN, B.; PATKAR, S.A.; THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, n.351, p.491–494, 1991.

BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, p.74–84, 2004.

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; PINHEIRO, H.; PRAZERES, D.M.F. Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells. **Journal of Biotechnology**. v. 59, p.133-143, 1998.

CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v.94, p.210-220, 2002.

CARPENTER, J.; CROWE, J.H. An infrared spectroscopy study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry**, v.28, p.3916–3922, 1984.

CARROLL, G.C.; CARROL, F.E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v.56, p.3034-3043, 1978.

CARVALHO, O.C.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v.28, p.614-621, 2005.

CARVALHO, N.B.; SOUZA, R.L.; CASTRO, H.F.; ZANIN, G.M.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by Bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.150, p.25-32, 2008.

CASA, R.M.; SINISTERRA, J.V.; SANCHEZ-MONTERO, J.M. Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.599-609, 2006.

CASTRO-OCHOA, L.D.; RODRIGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme Microbial Technology**, v.37, p.648-654, 2005.

CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.64, p.215-222, 2000.

CHATTOPADHYAY, M.; BANIK, A.K.; RAYCHAUDHURI, S. Production and purification of lipase by a mutant strain of *Rhizopus arrhizus*. **Folia Microbiologica**, v.44, p.37-40, 1999.

COMMENIL, P.; BELINGHERI, L.; SANCHOLLE, M.; DEHORTER, B. Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. **Lipids**, v.30, p.356-357, 1995.

DALSENTER, F.D.H.; VICCINI, G.; BARGA, M.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v.40, p.801-807, 2005.

DE PAZ, A.R. 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.3, p.765-774, 2002.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiology Letter**, v.179, p.241-246, 1999.

DIAZ, J.C.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1042-1050, 2006.

DÜNHaupt, A.; LANG, S.; WAGNER, F. *Pseudomonas cepacia* lipase: studies on aggregation, purification and on the cleavage of olive oil. **Biotechnology Letter**, v.14, p.953-958, 1992.

ETZEL, M.R. Enzyme inactivation in a droplet forming a bubble during drying. **Journal of Food Engineering**, v.27, p.17-34, 1996.

FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods in Enzimology**, v.284, p.327-347, 1997.

FERRER, M.; PLON, F.J.; NUERO, O.M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.75, p. 569–576, 2000.

FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BOM, E.P.S.; SANT'ANNA JR, G.L. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Applied Biochemistry Biotechnological**, v.63, p.409-421, 1997.

GANDHI, N.N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, p.621–629, 1997.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAËBOUNI, M.; GARGOURI. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 35, p.335-363, 2004.

GHOSH, P.K.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, S. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**, v.79, p.119-157, 1996.

GIESLER, L. J. **Purple Seed Stain and *Cercospora Blight***. Disponível em: <http://pdc.unl.edu/agriculturecrops/soybean/purpleseedstain>. Acessado em 19/08/2010.

GILBERT, E.J.; CORNISH, A.; JONES, C.W. Purification and properties of extracellular lipases from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.223–2229, 1991.

GINALSKA, G.; BANCERZ, R.; KOWALSKA, K. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.177-182, 2004.

GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMI, T.; ANNADURAI, G. Purification of lipase from *Cunninghamella verticillata* and optimization of enzyme activity using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.449–458, 2002.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 35, p.459-464, 1999.

GUPTA, R.; GUPTA, N; RATHI P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p.763–781, 2004.

HAMES, D.B. An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. In: **Gel electroforesis of proteins**. Hames, D.B. & Rickwood, D., Oxford: IRL Press, 1987. p.290.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, p.145-178, 2006.

HAYES, D.G. Enzyme-catalysed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.81, p.1077–1103, 2006.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamentos de sementes: noções gerais**. 2 ed. Londrina. Embrapa soja, 2005.

HIOL, A.; JONZO, M.D.; DRUET, D.; COMEAU, L. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p.80–87, 1999.

HIOL, A.; JONZO, M.D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme Microbiology Technology**, v.26, p. 421– 430, 2000.

HUGE-JENSEN, B.; GALLUZZO, D.R.; JENSEN, R.G. Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. **Lipids**, v.22, p.559–565, 1987.

HUTT, A.J.; CALDWELL, J. The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arypropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v.9, p.371-373, 1984.

IMAMURA, S.; KITAURA, S. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **Journal Biochemistry**, v.127, p.419-425, 2000.

JAEGER, K.E.; RANSACK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p.29-63, 1994.

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

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends and Biotechnology**, v.16, p.396-403, 1998.

JINWAL, U.K.; ROY, U.; CHOWDHURY, A.R.; BHADURI, A.P.; ROY, P.K. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p.1041-1046, 2003.

KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v.33, p.505-511, 1998.

KEMPKA, A.P.; LIPKE, N.L.; PINHEIRO, T.L.F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D.M.G.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.31, p.119-125, 2008.

KORNBERG, A. Why purify enzymes? **Methods Enzimology**, v.182, p.1-5, 1990.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA, J.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of a *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. **Bioprocess Engineering**, v.20, p.59-65, 1999.

KUNDU, M.; BASU, J.; GUCHHAIT, M.; CHAKRABARTI, P. Isolation and characterization of an extracellular lipase from the conidia of *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v.133, p.149–153, 1987

LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LANDSTRÖM, K.; ALSINS, J.; BERGENSTAHL, B. Competitive protein adsorption between bovine serum albumin and β -lactoglobulin during spray-drying. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.75–82, 2000.

LARA, P.V.; PARK, E.Y. Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.270-277, 2004.

LEE, D.W.; KIM, H.W.; LEE, K.W.; KIM, B.C.; CHOE, E.A.; LEE, H.S.; KIM, D.S.; PYUN, Y.R. Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **Enzymology Microbial Technology**, v.29, p.363-371, 2001.

LEE, G. **Spray drying of proteins**. In Rational Design of Stable Protein Formulations; Carpenter, J.F., Manning, M.C., Eds.; Plenum Press: New York, 135-158, 2002.

LESUISSE, E.; SCHANK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.216, p.155-160, 1993.

LIAO, Y.H.; BROWN, M.B.; ABDUL, Q.; MARTIN, G.P. Investigation of the physical properties of spray-dried stabilised lysozyme particles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.55, p.1213-1223, 2003.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. **Industrial Biotransformations**. 2 ed. Wiley-VCH, Weinheim, 2006.

LIEW, M.Y.B.; GHAZALI, H.M.; LONG, K.; LAI, O.M.; YAZID, A.M. Physical properties of palm kernel olein-anhydrous milk fat mixtures transesterified using mycelium-bound lipase from *Rhizomucor miehei*. **Food Chemistry**, v.72, p.447-454, 2001.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, p.65-71, 2004a.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C.; FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Kinetic characterization and stability in aqueous media and in organic solvents of a crude lipase preparation obtained from *Penicillium aurantiogriseum*. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, p.65-71, 2004b.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C.; FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2004c.

LIN, E.S.; KO, H.C. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.261-265, 2005.

LINDERS, L.J.M.; MEERDINK, G.; VAN'TRIET, K. Influence of temperature and drying rate on the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. **Trans IchemE**, v.74, p.110-114, 1996.

LITTHAUER, D.; GINSTER, A.; SKEIN, E.E. *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320 residue Pseudomonas lipase family. **Enzyme Microbiology Technology**, v.30, p.209-215, 2002.

LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. 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.

LONG, K.; GHAZALI, H.M.; ARIFF, A.; BUCKE, C. Acidolysis of several vegetable oils by mycelium-bound lipase of *Aspergillus flavus* Link. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, p.1121-1128, 1997.

LONG, K.; GHAZALI, H.M.; ARIFF, A.; BUCKE, C. Physicochemical properties and specificity of mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus flavus* Link. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v.28, p.135-142, 2000.

LOTRAKUL, P.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **Journal Biotechnology**, v. 54, p.113 -120, 1997.

LUSTOSA, C.F.P. **Aplicação do extrato e dos resíduos das folhas de *Tithonia diversifolia* como adubo orgânico e agente anti-edematogênico em edema de planta induzido por carragenina e veneno de *Bothrops jararaca***. São Jose dos Campos, 2005, 72p. Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Paraíba.

MAA, Y.F.; HSU, C.C. Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface. **Biotechnology and Bioengineering**, v.54, p.503-512, 1997.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.17, p.115-119, 1997.

MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.C. Present and future application of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.3, p.193-217, 1983.

MACRAE, A.R. Lipase catalysed interesterification of oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, p.291–294, 1983.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.38, p.715-721, 2002.

MARTINS, T.S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50862)**. Rio de Janeiro, 2007.101p. Dissertação de mestrado - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MASTERS, K. **Spray-Drying Handbook**. Longman, Harlow, England, 1991.

MAQBOOL, Q.A.; JOHRI, A.; VERMA, L.; RIYAZ-UL-HASSAN, S.; VERMA, V.; KOUL, S.; TANEJA, S.C.; PARSHAD, R.; QAZI, G.N. Purification and characterization of a novel enantioselective hydrolase from *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.36, p.227-234, 2002.

MATSUMOTO, T., AND TOMOYASU, R. Studies on the purple speck of soybean seed. **Annual Phytopathology Society of Japan**, v.1, p.1-14, 1925.

MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PIETRO, J.A. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.105-109, 2000.

MEHER, L.C.; DHARMAGADDA, V.S.S.; NAIK, S.N. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Ongomia pinnata* oil for production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v.97, p.1392-1397, 2006.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; JÚNIOR, A.F. Aplicações de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, p.296-305, 2005.

MENONCIN, S.; DOMÍNGUES, N.M.; FREIRE, D.M.G.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran. **Food and Bioprocess Technology**, v.12, p.123-128, 2008.

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

MOZAFFAR, Z.; WEETE, J.D. Purification and properties of an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. **Lipids**, v.28, p.377–382, 1993.

MUSTRANTA, A.; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to tranesterification and esterification reactions in nonaqueous system. **Enzyme Microbiol Technology**, v.15, p.133–139, 1993.

NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Expression of Lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: High-Level Production and Purification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 81, p.488-492, 1996.

NAMALDI, A.; ÇALIK, P.; ULUDAG Y. Effects of spray drying temperature and adjuvants on the stability of serine alkaline protease powders. **Drying Technology**, v.24, p.1495–1500, 2006.

NAMBOODIRI, V.M.H.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. **Lipids**, v.35, p.495-502, 2000.

NISHIO, T.; CHIKANO, T.; KAMIMURA, M. Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.51, p.181-186, 1986.

OMAR, I.C.; HAYASHI, M.; NAGAI, S. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa*. **Agricultural Biology and Chemistry** v.51, p.37-45, 1987.

PALEKAR, A.A.; VASUDEVAN, P.T.; YAN, S. Purification of lipase: a review. **Biocatalysis Biotransformation**, v.18, p.177-200, 2000.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAN, P. Solid state fermentation for production of industrial enzymes. **Current Science**, v.77, p.1153-1119, 1999.

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.505-559, 2006.

RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B.; MUSANI, R.; SAMAD, M.Y.; BASRI, M. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, p.153–159, 1997.

RAZAK, C.A.N.; MUSAMI, R.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. Characterization of membrane-bound lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* isolated from palm oil mill effluent. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, p.171–174, 1999.

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.25, p.145-151, 2006.

ROMERO, C. M.; BAIGORI, M.D.; PERA, L.M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, p.861–866, 2007.

RÚA, M.L.; SCHMIDT-DANNERT, C.; WAHL, S.; SPRAUER, A.; SCHMID, R.D. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* large-scale, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. **Journal Biotechnology**, v.56, p.89-102, 1997.

RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; SANTOS, D.R.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v.72, p.24-33, 2005.

RUIZ, C.; JAVIER PASTOR, F.I.; DIAZ, P. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. **Letters Applied Microbiology**, v. 37, p.354–359, 2003.

RUIZ, C.; FALCOCCHIO, S.; XOXI, E.; PASTOR, F.I.J.; DIAZ, P.; SASO, L. Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus*- related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1672, p.184-191, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Ribeirão Preto, ed. Legis Summa, 2010.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les ésters en emulsion. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 30, p. 513 - 521, 1958.

SAXENA, R.K; GHOSH, P.K; GUPTA, R; DAVIDSON, W.S; BRADDOO, S; GULATI, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, p.101-115,1999.

SAXENA, R.K. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v.52, p.1-18, 2003.

SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v.39, p.239-247, 2003.

SCHRAG, J.D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, v.351, p.761-764, 1991.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.9, p.199-210, 1998.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, p.996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, p.661-686, 2005.

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

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.T.; TSUMASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **Journal Fermentation Bioengineering**, v.75, p.349-352, 1993.

SHU, C.H.; XU, C.J.; LIN, G.C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v.41, p.734-738, 2006.

SHU, Z.Y.; YANG, J.K.; YAN, Y.J. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.23, p.96-101, 2006.

SILVA.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 321-326, 2005.

SLOTEMA, W. F.; SANDOVAL, G.; GUIEYSSE, D.; STRAATHOF, A. J. J.; MARTY, A. Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalysed amidation with ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, v.82, p.664-669, 2003.

SNELLMAN, E.A.; SULLIVAN, E.R.; COLWELL, R.R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p.5771-5779, 2002.

SOUZA, C.R.F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bahinia forficata* Link pelos processos de spray-dryer e leito de jorro**. Ribeirão Preto, 2003. 180p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

StatSoft. (2007). **Statistica for windows version 8.0 (computer program manual)**. StatSoft Inc., 2325 East 13th street, Tulsa OK, USA.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, p.315-333, 2002.

STROBEL, G.A.; BRYN, D.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal Natural Products**, v.6, p.257-268, 2004.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Bacteriology**, v.168, p.1070-1074, 1986.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52, p.1591–1592, 1988.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TAKADA, N.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. *Penicillium abeanum* Lipase: Purification, Characterization, and Its Use for Docosahexaenoic Acid Enrichment of Tuna Oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.82, p.498-501, 1996.

SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMIDT, R. Purification and some properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1124, p.253-261, 1992.

SZCZESNA-ANTCZAK, M.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; MODRZEJEWSKA, Z.; PATURA, J.; KALINOWSKA, H.; BIELECKI, S. Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in nonaqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B**, v.29, p.163–171, 2004.

TAIPA, M.A.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of lipases. **Journal of Biotechnology**, v.26, p.111–142, 1992.

TOIDA, J.; KONDOU, K.; FUKUZAWA, M.; OHNISHI, K.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.59, p.1199–1203, 1995.

TORRES, M.; DOLCET, M.M.; SALA, N.; CANELA, R. Endophytic fungi associated with mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.1771–1778, 2007.

TREVISAN, H.C. Lipases. In: Said S.; Pietro R.C.L.R. **Enzimas Como Agentes Biotecnológicos**, Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, cap.6, p.115-135.

TZANNIS S.T.; PRESTRELSKI, S.J. Moisture effects on protein-adjuvant interactions in spray-dried powders. Nature of destabilizing effects of sucrose. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.88, p.1236-1242, 1999.

VAN HEERDEN, E.; LITTHAUER, D.; VERGER, R. Biochemical characterisation and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films. **Enzyme Microbiol Technology**, v. 30, p.902- 909, 2002.

VEERARAGAVAN, K.; COLPITTS, T.; GIBBS, B.F. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1044, p.26–33, 1990.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p.143-148, 2000.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genet Bull**, v.13, p.42-43, 1956.

WOLSKI E.; MENUSSI E.; MAZUTTI M.; TONIAZZO, G.; RIGO, E.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; OLIVEIRA, J.V.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Response

surface methodology for optimization of lipase production by an immobilized newly isolated *penicillium* sp. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.47, p.9651-9657, 2009.

WU, X.Y.; JAASKELAINEN, S.; LINKO, Y.Y. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.59, p.145–150, 1996.

XIN, J.Y.; LI, S.B.; XU, Y.; CHUI, J.R.; XIA, C.G. Dynamic enzymatic resolution of naproxen methyl ester in a membrane bioreactor. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v.76, p.579-585, 2001.

YADAV, R.P.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, S. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.28, p.243–249, 1998.

YASUDA, M.; OGINO, H.; KIGUCHI, T.; KOTANI, T.; TAKAKURA, S.; ISHIBASHI, T.; NAKASHIMA, T.; FUKUDA, H.; ISHIKAWA, H. Purification and characterization of lipase from *Rhizopus chinensis* cells. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.88, p. 571–573, 1999.

YORINORI, J.T. **Doenças da soja no Brasil**. In: MIYSAKA, S. & MEDINA, J.C. eds. A soja no Brasil Central. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1982.

YOSHII, H.; NEOH, T.L.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M. Encapsulation of proteins by spray drying and crystal transformation method. **Drying Technology**, v.26, p.1308-1312, 2008.

YU, X.W.; LI, Y.Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis**, v.40, p.44–50, 2006.