

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
CAMPUS ALFENAS**

ERIC EDUARDO ALVES FERREIRA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E PARCIAL CARACTERIZAÇÃO DA
LIPASE DE *Preussia africana***

**ALFENAS/MG
2023**

ERIC EDUARDO ALVES FERREIRA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E PARCIAL CARACTERIZAÇÃO DA
LIPASE DE *Preussia africana***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Battaglia Hirata

**ALFENAS/MG
2023**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Ferreira, Eric Eduardo Alves.

Produção, purificação, imobilização e parcial caracterização da lipase de *Preussia africana* / Eric Eduardo Alves Ferreira. - Alfenas, MG, 2023.
60 f. : il. -

Orientador(a): Daniela Battaglia Hirata.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.
Bibliografia.

1. Lipase. 2. *Preussia africana*. 3. Purificação. 4. Solventes orgânicos. 5. Resinas hidrofóbicas. I. Hirata, Daniela Battaglia, orient. II. Título.

ERIC EDUARDO ALVES FERREIRA

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E PARCIAL CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Preussia africana*

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia

Aprovado em: 27 de outubro de 2023.

Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Patrícia Caroline Molgero Da Ros
Instituição: Universidade de São Paulo (EEL- USP)



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Battaglia Hirata, Professor do Magistério Superior**, em 27/10/2023, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1123622** e o código CRC **A743361C**.

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã e todos aqueles que estiveram comigo e me ajudaram a tornar a pessoa que sou hoje. Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Divina Providência por me permitir viver e aproveitar as oportunidades que Ela me oferece.

Aos meus pais, Eduardo e Rita, e minha irmã, Barbara, e todos os meus familiares, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando em todos os momentos.

A mim, por estar sempre comigo e por se esforçar para sempre fazer o melhor, apesar das adversidades.

A Prof.^a Dr.^a Daniela Battaglia Hirata, por toda a orientação, disposição e cuidado que dedicou a mim.

A minha parceira, Milena, por todos esses anos de amizade e companheirismo.

Aos membros do Laboratório de Bioprocessos, pela amizade e convivência.

Aos amigos que fiz até chegar aqui e que levarei para a caminhada.

A todos os professores que tive ao longo de minha carreira acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos, muito obrigado

RESUMO

O presente estudo buscou purificar uma nova lipase produzida pelo fungo endofítico *Preussia africana* (*P. africana*). As enzimas foram produzidas via cultivo submerso. Após o cultivo, o caldo foi filtrado e liofilizado para que as enzimas fossem concentradas. Utilizou-se solventes orgânicos (metanol, etanol 95%, etanol absoluto, iso-propanol e acetona), nas temperaturas de 10 e 25°C, para a precipitação das lipases, sendo observado que a acetona e o iso-propanol foram mais eficientes em precipitar as enzimas mantendo sua atividade catalítica, obtendo-se atividades específicas de $211,34 \pm 0,05$ e $179,50 \pm 0,08$ U/mg, respectivamente. Para esses solventes, uma nova etapa de precipitação adicional foi realizada, a fim de se obter uma maior atividade recuperada, variando-se a proporção do volume entre o sobrenadante resultante da primeira etapa de precipitação e a nova fase solvente e a temperatura (10 e 25 °C). Para a segunda etapa de precipitação, foi utilizada a proporção de 1:3 sobrenadante: solvente (v/v) e a temperatura de 10°C. Obteve-se para ambos os solventes um desempenho semelhante, sendo um fator de purificação de $1,89 \pm 0,01$ e uma atividade recuperada de 97,50% para o iso-propanol e um fator de purificação de $1,88 \pm 0,01$ e atividade recuperada de 96,70% para a acetona. Para a proporção de 1:2 sobrenadante: solvente (v/v) e 10 °C, para a segunda etapa de precipitação, a acetona apresentou melhor desempenho, obtendo o fator de purificação de $1,89 \pm 0,01$ e uma atividade recuperada de 93,45%. Após as etapas de precipitação, as enzimas foram separadas e a lipase de massa molecular próxima a 45 kDa foi purificada e caracterizada quanto ao tipo de substrato, pH e temperatura, de forma que a máxima atividade hidrolítica observada de $72,80 \pm 1,29$ U/mL, foi obtida utilizando-se óleo de oliva como substrato, no pH entre 7 e 8 para temperatura de 37°C. As resinas butil e octil-agarose foram utilizadas no intuito de se avaliar a imobilização da lipase obtida. A resina octil-agarose apresentou um melhor rendimento de imobilização, atingindo 81,56 %, entretanto, a maior atividade recuperada enzimática foi obtida para a resina butil-agarose (6,49 %).

Palavras-chave: Lipase. *Preussia africana*. Purificação. Solventes orgânicos. Resinas hidrofóbicas.

ABSTRACT

The present study sought to purify a new lipase produced by the endophytic fungus *Preussia africana* (*P. africana*). The enzymes were produced via submerged cultivation. After cultivation, the broth was filtered and freeze-dried so that the enzymes were concentrated. Organic solvents were used (methanol, 95% ethanol, absolute ethanol, iso-propanol and acetone), at temperatures of 10 and 25°C, for the precipitation of lipases, and it was observed that acetone and iso-propanol were more efficient. in precipitating the enzymes while maintaining their catalytic activity, obtaining specific activities of 211.34 ± 0.05 and 179.50 ± 0.08 U/mg, respectively. For these solvents, a new additional precipitation step was carried out in order to obtain greater recovered activity, varying the volume ratio between the supernatant resulting from the first precipitation step and the new solvent phase and the temperature (10 and 25°C). For the second precipitation step, a ratio of 1:3 supernatant: solvent (v/v) and a temperature of 10°C were used. A similar performance was obtained for both solvents, with a purification factor of 1.89 ± 0.01 and a recovered activity of 97.50% for iso-propanol and a purification factor of 1.88 ± 0.01 and recovered activity of 96.70% for acetone. For the ratio of 1:2 supernatant: solvent (v/v) and 10 °C, for the second precipitation step, acetone showed better performance, obtaining a purification factor of 1.89 ± 0.01 and a recovered activity of 93.45%. After the precipitation steps, the enzymes were separated and the lipase with a molecular mass close to 45 kDa was purified and characterized according to the type of substrate, pH and temperature, so that the maximum hydrolytic activity observed was 72.80 ± 1.29 U/mL, was obtained using olive oil as a substrate, at a pH between 7 and 8 at a temperature of 37°C. Butyl and octyl-agarose resins were used to evaluate the immobilization of the lipase obtained. The octyl-agarose resin showed a better immobilization yield, reaching 81.56%, however, the highest recovered enzymatic activity was obtained for the butyl-agarose resin (6.49%).

Keywords: Lipase. *Preussia africana*. Purification. Organic solvents. hydrophobic resins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reação de hidrólise catalisada por lipase .	18
Figura 2 -	Ativação interfacial da lipase.	19
Figura 3 -	<i>P. africana</i> em meio SDA (Ágar Sabouraud).	20
Figura 4 -	Esquema de uma separação cromatográfica.	22
Figura 5 -	Modificação da Agarose em Octil-Agarose.	23
Figura 6 -	Diferentes métodos de imobilização enzimática.	26
Figura 7 -	Esquema do processo de obtenção da lipase de <i>P. africana</i> via cultivo submerso.	29
Figura 8 -	Análise via SDS – PAGE A) Marcador molecular; B) Precipitado reunido da primeira e segunda de precipitação com acetona.	44
Figura 9 -	Análise via SDS – PAGE A) Marcador molecular; B) Fase superior C) Fase inferior.	45
Figura 10 -	Análise via SDS – PAGE para as diferentes fases precipitadas: A) Marcadores moleculares; B) fase R1; C) fase R2; D) fase inferior.	46
Figura 11 -	Especificidade da lipase de <i>P. africana</i> frente a diferentes fontes de triglicerídeos.	48
Figura 12 -	Efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase de <i>P. africana</i> .	49
Figura 13 -	Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase de <i>P. africana</i> .	50
Figura 14 -	Representação da adsorção das lipases de <i>P. africana</i> em resinas hidrofóbicas.	52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Atividade inicial do caldo, atividade do precipitado após a precipitação e a atividade relativa obtida para cada solvente a 10 e 25°C.36
- Tabela 2 - Proteína inicial do caldo, proteína presente no precipitado após a precipitação e a proteína precipitada relativa obtida para cada um solvente a 10 e 25°C.38
- Tabela 3 - Atividade específica inicial, atividade específica do precipitado após purificação com os solventes a 10 e 25°C e o fator de purificação.....39
- Tabela 4 - Recuperação da atividade enzimática e de proteína para a primeira e segunda etapa de precipitação, utilizando iso-propanol e acetona a 10 e 25 °C, 1:3 (v/v, caldo: solvente) para a primeira precipitação e 1:3 (v/v, sobrenadante: solvente) para a segunda precipitação.40
- Tabela 5 - Atividade específica inicial, atividade específica do precipitado após duas etapas de purificação e o fator de purificação, utilizando iso-propanol e acetona a 10 e 25 °C, 1:3 (v/v, caldo: solvente) para a primeira precipitação e 1:3 (v/v, sobrenadante: solvente) para a segunda precipitação.41
- Tabela 6 - Recuperação da atividade enzimática e de proteína para a primeira e segunda etapa de precipitação, utilizando iso-propanol e acetona a 10 e 25 °C, 1:3 (v/v, caldo: solvente) para a primeira precipitação e 1:2 (v/v, sobrenadante: solvente) para a segunda precipitação.42

Tabela 7 - Atividade específica inicial, atividade específica do precipitado após duas etapas de purificação e o fator de purificação, utilizando iso-propanol e acetona a 10 e 25 °C, 1:3 (v/v, caldo: solvente) para a primeira precipitação e 1:2 (v/v, sobrenadante: solvente) para a segunda precipitação.	43
Tabela 8 - Atividade enzimática, proteína total, atividade específica e fator de purificação para cada uma das fases obtidas após centrifugação a 4°C.	46
Tabela 9 - Parâmetros de imobilização da lipase de <i>P. africana</i> utilizando-se as resinas butil e octil-agarose.	51
Tabela 10 - Parâmetros de imobilização da lipase de <i>P. africana</i> presente na fase R1 utilizando-se as resinas butil e octil-agarose.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>P. africana</i>	<i>Preussia africana</i>
<i>G. candidum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
M	Molar
SDA	Ágar Sabouraud
MEA	Ágar Extrato de Malte
kDa	Quilodaltons
mg	Miligramas
mL	Mililitros
rpm	Rotações Por Minutos
m/v	Massa/Volume
v/v	Volume/Volume
U	Unidade internacional de atividade enzimática

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	LIPASES.....	17
3.2	O <i>Preussia africana</i>	19
3.3	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	21
3.3.1	CROMATOGRAFIA	22
3.3.2	PRECIPITAÇÃO	24
3.3.2.1	PRECIPITAÇÃO POR SAIS	24
3.3.2.2	PRECIPITAÇÃO POR SOLVENTES.....	25
3.4	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	OBTENÇÃO DO <i>Preussia africana</i>	28
4.2	PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>Preussia africana</i>	28
4.3	PRECIPITAÇÃO DA LIPASE DE <i>Preussia africana</i>	29
4.3.1	SEPARAÇÃO DAS LIPASES PRECIPITADAS	30
4.3.2	PARÂMETROS DA PRECIPITAÇÃO DAS LIPASES DE <i>Preussia africana</i>	30
4.4	IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>P. africana</i> COM RESINAS.....	32
4.4.1	PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO	32
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>P. africana</i>	33
4.5.1	ESPECIFICIDADE EM DIFERENTES SUBSTRATOS	33
4.5.2	DETERMINAÇÃO DO pH E TEMPERATURA ÓTIMOS	34
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	34
4.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA.....	34
4.8	ANÁLISE DE ELETROFORESE (SDS-PAGE).....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	PRECIPITAÇÃO DA LIPASE DE <i>Preussia africana</i>	36
5.1.1	SEPARAÇÃO DAS LIPASES PRECIPITADAS	44
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE 45 kDa.....	47
5.2.1	ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO	47

5.2.2	TEMPERATURA E pH ÓTIMOS.....	49
5.3	IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Preussia africana</i> EM RESINAS.....	50
5.3.1	IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE MASSA MOLECULAR PRÓXIMA A 45 kDa.....	53
6	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas responsáveis pela catálise de reações bioquímicas, permitindo que estas aconteçam de forma mais rápida e eficiente, quando comparadas aos catalisadores químicos. Como vantagens da utilização de enzimas, frente a estes catalisadores tradicionais, pode-se citar: as condições mais brandas de reação, diminuição de etapas subsequentes de purificação do produto e elevada seletividade. Além disso, as enzimas são biodegradáveis e biocompatíveis, não gerando resíduos ou subprodutos que possam contaminar o meio ambiente (LIU *et al.*, 2021).

As lipases, classificadas como triglicerol hidrolases (E.C. 3.1.1.3), são enzimas capazes de hidrolisar as ligações nas moléculas de triglicerídeos, liberando ácidos graxos livres e glicerol. Em meios nos quais haja uma redução ou ausência de água, as lipases podem realizar reações de síntese, como por exemplo, a reação de esterificação (PEREIRA *et al.*, 2022).

As lipases estão presentes em muitos seres vivos, como animais, vegetais e micro-organismos. Entretanto, as enzimas provenientes de fungos possuem vantagens frente às obtidas de outras fontes, tais como um menor custo de produção e elevada produtividade, propiciando um maior controle sob as suas condições de cultivo (SOUZA *et al.*, 2018).

A utilização de lipases em processos industriais vem se amplificando nas últimas décadas devido ao apelo da sociedade pela química verde. Sua utilização nos setores alimentícios, química fina, biocombustíveis e farmacêutica exemplifica a sua importância no mundo contemporâneo (LIU *et al.*, 2021). Entretanto, para que elas sejam utilizadas, geralmente é necessária uma ou mais etapas de purificação após a sua produção, de forma a se obter a retirada dos interferentes presentes no meio de cultivo, mas mantendo a atividade catalítica da enzima (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001).

O *P. africana* é um fungo endofítico que vive em simbiose com uma espécie vegetal, podendo habitar diferentes tecidos. O primeiro relato do *P. africana* na literatura foi feito por Arenal, Platas e Peláez, no ano de 2005, entretanto, até o momento há poucos relatos deste fungo na literatura. Geralmente, as informações publicadas tratam de fases iniciais de pesquisa, de forma a documentar uma triagem

de seus metabólitos e localidades nas quais ele possa ser isolado (SEDDOUK *et al.*, 2022).

Oliveira, Silva e Hirata (2021) determinaram as condições ótimas de cultivo do *P. africana* para a produção de lipases. Até o momento não há relato na literatura de estratégias utilizadas para a purificação dessas lipases produzidas. A utilização de enzimas mais puras nos processos industriais permite a obtenção de um máximo desempenho por miligrama de proteína utilizada, além de propiciar sua utilização em uma gama maior de processos e produtos (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi a produção, purificação e imobilização da lipase produzida por cultivo submerso pelo *P. africana*.

2.2 Objetivos Específicos

Este trabalho envolveu diversos objetivos específicos, todos em conformidade com o objetivo geral:

- a) produção da lipase pelo fungo *P. africana* por cultivo submerso;
- b) concentração por liofilização do caldo de cultivo contendo as lipases;
- c) seleção dos solventes orgânicos a serem utilizados na precipitação;
- d) seleção das melhores condições para maximizar a recuperação da atividade enzimática em cada etapa de precipitação com solventes orgânicos;
- e) seleção das resinas em agarose para estudo da imobilização.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Lipases

As lipases (triacilglicerol hidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas do grupo das hidrolases que possuem a capacidade de hidrolisar as ligações ésteres presentes nas moléculas de triglicerídeos, atuando em substratos imiscíveis em soluções aquosas, agindo no limiar água-substrato ou em emulsões (SAMPAIO *et al.*, 2022).

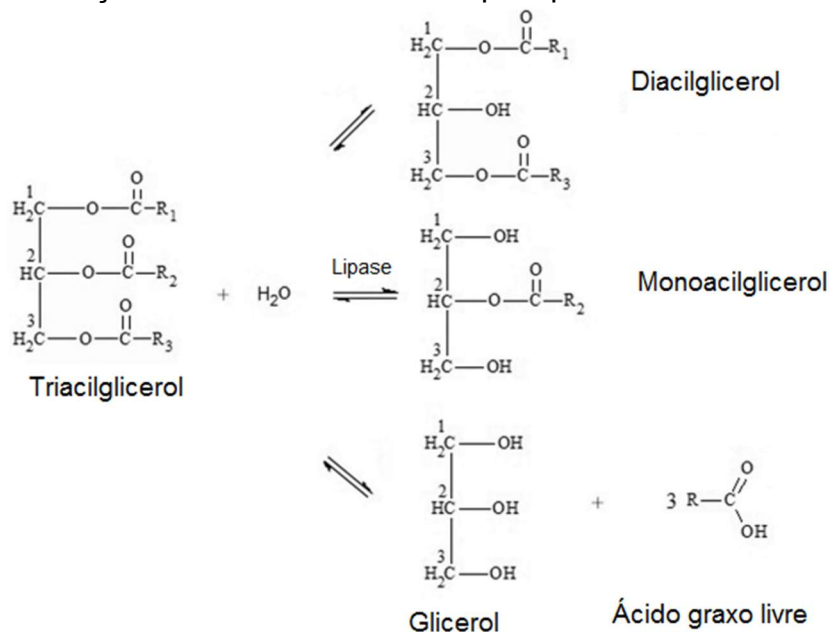
As lipases podem apresentar enantio e regioseletividade e elevada especificidade por determinados substratos, possuindo aplicação nos mais variados setores industriais, tais como produção de biopolímeros, química fina e farmacêutica, biocombustíveis e alimentício (MONTEIRO *et al.*, 2021).

As lipases podem ser obtidas a partir de micro-organismos, animais e vegetais. Entretanto, as lipases de origem vegetal são produzidas em menor quantidade e possuem difícil obtenção, dessa forma, para aplicação industrial as lipases de origem microbiana são mais atrativas. Além da alta capacidade de produção, as lipases microbianas possuem uma maior facilidade de ampliação de escala e uma maior variedade em suas características, tais como a atividade, pH e temperatura ótimos e condições de cultivos (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados na obtenção de lipases, destacando os gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Geotrichum* (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

Geralmente, o sítio catalítico é formado pela tríade dos resíduos de serina, ácido aspártico e histidina (PARK; PARK, 2022). Ao hidrolisar as moléculas de triglicerídeos, obtém-se diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres, conforme mostrado na Figura 1 (SAMPAIO *et al.*, 2022).

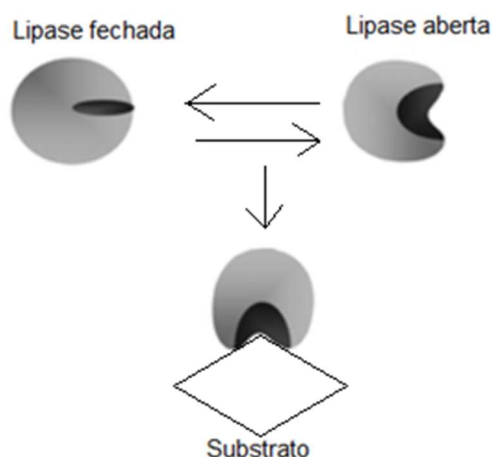
Figura 1 – Reação de hidrólise catalisada por lipase.



Fonte: Adaptado de SAMPAIO *et al.*, 2022.

As lipases podem se apresentar na forma aberta ou fechada, devido à existência de uma tampa polipeptídica em sua estrutura. Na forma fechada, essa tampa recobre o sítio ativo, inibindo a sua ação catalítica. Entretanto, na presença de um substrato ou algum polímero hidrofóbico, essa cadeia polipeptídica se abre, expondo o sítio ativo. Essa mudança conformacional permite o aumento da atividade catalítica e ainda a imobilização por adsorção. Esse fenômeno é chamado de ativação interfacial (Figura 2) (MONTEIRO *et al.*, 2021; CAMBRAIA *et al.*, 2022).

Figura 2 - Ativação interfacial da lipase.



Fonte: Autor.

Além das reações de hidrólise que ocorrem na presença de água, as lipases também são capazes de catalisar as reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e acidólise; na ausência ou redução de água em um meio reacional (SAMPAIO *et al.*, 2022).

Essas enzimas podem ser usadas em uma ampla faixa de temperatura e pH, apresentando um desempenho satisfatório em temperaturas brandas e pH neutro, possuindo características próprias de acordo com sua fonte. Além disso, não necessitam de cofatores, tornando seu uso ainda mais simples (CAVALCANTE *et al.*, 2021).

3.2 O *Preussia africana*

O *P. africana* (Figura 3) é um fungo endofítico pertencente ao gênero *Ascomycota*. Os fungos endofíticos vivem nos tecidos vegetais, estando presentes desde as raízes e sementes até as folhas e frutos. A relação que estabelecem com o vegetal é a de simbiose, uma vez que ambos os seres vivos são favorecidos pela relação. Assim, os fungos endofíticos promovem uma proteção contra muitos patógenos, conferindo uma maior resistência a fatores externos desfavoráveis para o vegetal e a planta, em contrapartida, permite o seu crescimento e nutrição (SOUZA *et al.*, 2018).

Figura 3 – *P. africana* em meio SDA (Ágar Sabouraud).



Fonte: Autor.

Os fungos endofíticos produzem uma grande variedade de enzimas, tais como celulases, amilases e lipases, além de outras moléculas bioativas que possuem ação microbiana e antioxidante. Ambas, enzimas e moléculas possuem interesse industrial, uma vez que podem ser usadas nos mais variados setores e em diferentes medicamentos (SEDDOUK *et al.*, 2022).

O *P. africana* foi isolado de vegetais em diferentes partes do mundo. Ameen *et al.* (2021) foram capazes de isolá-lo a partir de babosa (*Aloe vera*) na Arábia Saudita; Seddouk *et al.* (2022), em uma espécie de zimbro (*Juniperus oxycedrus*) no Marrocos e Souza *et al.* (2018), de folhas do ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*), na região de Minas Gerais, no Brasil.

Em cada uma dessas localidades, diferentes biomoléculas foram identificadas, uma vez que a necessidade dos vegetais era diferente em cada uma das localidades, estando ou não em condições de estresse (SEDDOUK *et al.*, 2022).

Ameen *et al.* (2021), ao isolarem o *P. africana* da *Aloe vera* no deserto de Asir na Arábia saudita, verificaram que ele produzia diversas moléculas de interesse pertencentes aos grupos dos alcaloides, saponinas, flavonoides, terpenos, esteroides e fenóis. Estas moléculas possuem ações antioxidante, anti-inflamatória,

anticancerígena e permitem a renovação de diversos tecidos do corpo humano, sendo sua obtenção de grande interesse.

Seddouk *et al.* (2022) identificaram o *P. africana* no caule de uma árvore da região da cidade de Ifrane, no Marrocos, o cedro-de-espanha (*Juniperus oxycedrus*), espécie endêmica da região mediterrânea. Nas condições estudadas, o fungo foi capaz de produzir grandes quantidades de celulase. Além disso, estas enzimas possuíam elevada estabilidade térmica, de forma que, mesmo estando em sua forma livre, não perdiam a atividade após 4 horas de reação em suas condições ótimas.

Brum *et al.* (2012) também foram capazes de identificar o gênero *Preussia* em plantas da videira *Vitis labrusca*, a Niagara Rosada. Diferentemente de outros estudos, o seu foco foi utilizar os fungos endofíticos como controle biológico no combate de fungos patogênicos, evidenciando sua complexidade e elevada flexibilidade.

Souza *et al.* (2018) isolaram o *P. africana* a partir das folhas do ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*), no município de Alfenas. Este vegetal é nativo da floresta amazônica e presente na América do Sul e Central. Durante seu estudo, diversos micro-organismos foram identificados, mas o *P. africana* foi o que apresentou melhor desempenho na produção de lipases, após um breve período de cultivo submerso (48 horas).

Oliveira *et al.* (2021) deram continuidade ao trabalho de Souza *et al.* (2018) e nas condições estudadas, o fungo produziu apenas um tipo de lipase, com tamanho aproximado de 14,5 kDa, o que facilita e barateia processos subsequentes de purificação. Seu máximo desempenho catalítico foi observado para o valor de pH 6 e não apresentou diferenças significativas em sua atividade para a faixa de temperatura, estudada, entre os 20 e 55°C. Além disso, os autores concluíram que a lipase produzida possuía afinidade por substratos compostos por ácidos graxos insaturados e de longas cadeias carbônicas.

3.3 Purificação de proteínas

O processo de purificação de um produto, ou *downstream*, costuma ser a etapa mais onerosa de um processo, bem como a mais importante. Muitas vezes, apenas uma etapa não é o suficiente, sendo necessário uma cascata de operações para alcançar o máximo grau de pureza. A escolha pelo método a ser utilizado depende

de diversos fatores, entre eles, a fonte da enzima e do seu tamanho molecular. (FERREIRA *et al.*, 2018; BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

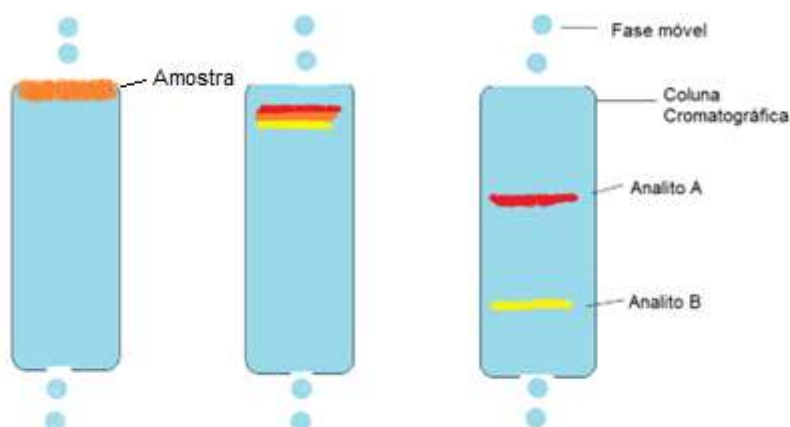
A busca por formas de baratear essa etapa levou a diversos avanços e no estabelecimento de diferentes métodos de purificação de enzimas como por exemplo os métodos cromatográficos, a ultrafiltração, a precipitação por adição de sais e por adição de solventes orgânicos (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001; PRECZESKI *et al.*, 2018).

3.3.1 Cromatografia

A cromatografia (Figura 4) é a técnica mais conhecida e utilizada para a purificação de biomoléculas. Descrita pela primeira vez no início do século 20 pelo russo Michael Tswett, foi na década de 60 que ela tomou novas formas e passou a ser amplamente difundida e utilizada da forma que se conhece atualmente (PACHECO *et al.*, 2015).

Por definição, cromatografia é uma técnica na qual os componentes de uma mistura são separados com base em suas características físico – químicas, tais quais tamanho, hidrofobicidade, solubilidade, força iônica, entre outros, enquanto eles são eluidos, através de uma coluna contendo a fase estacionária, por meio da fase móvel (HAGE; CARR, 2013).

Figura 4 - Esquema de uma separação cromatográfica.



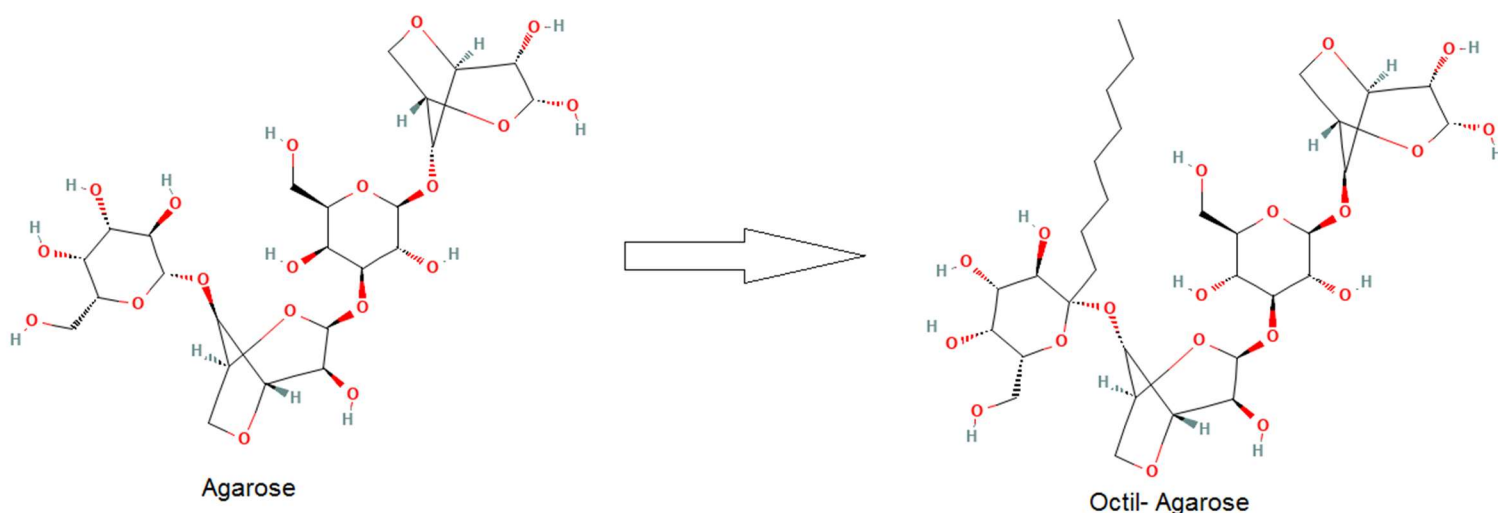
Fonte: Autor.

A fase estacionária é um suporte sólido que pode ou não possuir modificações em sua superfície de modo a aumentar ou diminuir a interação com os analitos de uma amostra. Já a fase móvel é um fluido que percola a coluna, eluindo os componentes da mistura, podendo ser inerte ou interagir com os analitos (NAZARIO; LANÇAS, 2013).

Há diversos tipos de cromatografia, as mais utilizadas são a de exclusão por tamanho, na qual os componentes são separados com base em seu tamanho molecular; partição, em que os componentes são separados com base na solubilidade que possuem na fase estacionária; troca iônica, na qual os analitos se atraem à fase estacionária por forças eletroquímicas devido à presença de cargas elétricas; e adsorção, na qual os analitos interagem com a fase estacionária por meio de interações fracas, como as forças hidrofóbicas (HAGE; CARR, 2013).

As fases estacionárias determinam a retenção do analito ao longo da coluna cromatográfica. A sílica é o material mais utilizado e conhecido, mas outros materiais como a celulose e agarose também podem ser utilizados. Além disso, esses materiais podem sofrer modificações em suas estruturas e mudar certas características como a polaridade (Figura 5) (NAZARIO; LANÇAS, 2013).

Figura 5 - Modificação da Agarose em Octil-Agarose.



Fonte: Autor.

No processo de purificação enzimática com o uso de colunas cromatográficas os métodos que mais se destacam são aqueles baseados no tamanho das enzimas, em suas cargas superficiais e na adsorção da enzima à fase estacionária (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001). Além disso, muitas vezes apenas uma etapa utilizando colunas cromatográficas não é eficiente para a máxima purificação, sendo necessário etapas subsequentes (ENEVA *et al.*, 2022).

Apesar desses materiais serem amplamente utilizados em colunas, eles podem ser utilizados em modo batelada. Podendo, em apenas um recipiente e sem a necessidade de equipamentos sofisticados, separar eficientemente componentes específicos das amostras, sem os inconvenientes que acontecem ao se utilizar colunas cromatográficas como por exemplo o uso elevado de solventes, a dificuldade em se empacotar eficientemente uma coluna e a necessidade de se utilizar quantidades maiores de resinas (BRABCOVÁ *et al.*, 2013; NAZARIO; LANÇAS, 2013).

3.3.2 Precipitação

O uso de sais, como o sulfato de amônio, ou solventes orgânicos miscíveis em água, como a acetona, são amplamente difundidos na literatura como formas de se purificar e concentrar proteínas. Entretanto, são técnicas que, isoladas, não apresentam um alto rendimento, sendo necessário etapas subsequentes de purificação (MARZZOCO; TORRES, 2015)

3.3.2.1 Precipitação por sais

O uso de sais para a purificação de enzimas é altamente utilizado na literatura, com maior expressão do uso do sulfato de amônio. Nessa metodologia, o uso de soluções saturadas permite que as enzimas interajam umas com as outras levando à formação de estruturas de maior peso molecular e, conseqüentemente, à sua precipitação, conhecido como efeito de *salting-out* (GURKOK; OZDAL, 2021).

Entretanto, apenas a adição da solução salina não é suficiente, sendo necessário o uso de outras técnicas para o aumento da eficiência da purificação, como o uso de centrífugas, de forma a favorecer a precipitação. Uma vez o precipitado isolado, é essencial a retirada do sal residual. Essa retirada pode ser feita pelo uso

de membranas de diálise ou o uso de técnicas cromatográficas. (PRECZESKI *et al.*, 2018).

O uso de técnicas subsequentes de purificação encarece o processo, sendo muitas vezes necessário o uso de equipamentos específicos, e ainda pode aumentar as perdas tanto da atividade enzimática, quanto da própria quantidade de enzimas disponíveis (MARZZOCO; TORRES, 2015).

3.3.2.2 Precipitação por solventes orgânicos

A precipitação por solventes orgânicos também é muito bem estabelecida na literatura. O uso dessas substâncias não exige um aparato sofisticado e não necessita equipamentos específicos para sua utilização (FERREIRA *et al.*, 2018).

Entretanto, muitos desses solventes são inflamáveis e podem causar danos se forem utilizados e estocados de forma incorreta. Além disso, muitos são oriundos de fontes não renováveis, como o petróleo, não se enquadrando nos critérios para a química verde (KAR *et al.*, 2021).

Junto a isso, não são todas as enzimas que são tolerantes ao uso desses solventes, levando a perda de sua estrutura tridimensional e, por consequência, a perda de sua capacidade catalítica. Dessa forma, é necessário controlar alguns parâmetros como a temperatura, a polaridade e a relação entre a quantidade de solvente e de enzimas do sistema (FERREIRA *et al.*, 2018).

Ao se adicionar solventes orgânicos, esses interagem com as moléculas de água presentes entre as enzimas, permitindo que estas interajam entre si, levando a precipitação. Quanto mais polar for um solvente, maior será essa interação e, conseqüentemente, maior será a precipitação. Entretanto, a elevada polaridade interfere na estrutura enzimática e conseqüentemente pode afetar a sua capacidade catalítica (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001).

A escolha do solvente orgânico a ser utilizado depende da estrutura da enzima, de sua tolerância frente aos solventes, de sua toxicidade e disponibilidade. A escolha adequada pode levar a uma rápida e eficiente purificação, no entanto, o uso inadequado ocasiona desnaturação e conseqüente perda da atividade, sendo necessário realizar estudos específicos para diferentes enzimas. Os principais solventes utilizados para a precipitação de proteínas são a acetona, propanol e o etanol (PRECZESKI *et al.*, 2020).

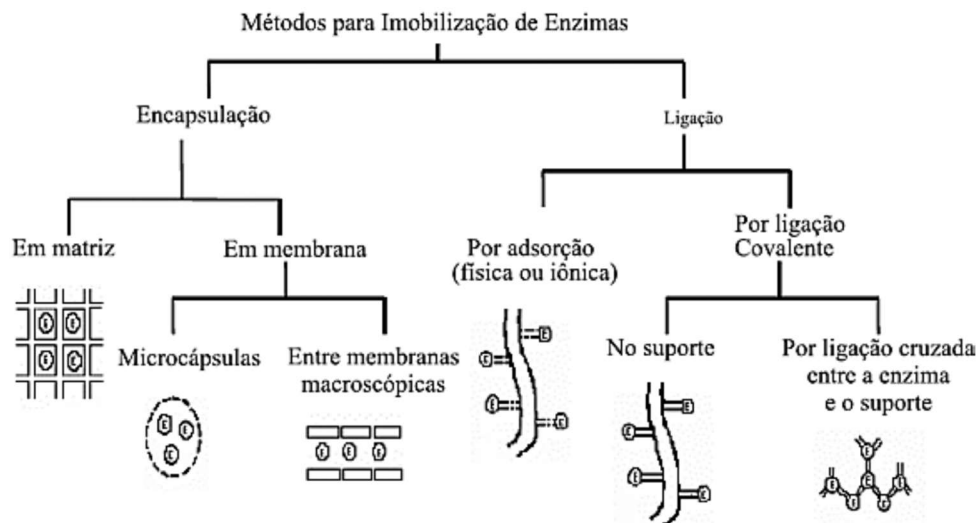
3.4 Imobilização enzimática

A utilização das lipases em sua forma livre apresenta pontos negativos como a baixa estabilidade operacional e a dificuldade de ser retirada do meio reacional ao final da reação, levando a um aumento dos custos do processo (ISMAIL; BAEK, 2020).

Uma alternativa é a utilização da técnica de imobilização enzimática. Nesta técnica, a enzima é confinada em uma região definida do espaço e a atividade catalítica fica restrita. Isso permite o aumento da estabilidade, a sua reutilização e recuperação da enzima (ATTIQUE *et al.*, 2023).

Não há um método universal e a técnica pode variar conforme o tipo da enzima e a sua origem, já que enzimas diferentes possuem características diferentes. A Figura 6 apresenta um esquema dos principais métodos utilizados para a imobilização enzimática (FERREIRA *et al.*, 2018).

Figura 6 - Diferentes métodos de imobilização enzimática.



Fonte: (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004, p. 624.

Uma das metodologias mais aplicadas é a imobilização por adsorção física, por ser mais simples e de baixo custo. Nesta técnica, há a adsorção das enzimas no suporte por meio de interações fracas, como o caso das forças de Van der Waals, ligações iônicas ou por ligações de hidrogênio. Para a imobilização de lipases por

adsorção física, os suportes hidrofóbicos são mais utilizados, pois permitem que essas enzimas sejam immobilizadas pelo mecanismo da ativação interfacial (ver Figura 2) (FERREIRA *et al.*, 2018).

Entretanto, por não haver o uso de agentes ligantes, há uma maior possibilidade de dessorção das enzimas devido a variações do meio reacional, como a temperatura e o pH, sendo essas variações minimizadas ao se utilizar suportes hidrofóbicos para a immobilização (ALMEIDA *et al.*, 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do *Preussia africana*

O fungo endofítico *P. africana*, identificado por Souza *et al.* (2018) (GenBank: SAMN 06350896; CPQBA 1304/16 DRM - 01), foi armazenado em ágar extrato de malte (MEA) a 4°C.

4.2 Produção de lipases por *Preussia africana*

As lipases foram produzidas por cultivo submerso (Figura 7). O meio de inóculo, teve a seguinte composição: 2% (m/v) de peptona de caseína, 0,1% (m/v) de extrato de levedura, 0,05% (m/v) de nitrato de sódio (NaNO₃), 0,05% (m/v) de sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄. 7H₂O) e 1% (v/v) de óleo de girassol (OLIVEIRA; SILVA; HIRATA, 2021).

O meio de produção teve a seguinte composição: 2% (m/v) de peptona de caseína, 0,1% (m/v) de extrato de levedura, 0,05% (m/v) de nitrato de sódio (NaNO₃), 0,05% (m/v) de sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄. 7 H₂O), 0,05% (m/v) de nitrato de cálcio tetra-hidratado (Ca (NO₃)₂. 4 H₂O), 0,05% (m/v) de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) 1% (v/v) de óleo de girassol (OLIVEIRA; SILVA; HIRATA, 2021).

Na etapa de reativação, o micro-organismo foi incubado a 30°C em uma placa contendo meio *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) por 7 dias. Após esse período, foi retirado 5 mm de diâmetro da placa contendo a colônia já desenvolvida e transferido para um Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL do meio de inóculo, que foi incubado por 48 h em agitador orbital a 30°C sob agitação de 250 rpm. Na etapa de produção, foram transferidos 10 mL de inóculo para 100 mL do meio de produção previamente autoclavados em Erlenmeyer de 1 L. Estes foram mantidos a 30°C sob agitação de 250 rpm por 60 horas (OLIVEIRA; SILVA; HIRATA, 2021).

Após esse período o caldo foi filtrado à vácuo com papel filtro e o sobrenadante foi liofilizado até atingir um terço do volume inicial visando à sua concentração.

Figura 7 – Esquema do processo de obtenção da lipase de *P. africana* via cultivo submerso.



Fonte: Autor.

4.3 Precipitação da lipase de *Preussia africana*

Para a precipitação das lipases presentes no caldo liofilizado foram utilizados solventes orgânicos. Os solventes avaliados foram: acetona, etanol anidro, etanol 95%, iso-propanol e metanol (PRECZESKI *et al.*, 2018; PODREPLEK; KNEZ; LEITGEB, 2019).

Ensaio preliminares de precipitação foram realizados utilizando duas temperaturas diferentes (10 e 25 °C), utilizando-se a proporção de 1:3 (v/v) caldo de cultivo: solvente. Após a adição do solvente, o sistema foi homogeneizado e centrifugado em tubos Falcon de 15 mL por 15 minutos a 3.000 rpm para a precipitação das proteínas. As enzimas precipitadas foram ressuspensas em tampão fosfato pH 7 100 mM e submetidas a análise de atividade hidrolítica e quantificação enzimática (OTA; SAWAMOTO; HASUO, 2000).

Após os ensaios preliminares, os solventes iso-propanol e acetona foram escolhidos para a utilização nos ensaios posteriores realizados nas temperaturas de 10 e 25°C, utilizando-se a proporção de 1:3 (v/v) caldo de cultivo: solvente. O sistema foi homogeneizado e centrifugado em tubos Falcon de 15 mL por 15 minutos a 3.000 rpm. A etapa de precipitação foi repetida, sendo o sobrenadante retirado e novamente adicionado solvente. A variação da proporção de solvente para esta segunda etapa

de precipitação foi estudada e, assim, dois ensaios foram realizados utilizando as proporções de 1:2 e 1:3 (v/v) caldo: solvente. O sistema foi homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente para a primeira etapa e precipitação. As lipases precipitadas foram ressuspensas em tampão fosfato pH 7 100 mM e submetidas a análise de atividade hidrolítica e de concentração de proteína.

O volume utilizado do caldo liofilizado foi igual a 2 mL. O volume de tampão fosfato pH 7 100 mM usado na ressuspensão da lipase precipitada após as etapas de precipitação foi constante e igual a 2 mL. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3.1 Separação das lipases precipitadas

As enzimas obtidas na etapa anterior por precipitação foram ressuspensas e mantidas em repouso à 5 °C por 24 h. Depois, foram submetidas a uma centrifugação refrigerada a 4°C, por 15 minutos a 3.000 rpm, o sobrenadante (R1) foi reservado e ao precipitado foi adicionado 0,5 mL de tampão fosfato pH 7 100 mM, ressuspendido e centrifugado novamente nas mesmas condições. Este novo sobrenadante (R2) e a fase inferior foram também submetidas a ensaios de quantificação enzimática, atividade hidrolítica e à eletroforese. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3.2 Parâmetros da precipitação das lipases de *Preussia africana*

Os parâmetros descritos pelas equações I a IX foram calculados de acordo com Ferreira *et al.* (2018) e Menegotto *et al.* (2021).

A atividade hidrolítica inicial do caldo (AI) dada em unidades de atividade (U) para a enzima livre no caldo de cultivo foi determinada pela equação I:

$$AI = V \times AC \quad (I)$$

No qual V é o volume (mL) utilizado de caldo de cultivo contendo as lipases produzidas pelo *P. africana* e AC é a sua atividade hidrolítica (U/mL).

A atividade hidrolítica recuperada da enzima precipitada (AP_r) é dada pela equação II:

$$AP_r = V \times ACP \quad (II)$$

No qual ACP é a atividade hidrolítica (U/mL) obtida após a precipitação e V é o volume (mL) de tampão fosfato utilizado para ressuspensão.

Assim, a atividade recuperada relativa (ARR) é dada pela equação III:

$$ARR(\%) = \frac{AP_r}{AI} \times 100 \quad (III)$$

A quantidade inicial de proteína no caldo de cultivo (PI) é dada em mg pela equação IV:

$$PI = V \times P_t \quad (IV)$$

No qual P_t é a concentração de proteína total (mg/mL) no caldo de cultivo e V é o volume (mL) utilizado de caldo de cultivo contendo as lipases de *P. africana*.

A quantidade de proteína precipitada (PP_r) é dada em mg pela equação V:

$$PP_r = V \times PR \quad (V)$$

Em que PR é a concentração de proteína após a precipitação com solvente (mg/mL) e V é o volume (mL) de tampão fosfato utilizado para ressuspensão.

Assim, a porcentagem de proteína recuperada (PRR) é dada pela equação VI:

$$PRR(\%) = \frac{PP_r}{PI} \times 100 \quad (VI)$$

A atividade específica inicial (AEI) em U/mg foi calculada pela equação VII:

$$AEI = \frac{AI}{PI} \quad (VII)$$

De forma análoga, a atividade específica da enzima precipitada (AEP) em U/mg foi determinada pela equação VIII:

$$AEP = \frac{APr}{PPr} \quad (VIII)$$

O fator de purificação (Fp) foi calculado pela razão IX:

$$Fp = \frac{AEP}{AEI} \quad (IX)$$

4.4 Imobilização da lipase de *Preussia africana* com resinas

O método de imobilização empregado foi de adsorção física pelo mecanismo de ativação interfacial presente nas lipases. As resinas butil-agarose e octil-agarose acondicionadas em solução aquosa de etanol 70% (v/v) foram filtradas a vácuo e lavadas com água destilada. Na sequência foram armazenadas sob refrigeração a 4°C para posterior utilização.

O volume utilizado de caldo de cultivo variou de forma que a concentração inicial de enzima utilizada se mantivesse sempre em 10 mg/mL. A esse volume foi adicionado a 0,1 gramas de resina e agitado a 200 rpm por 12 horas à temperatura ambiente. Ao final, após a filtração à vácuo o sobrenadante foi retirado e o derivado foi lavado com água destilada. Foram realizados ensaios de atividade enzimática no sobrenadante e no derivado e de quantificação de proteínas no sobrenadante (BRABCOVÁ *et al.*, 2013).

4.4.1 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização apresentados nas equações abaixo foram calculados de acordo com Ferreira *et al.* (2018).

A atividade inicial oferecida (AO) em U para a enzima livre no caldo de cultivo foi determinada pela equação X:

$$AO = V \times AHL \quad (X)$$

No qual V é o volume utilizado de caldo de cultivo (mL) contendo as lipases de *P. africana* e AH_L é a sua atividade hidrolítica (U/mL).

A atividade desaparecida (AD) em U foi determinada pela equação XI:

$$AD = AO - SH \quad (XI)$$

Em que SH é a atividade em unidades de atividade (U) no sobrenadante após a imobilização da lipase no derivado.

O rendimento de imobilização (RI) foi determinado pela equação XII:

$$RI(\%) = \frac{AD}{AO} \times 100 \quad (XII)$$

A atividade recuperada (AR), que demonstra o quanto efetivamente da atividade enzimática é expressa no derivado, foi determinada pela equação XIII:

$$AR(\%) = \frac{AH}{AD} \times 100 \quad (XIII)$$

No qual AH representa a atividade hidrolítica em unidades de atividade (U) do derivado após a imobilização

4.5 Caracterização da lipase de *Preussia africana*

4.5.1 Especificidade em diferentes substratos

A especificidade da enzima ao substrato foi observada ao realizar a atividade enzimática da enzima quando em um meio contendo a emulsão de diferentes óleos vegetais e a tributirina. Os ensaios foram realizados de acordo com o método descrito por Soares *et al.* (1999). Os óleos utilizados foram: oliva, soja, algodão, girassol, milho, palma, canola, linhaça e a tributirina (SILVEIRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA; SILVA; HIRATA, 2021).

4.5.2 Determinação do pH e temperatura ótimos

Para determinar a influência do pH na atividade da lipase de *P. africana*, variou-se o pH das soluções tampão utilizadas na hidrólise do óleo de oliva a fim de determinar o seu pH ótimo. As análises foram realizadas de acordo com Soares *et al.* (1999). Os tampões utilizados foram carbonato de sódio (pH 9), fosfato de sódio (pH 6, 7 e 8) e acetato de sódio (pH 4 e 5), todos a 100 mM a 37°C.

O efeito da temperatura na atividade hidrolítica foi avaliado variando-se a temperatura no intervalo de 25 a 80°C. As análises foram feitas de acordo com Soares *et al.* (1999), utilizando-se o óleo de oliva e tampão fosfato de sódio pH 7 100 mM (FERREIRA *et al.*, 2018; OLIVEIRA; SILVA; HIRATA, 2021).

4.6 Determinação da concentração de proteína

A determinação da quantidade de proteína presentes no caldo de cultivo bem como nas ressuspensões dos precipitados e sobrenadantes das etapas de precipitação foram realizadas de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando como padrão a albumina sérica bovina (BSA).

4.7 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática hidrolítica foi determinada pelo método descrito por Soares *et al.* (1999), através da hidrólise do óleo de oliva em emulsão preparada utilizando óleo de oliva, água destilada, na proporção 1:1, e 7% (m/V) de goma arábica como agente emulsificante.

O meio de reação continha 5 mL de emulsão, 4 mL de tampão fosfato pH 7 100 mM e 1 mL do caldo de cultivo, para enzimas livres, ou 5 mL de emulsão, 4,9 mL de tampão fosfato pH 7 100 mM e 0,1 g da lipase adsorvidas a resina (derivado). Como branco, utilizou-se 1 mL do meio de cultivo, para a enzima livre, ou 0,1 g da resina, para as enzimas adsorvidas.

O meio reacional foi incubado por 5 minutos, a 37°C e 200 rpm em um agitador orbital e a reação foi interrompida utilizando 10 mL de solução álcool-acetona, 1:1 (v/v). Os ácidos graxos foram titulados utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,02 M, na presença de fenolftaleína.

A atividade hidrolítica foi calculada pela equação XIV:

$$A (U/mL) = \frac{(V_a - V_b) \cdot 1000 \cdot M_{base}}{Tempo \cdot V_{amostra}} \quad (XIV)$$

Sendo: V_a é o volume (mL) de solução de NaOH titulado da amostra enzimática; V_b o volume (mL) de solução NaOH titulado do branco; M_{base} é a concentração molar (M) do hidróxido de sódio; Tempo é o tempo (min) de reação e $V_{amostra}$ é a quantidade de amostra utilizada, sendo 1 mL de enzima livre ou 0,1g de enzima imobilizada.

Uma unidade internacional U equivale a quantidade de enzima necessária para converter o substrato e liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto, nas condições experimentais.

4.8 Análise de eletroforese (SDS-PAGE)

A análise de SDS-PAGE foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). As análises foram realizadas utilizando gel de poliacrilamida 12%, e os géis foram revelados com Coomassie Brilliant Blue R-250. Foram utilizados como padrão seis marcadores moleculares na faixa de 14,4 a 97,4 kDa (Bio-Rad, USA) que correspondem as bandas observadas de lisozima, tripsina inibidora, anidrase carbônica, ovalbumina, BSA e fosforilase.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de lipases por *P. africana* nas condições realizadas possibilitou a produção de lipases extracelulares, conforme previamente relatado por Souza *et al.* (2018). O caldo de cultivo foi concentrado por liofilização atingindo a atividade na faixa de $19,53 \pm 0,44$ e $36,64 \pm 0,18$ U/mL e foi congelado à -5°C para ser utilizado nos ensaios posteriores.

5.1 Precipitação das lipases de *P. africana*

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos para a recuperação da atividade enzimática (relativa) diante dos diferentes solventes empregados no processo de purificação das lipases de *P. africana*. Os melhores resultados quanto à recuperação da atividade foram obtidos quando foram utilizados a acetona na temperatura de 10°C (69,80%) e o iso-propanol à 25°C (52,10%).

Tabela 1 – Atividade inicial do caldo, atividade do precipitado após a precipitação e a atividade relativa obtida para cada solvente a 10 e 25°C .

Solvente	Temp. 10°C			Temp. 25°C		
	AI (U)	AP _r (U)	ARR (%)	AI (U)	AP _r (U)	ARR (%)
Metanol	$39,06 \pm 0,90$	$1,89 \pm 0,47$	4,84	$39,06 \pm 0,90$	$1,08 \pm 0,03$	2,76
Etanol Absoluto	$48,42 \pm 0,50$	$15,30 \pm 1,53$	31,60	$48,42 \pm 0,5$	$11,79 \pm 1,82$	24,35
Iso-propanol	$64,76 \pm 0,99$	$29,39 \pm 0,18$	45,38	$64,76 \pm 0,99$	$33,74 \pm 2,10$	52,10
Acetona	$73,29 \pm 0,36$	$51,15 \pm 0,96$	69,80	$73,29 \pm 0,36$	$37,13 \pm 1,77$	50,66
Etanol 95%	$69,66 \pm 1,17$	$19,65 \pm 0,44$	28,21	$69,66 \pm 1,17$	$15,96 \pm 0,99$	22,92

Fonte: Autor.

Legenda: Temp. = Temperaturas; AI = Atividade inicial do caldo; AP_r = Atividade do precipitado; ARR = Atividade recuperada relativa.

Ao se adicionar solventes orgânicos ao caldo enzimático previamente liofilizado, as moléculas de água presentes no caldo, que antes estavam solvatando as proteínas, são mobilizadas e passam a interagir com o solvente. Dessa forma, as cargas superficiais das enzimas ficam disponíveis para interagirem umas com as

outras. Como consequência, há a formação de grandes aglomerados que precipitam devido ao seu grande peso molecular (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001).

Ferreira *et al.* (2018) observaram comportamento semelhante ao purificar a lipase de *G. candidum*. Ao se utilizar acetona a 0 °C no processo de purificação foi obtido o máximo rendimento para a atividade enzimática recuperada de 87,9 %.

A interação do solvente com as moléculas de água explica os resultados da recuperação em termos de proteínas (Tabela 2). Solventes altamente polares, como o metanol e o etanol absoluto, apresentaram melhor desempenho, precipitando 100% (10°C) e 97,52% (25 °C) de proteína, respectivamente, quando comparados com a acetona (73,07 e 62,44% de enzima precipitada para ensaios realizados à 10 e 25 °C, respectivamente), que apresenta uma menor polaridade.

Entretanto, as moléculas de água também se afastam das áreas internas, como do sítio ativo da enzima. Assim, as interações dentro da própria molécula podem levar à distorção da enzima e perda da sua estrutura tridimensional, levando a perda de sua atividade catalítica (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001), justificando assim, os baixos valores de atividade recuperada relativa encontrados para estes solventes (ver Tabela 1). Para a acetona, mesmo havendo um menor rendimento da precipitação das proteínas, de 73,07 e 62,44% para os ensaios realizados a 10 e 25 °C, respectivamente, ela foi capaz de manter uma maior atividade recuperada relativa das lipases (69,80 % para ensaios à 10 °C e de 50,66 % a 25 °C).

Tabela 2- Proteína inicial do caldo, proteína presente no precipitado após a precipitação e a proteína precipitada relativa obtida para cada um solvente a 10 e 25°C.

Solvente	Temp 10 °C			Temp 25 °C		
	PI (mg)	PP _r (mg)	PRR (%)	PI (mg)	PP _r (mg)	PRR (%)
Metanol	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01	100,00	0,33 ± 0,01	0,30 ± 0,01	91,85
Etanol Absoluto	0,33 ± 0,01	0,30 ± 0,01	90,08	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,01	97,52
Iso-propanol	0,33 ± 0,01	0,26 ± 0,01	79,45	0,33 ± 0,01	0,31 ± 0,01	92,56
Acetona	0,33 ± 0,01	0,24 ± 0,01	73,07	0,33 ± 0,01	0,21 ± 0,01	62,44
Etanol 95%	0,33 ± 0,01	0,29 ± 0,02	87,24	0,33 ± 0,01	0,25 ± 0,01	76,97

Fonte: Autor.

Legenda: Temp. = Temperaturas; PI = Proteína inicial do caldo; PP_r = Proteína do precipitado; PRR = Proteína recuperada relativa.

Ao se observar a recuperação obtida em termos de atividade específica (Tabela 3), foi verificado um melhor desempenho da acetona, chegando ao valor máximo de $211,34 \pm 0,05$ U/mg para o ensaio realizado a 10°C. A atividade específica demonstra o grau de pureza da enzima, uma vez que quanto maior a pureza atingida, maior será sua atividade específica, relacionando-se diretamente com o fator de purificação. (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001).

Tabela 3- Atividade específica inicial, atividade específica do precipitado após purificação com os solventes a 10 e 25°C e o fator de purificação.

Solvente	Temp 10 °C			Temp 25 °C		
	AEI (U/mg)	AEP (U/mg)	Fp	AEI (U/mg)	AEP (U/mg)	Fp
Metanol	117,91 ± 0,26	5,75 ± 0,27	0,05	117,91 ± 0,05	3,55 ± 0,05	0,03
Etanol Absoluto	146,17 ± 0,04	51,27 ± 0,13	0,35	146,17 ± 0,04	36,50 ± 0,18	0,25
Iso-propanol	195,50 ± 0,04	111,66 ± 0,04	0,57	195,50 ± 0,05	110,04 ± 0,09	0,56
Acetona	221,23 ± 0,04	211,34 ± 0,05	0,96	221,23 ± 0,4	179,50 ± 0,08	0,81
Etanol 95%	210,28 ± 0,05	68,00 ± 0,05	0,32	210,28 ± 0,5	62,61 ± 0,01	0,30

Fonte: Autor.

Legenda: Temp. = Temperatura; AEI = Atividade específica inicial; AEP = Atividade específica do precipitado; Fp= Fator de purificação.

Entretanto, apesar de apresentar um resultado superior, frente aos outros solventes, a acetona não foi capaz de levar a um aumento real da purificação das enzimas, com apenas uma etapa de purificação, uma vez que o fator de purificação obtido foi menor do que 1, indicando que a atividade específica do caldo de cultivo foi maior do que a presente após a precipitação com a acetona. Por esse motivo, uma segunda etapa de precipitação foi adicionada para os solventes acetona e iso-propanol, que foram os solventes que apresentaram maior atividade recuperada relativa (ver Tabela 1).

Assim, foram realizados novos ensaios para se verificar a eficiência de uma segunda precipitação com solventes orgânicos, utilizando diferentes proporções entre o sobrenadante resultante e a fase orgânica (1:3 e 1:2 v/v), para os solventes acetona e iso-propanol, que apresentaram melhor desempenho para a atividade recuperada relativa. A influência da temperatura, de 10 e de 25 °C, também foi avaliada para estes ensaios.

A Tabela 4 apresenta os resultados das duas precipitações obtidas utilizando a proporção 1:3 caldo: solvente (v/v), na primeira e segunda etapa de precipitação.

Tabela 4 - Recuperação da atividade enzimática e de proteína para a primeira e segunda etapa de precipitação, utilizando iso-propanol e acetona a 10 e 25 °C, 1:3 (v/v, caldo: solvente) para a primeira precipitação e 1:3 (v/v, sobrenadante: solvente) para a segunda precipitação.

Solvente	Temp 10 °C			Temp 25 °C		
	AI (U)	AP _r (U)	ARR (%)	AI (U)	AP _r (U)	ARR (%)
Iso-propanol	71,91 ± 1,54	70,11±3,4	97,50	57,97 ± 0,01	43,35 ± 2,6	74,78
Acetona	64,81 ± 0,42	62,67±2,0	96,70	70,79 ± 1,28	48,48 ± 1,2	68,48
	Temp 10 °C			Temp 25 °C		
	PI (mg)	PP _r (mg)	PRR (%)	PI (mg)	PP _r (mg)	PRR (%)
Iso-propanol	0,91 ± 0,01	0,91 ± 0,01	100,00	0,91 ± 0,01	0,85 ± 0,01	93,79
Acetona	0,91 ± 0,01	0,84 ± 0,01	93,07	0,91 ± 0,01	0,77 ± 0,01	84,48

Fonte: Autor.

Legenda: Temp. = Temperaturas; AI = Atividade inicial do caldo; AP_r = Atividade do precipitado; ARR = Atividade recuperada relativa; PI = Proteína inicial do caldo; PP_r = Proteína do precipitado; PRR = Proteína recuperada relativa.

A melhor recuperação em termos de atividade das lipases se deu utilizando os solventes a uma temperatura de 10°C (Tabela 4), observou-se que não houve uma grande perda na atividade, uma vez que a atividade recuperada relativa foi próxima a 100% para ambos os solventes. Quando são utilizados solventes a baixas temperaturas para a precipitação, a perda da atividade catalítica da enzima costuma diminuir, uma vez que os solventes penetram menos na molécula (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001). Já quando os solventes são utilizados em temperaturas mais elevadas, pode ocorrer uma perda da estrutura tridimensional da enzima, pelo rompimento das ligações químicas que a compõem, levando assim a perdas em sua atividade catalítica. (JANSON, 2011).

Já a recuperação de proteínas foi superior ao se utilizar o iso-propanol a 10°C, obtendo a precipitação total das lipases presentes no caldo de cultivo. Essa elevada precipitação levou ao aumento da atividade específica da enzima precipitada (Tabela 5) e, por consequência, o fator de purificação.

Observou-se que nessas condições, houve um aumento real da pureza da enzima, de forma a se obter um fator de purificação de $1,89 \pm 0,01$. A acetona

apresentou desempenho muito semelhante, apresentando fator de purificação de $1,88 \pm 0,01$.

Purificando a lipase de *Aspergillus niger* com solventes orgânicos, Preczeski *et al.* (2018) obtiveram o melhor desempenho utilizando a acetona, de forma que houve um aumento de quase 10 vezes em sua atividade específica, quando comparada com a atividade presente inicialmente no caldo de cultivo.

Tabela 5 – Atividade específica inicial, atividade específica do precipitado após duas etapas de purificação e o fator de purificação, utilizando iso-propanol e acetona a 10 e 25 °C, 1:3 (v/v, caldo: solvente) para a primeira precipitação e 1:3 (v/v, sobrenadante: solvente) para a segunda precipitação.

Solvente	Temp 10 °C			Temp 25 °C		
	AEI (U/mg)	AEP (U/mg)	Fp	AEI (U/mg)	AEP (U/mg)	Fp
Iso-propanol	$79,20 \pm 0,03$	$150,04 \pm 0,06$	$1,89 \pm 0,01$	$63,85 \pm 0,01$	$88,24 \pm 0,07$	$1,38 \pm 0,01$
Acetona	$71,39 \pm 0,02$	$134,20 \pm 0,04$	$1,88 \pm 0,01$	$77,98 \pm 0,03$	$100,68 \pm 0,04$	$1,29 \pm 0,01$

Fonte: Autor.

Legenda: Temp. =Temperatura; AEI = Atividade específica inicial; AEP = Atividade específica do precipitado; Fp= Fator de purificação.

Dando continuidade aos ensaios foi utilizado uma segunda etapa de precipitação com uma quantidade menor de solvente e 1:2 (v/v, sobrenadante: solvente). Também foram realizadas as mesmas análises a fim de se determinar a atividade enzimática e proteína recuperada relativas. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para a atividade enzimática e quantidade de proteínas recuperadas.

Tabela 6 - Recuperação da atividade enzimática e de proteína para a primeira e segunda etapa de precipitação, utilizando iso-propanol e acetona a 10 e 25 °C, 1:3 (v/v, caldo: solvente) para a primeira precipitação e 1:2 (v/v, sobrenadante: solvente) para a segunda precipitação.

Solvente	Temp 10 °C			Temp 25 °C		
	AI (U)	AP _r (U)	ARR (%)	AI (U)	AP _r (U)	ARR (%)
Iso-propanol	61,09 ± 0,34	45,81 ± 1,4	74,98	61,14 ± 1,02	44,20 ± 0,9	72,29
Acetona	61,39 ± 0,53	57,37 ± 0,8	93,45	66,06 ± 1,25	49,95 ± 3,2	75,61
	Temp 10 °C			Temp 25 °C		
	PI (mg)	PP _r (mg)	PRR (%)	PI (mg)	PP _r (mg)	PRR (%)
Iso-propanol	0,90 ± 0,01	0,90 ± 0,01	100,00	0,90 ± 0,01	0,80 ± 0,01	88,76
Acetona	0,90 ± 0,01	0,76 ± 0,01	84,71	0,90 ± 0,01	0,79 ± 0,01	87,46

Fonte: Autor.

Legenda: Temp. = Temperaturas; AI = Atividade inicial do caldo; AP_r = Atividade do precipitado; ARR = Atividade recuperada relativa; PI = Proteína inicial do caldo; PP_r = Proteína do precipitado; PRR = Proteína recuperada relativa.

O melhor desempenho ocorreu utilizando a acetona a 10°C, obtendo-se uma atividade recuperada relativa de 93,45%. Quando comparada com a atividade relativa recuperada para a acetona na mesma temperatura, na Tabela 4 (96,70 %), na qual utilizou-se uma quantidade maior de solvente, verificou-se que houve uma pequena queda na atividade recuperada (de 3,35 %), entretanto, essa queda na atividade relativa recuperada foi mais pronunciada, para o iso-propanol à 10°C. Quando se comparou o isopropanol, observou-se que para a condição de 1:3 (v/v, sobrenadante: solvente) à 10 °C, foi obtida a maior atividade recuperada relativa dentre todos os ensaios (97,50 %), mas ao se diminuir a quantidade de solvente, mantendo a temperatura em 10 °C, a atividade recuperada obtida também diminuiu para 74,98 %.

Para os ensaios com acetona realizados à 25°C, houve um aumento da atividade recuperada relativa em torno de 7 %, sendo obtido concomitantemente um aumento da quantidade de proteína recuperada (em torno de 3 %), justificando dessa forma, o incremento da atividade relativa encontrada nessa temperatura.

Tabela 7- Atividade específica inicial, atividade específica do precipitado após duas etapas de purificação e o fator de purificação, utilizando iso-propanol e acetona a 10 e 25 °C, 1:3 (v/v, caldo: solvente) para a primeira precipitação e 1:2 (v/v, sobrenadante: solvente) para a segunda precipitação.

Solvente	Temp. 10 °C			Temp. 25 °C		
	AEI (U/mg)	AEP (U/mg)	Fp	AEI (U/mg)	AEP (U/mg)	Fp
Iso-propanol	67,89 ± 0,45	79,90 ± 0,04	1,18 ± 0,01	68,05 ± 0,03	104,99 ± 0,03	1,54 ± 0,01
Acetona	68,33 ± 0,02	128,82 ± 0,02	1,89 ± 0,01	73,53 ± 0,03	103,48 ± 0,08	1,41 ± 0,01

Fonte: Autor.

Legenda: Temp. = Temperatura; AEI = Atividade específica inicial; AEP = Atividade específica do precipitado; Fp= Fator de purificação.

Em termos de fator de purificação (Tabela 7), a acetona foi o solvente mais eficiente obtendo $1,89 \pm 0,01$ para os ensaios realizados à 10°C, apresentando uma atividade específica de $128,82 \pm 0,02$ U/mg. O iso-propanol, à 10 °C apresentou uma menor atividade específica ($79,90 \pm 0,0$) e fator de purificação ($1,18 \pm 0,01$) quando comparado aos ensaios realizados à 25 °C, nos quais observou-se uma atividade específica de $104,99 \pm 0,03$ (similar a obtida para a acetona nesta mesma temperatura, $103,48 \pm 0,08$), e um fator de purificação de $1,54 \pm 0,01$.

Comparando os resultados obtidos, para os maiores valores de fator de purificação encontrados nos ensaios realizados, foi possível observar que para os ensaios com acetona à 10 °C, a utilização de uma maior quantidade de solvente durante o processo de purificação na segunda etapa de precipitação, não foi necessária e nem mais eficiente para se obter uma maior purificação das lipases.

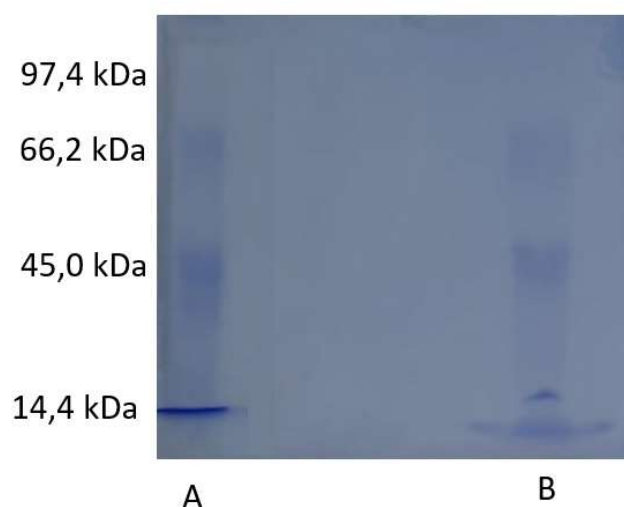
Verificou-se que ao utilizar a proporção de 1:3 (v/v) na segunda etapa à 10 °C, o fator de purificação para a acetona obtido foi de $1,88 \pm 0,01$ e utilizando-se 1:2 (v/v) na segunda etapa foi obtido $1,89 \pm 0,01$. Entretanto, para o iso-propanol, o melhor resultado foi obtido para os ensaios realizados à 10°C e na proporção de 1:3 (v/v) na segunda etapa de precipitação ($1,89 \pm 0,01$), pois ao se utilizar 1:2 (v/v) na segunda etapa foi obtido um menor fator de purificação de $1,18 \pm 0,01$.

Os resultados mostraram que a acetona apresentou um melhor desempenho dentre os solventes estudados para a purificação das lipases de *P. africana*, pois obteve um dos maiores valores de fator de purificação observados ($1,89 \pm 0,01$), uma das maiores atividades específicas obtidas do precipitado ($103,48 \pm 0,08$ U/mg), utilizando-se um menor volume de solvente na segunda etapa de precipitação (1:2 v/v).

5.1.1 Separação das lipases precipitadas

A Figura 8 mostra a análise realizada para o precipitado ressuspensado em tampão fosfato das duas etapas de precipitação reunidas, que foram obtidas no ensaio anterior.

Figura 8 - Análise via SDS – PAGE A) Marcador molecular; B) Precipitado reunido da primeira e segunda de precipitação com acetona.



Fonte: Autor.

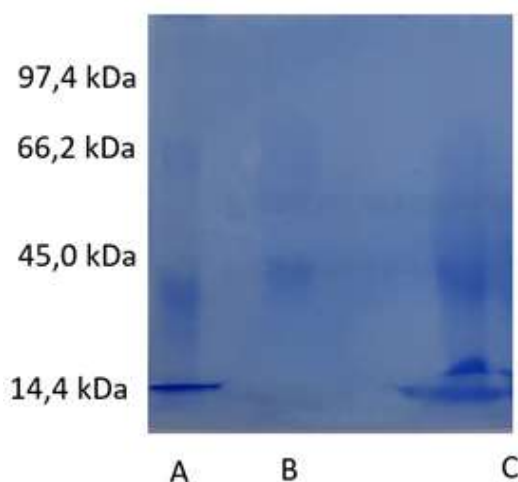
A análise de eletroforese mostrou que havia ao menos três bandas de proteínas, que foram precipitadas com a acetona após a primeira e segunda etapa de precipitação reunidas. Este resultado está de acordo com o obtido por Souza et al. (2018), que obtiveram o mesmo perfil e ainda os autores conseguiram separar a banda próxima a 66,2 kDa, confirmando que se tratava de uma lipase. Oliveira, Silva

e Hirata (2021) utilizando o *P. africana* e outro meio de cultivo, conseguiram produzir prioritariamente a lipase de menor massa molecular (14,4 kDa).

É comum que um único micro-organismo possa produzir múltiplas formas de lipase, que podem possuir características catalíticas, estabilidade e massa molecular distintos entre si (JACOBSEN *et al.*, 1989; SHIMADA *et al.*, 1992; LOTTI *et al.*, 1998). Dessa forma, novos ensaios foram realizados na tentativa de se separar a banda observada próxima de 45 kDa e verificar se realmente essa proteína era uma lipase.

O precipitado ressuspendido em tampão fosfato das duas etapas de precipitação reunidas (da etapa anterior), formou duas fases distintas quando colocado a 5°C por 24 h. A fase superior era líquida, enquanto a fase inferior voltou a formar um precipitado sólido, assim essas fases foram somente separadas e analisadas por eletroforese (Figura 9).

Figura 9 - Análise via SDS – PAGE A) Marcador molecular; B) Fase superior C) Fase inferior.



Fonte: Autor.

Na análise de eletroforese (Figura 9) é possível observar que a proteína de massa molecular intermediária se encontrava nas duas fases, inferior e superior. Como uma fase estava líquida (superior) e outra sólida (inferior), era possível que a fase sólida inferior contivesse um pouco da fase líquida superior e assim foi decidido usar uma centrífuga refrigerada a 4°C para separar com maior eficiência as duas fases e ainda lavar a fase inferior com tampão fosfato no intuito de retirar o máximo possível da fase superior. Foram realizadas duas lavagens seguidas de centrifugação

e remoção da fase superior. Para as fases superiores chamadas de R1 e R2 e foram realizadas análises de atividade, quantificação de proteína e de eletroforese.

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para a atividade hidrolítica, quantidade total de proteína, atividade específica e fator de purificação para cada uma das diferentes fases R1 e R2.

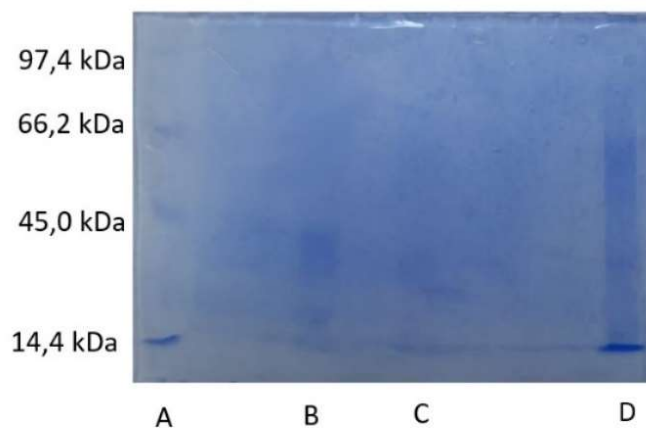
Tabela 8 – Atividade enzimática, proteína total, atividade específica e fator de purificação para cada uma das fases obtidas após centrifugação a 4°C.

Fases	Atividade (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
R1	104,79 ± 4,60	0,53 ± 0,03	198,90 ± 1,20	2,91 ± 0,08
R2	24,13 ± 1,82	0,26 ± 0,02	93,87 ± 0,89	1,37 ± 0,04

Fonte: Autor.

Após a centrifugação, também foi realizada a análise através de eletroforese, como mostra a Figura 10, para cada uma das fases obtidas.

Figura 10 – Análise via SDS – PAGE para as diferentes fases precipitadas: A) Marcadores moleculares; B) fase R1; C) fase R2; D) fase inferior



Fonte: Autor.

Foi observado que a maior parte das proteínas de massa molecular de 45 kDa ficaram na fase R1, que foi também a fase que apresentou maior atividade hidrolítica (104,79 ± 4,60 U), confirmado que se trata de uma lipase. Na fase R2, foi observado uma menor quantidade desta proteína e uma menor atividade hidrolítica também. Já

na fase inferior, a análise de eletroforese mostrou uma maior quantidade das outras lipases de 66,2 kDa e de 14,4 kDa.

A produção de uma outra lipase pelo mesmo fungo pode ser explicada pelo fato de que o meio de produção da enzima utilizado neste estudo foi um pouco diferente dos meios utilizados por Oliveira, Silva e Hirata (2021) e Souza *et al.* (2018).

A indução da produção de lipases diferentes no meio de fermentação parece ser viável, dependendo do meio e do tipo de indutor empregado, pois é comum que o micro-organismo possua carga genética para a produção de mais de um tipo de lipase (OBRADORS *et al.*, 1993).

Lotti *et al.* (1993) reportaram um comportamento similar para a produção de lipases pela *Candida rugosa*. Os autores sugerem que a fisiologia do crescimento pode afetar a síntese e a secreção da lipase (isoenzimas), afirmando que é altamente provável a existência de um padrão complexo de regulação que controla a expressão gênica, onde diferentes genes podem ser ligados e desligados de acordo com a composição do meio de fermentação, particularmente na presença de ácidos graxos, que são comprovadamente eficientes indutores na produção de lipases.

Assim, foi possível purificar a lipase obtida de massa molecular próxima a 45 kDa, obtendo-se um fator de purificação de $2,91 \pm 0,08$ após as etapas de precipitação com acetona e nova separação de fases do precipitado ressuspenso com centrifugação a 4°C.

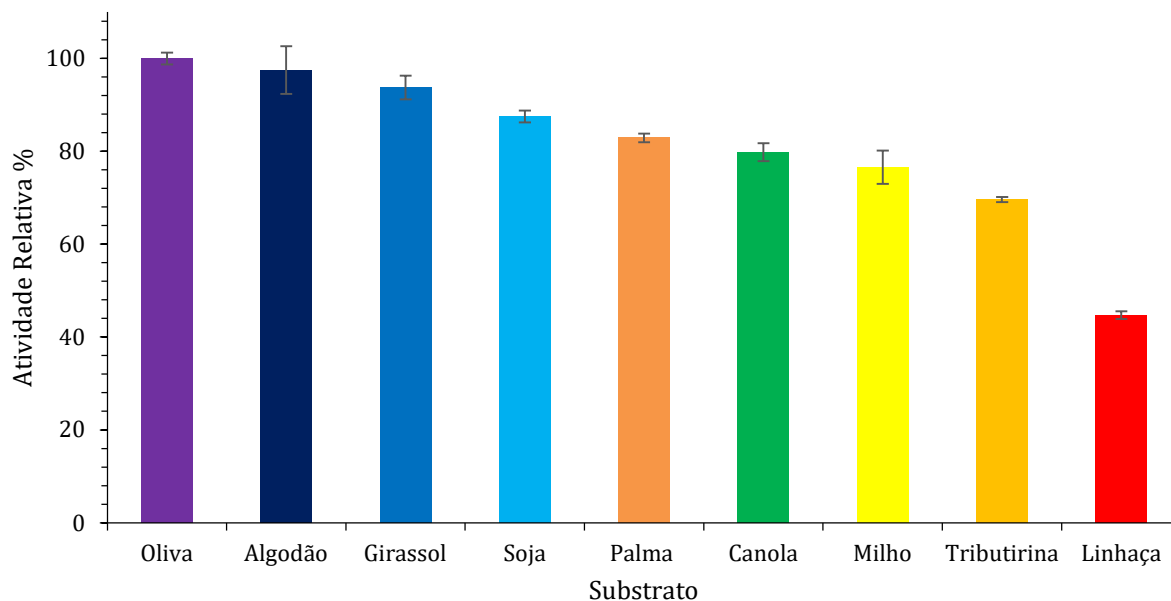
5.2 Caracterização da lipase de 45 kDa

Após a obtenção da enzima de massa molecular próximo a 45 kDa, foi possível realizar a sua caracterização quanto à especificidade da enzima ao substrato e pH e temperatura ótimos.

5.2.1 Especificidade ao substrato

Cada enzima possui uma especificidade a diferentes substratos. A Figura 11 mostra a atividade hidrolítica da lipase de massa molecular próxima de 45 kDa, em relação ao óleo de oliva, quando em um sistema contendo diferentes óleos vegetais e a tributirina. Os ensaios foram realizados a 37°C e pH 7, conforme Soares *et al.* (1999).

Figura 11 – Especificidade da lipase de *P. africana* frente a diferentes fontes de triglicerídeos.



Fonte: Autor.

A lipase purificada apresentou uma atividade hidrolítica maior quando em um meio contendo óleos vegetais ricos em triglicerídeos de longas cadeias carbônicas e poli-insaturados, como é o caso do óleo de oliva, algodão e girassol. Nestas condições, a atividade hidrolítica relativa ficou próxima a 100%.

Comportamento semelhante foi observado por Silveira, Tardioli e Farinas (2016) que estudaram a lipase de *Aspergillus niger* produzida via cultivo em estado sólido. Nas condições estudadas, a lipase apresentou maior atividade hidrolítica para os óleos de oliva, girassol e palma.

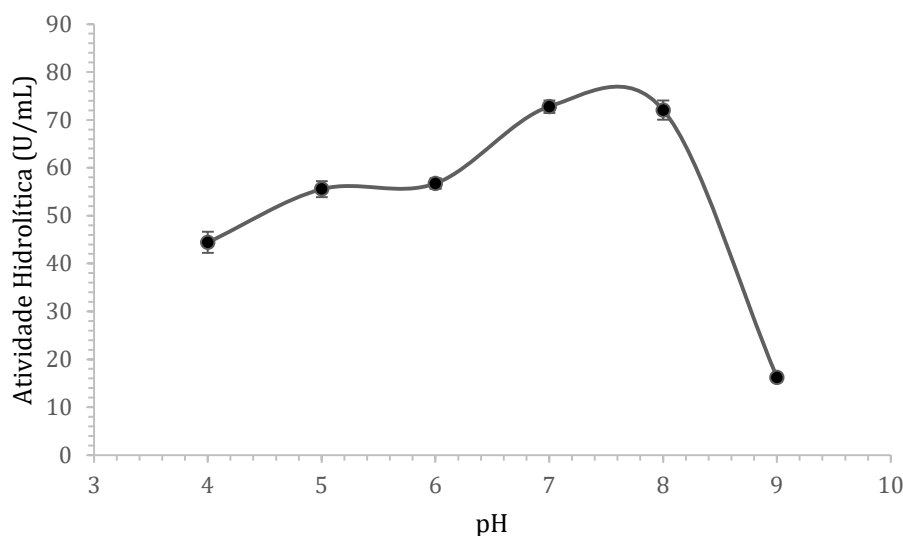
Esse comportamento também foi relatado por Ferreira *et al.* (2018) que, ao estudar a lipase de *G. candidum*, verificaram uma maior especificidade da enzima ao óleo de algodão, que possui um maior número de insaturações, quando comparado com os demais.

Oliveira, Silva e Hirata (2021) observaram que a lipase produzida pelo *P. africana* de tamanho de 14.4 kDa possui uma especificidade maior pelos óleos de girassol e de algodão, uma vez que possuíram uma atividade hidrolítica ainda maior do que a observada para o óleo de oliva.

5.2.2 Temperatura e pH ótimos

Para os ensaios de pH ótimo, foi fixada a temperatura de 37°C e utilizou-se o óleo de oliva como substrato em emulsão com goma arábica. A Figura 12 mostra a influência do pH na atividade hidrolítica da lipase de *P. africana*.

Figura 12 – Efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase de *P. africana*



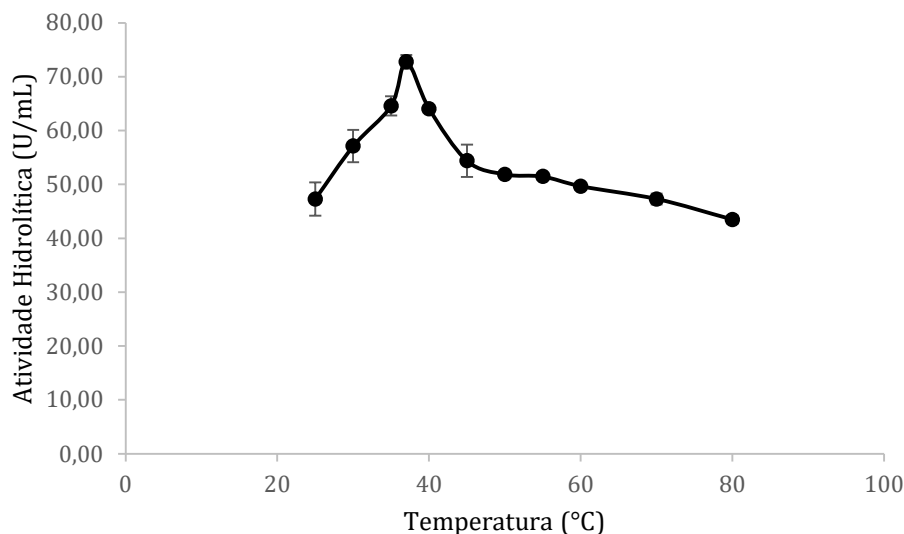
Fonte: Autor.

O pH ótimo desta enzima se encontra entre o pH 7 e 8 ($72,80 \pm 1,29$ - $72,07 \pm 1,61$ U/mL), uma vez que foi nessas condições que a máxima atividade hidrolítica foi obtida. Este resultado se encontra próximo ao observado por Ramos *et al.* (2015) que estudaram a lipase de *G. candidum* e observaram um pH ótimo de 8.

Entretanto Oliveira, Silva e Hirata (2021) observaram que a lipase de *P. africana* de 14,4 kDa possui um pH ótimo de 6, demonstrando uma capacidade de produzir lipases com diferentes características, ampliando a possibilidade de aplicação de suas enzimas.

A influência da temperatura na atividade da lipase está mostrada na Figura 13. Nestes ensaios, o pH foi fixado em 7 e a atividade foi realizada em emulsão de óleo de oliva, conforme Soares *et al.* (1999).

Figura 13 – Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase de *P. africana*



Fonte: Autor.

A temperatura ótima para a lipase de peso molecular próximo a 45 kDa é de 37 °C, atingindo nesta condição uma atividade hidrolítica de $72,80 \pm 1,29$ U/mL. Diferente do observado para a enzima de 14,4 kDa por Oliveira, Silva e Hirata (2021), em que não havia diferença significativa da atividade hidrolítica entre as temperaturas de 20 a 54°C.

Já a lipase produzida pelo *Bacillus altitudinis*, estudada por Nimkande, Sivanesan e Bafana (2023), proveniente do solo antártico, possui uma temperatura ótima muito semelhante, atingindo a atividade máxima a 40°C.

Dessa forma, a máxima atividade catalítica da lipase foi atingida utilizando as condições de temperatura à 37°C e pH 7, nessas circunstâncias, obteve-se uma atividade máxima de $72,80 \pm 1,29$ U/mL.

5.3 Imobilização da lipase de *Preussia africana* em resinas

Os ensaios a seguir foram realizados com o objetivo de se verificar a capacidade das resinas hidrofóbicas de imobilizar as lipases de *P. africana*, simultaneamente, a partir do caldo de cultivo liofilizado. A Tabela 9 mostra os parâmetros de imobilização obtidos.

Tabela 9- Parâmetros de imobilização da lipase de *P. africana* utilizando-se as resinas butil e octil-agarose.

Derivados	AO (U)	AD (U)	RI (%)	AH (U)	AR (%)
Butil-agarose	39,65 ± 0,05	10,78 ± 0,04	27,18	0,7 ± 0,01	6,49
Octil-agarose	39,65 ± 0,04	32,34 ± 0,30	81,56	1,5 ± 0,35	4,63

Fonte: Autor.

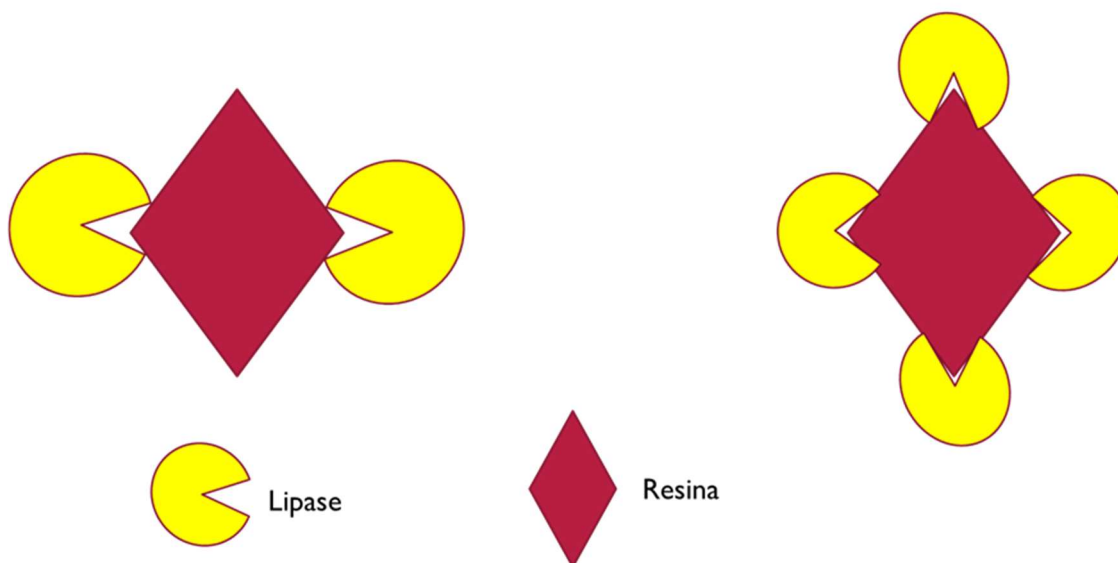
Legenda: AO= atividade oferecida; AD= atividade desaparecida; RI= rendimento de imobilização; AH= atividade hidrolítica do derivado, AR= atividade recuperada.

A quantidade de enzimas imobilizadas nas resinas, representada pelo rendimento de imobilização, foi maior para a octil-agarose (81,56 %) e assim, por apresentar uma maior quantidade de enzimas adsorvidas, também apresentou uma maior atividade hidrolítica ($1,5 \pm 0,35$ U), quando comparada com a resina butil-agarose.

Na imobilização via adsorção hidrofóbica, a interação entre as enzimas e as resinas ocorre por meio de interações hidrofóbicas. Assim, quanto maior for a hidrofobicidade da resina, espera-se que haja uma maior imobilização da lipase. Como esperado, o rendimento de imobilização foi maior para a octil-agarose, pois a resina apresenta maior hidrofobicidade, devido a um maior número de carbonos em sua composição (FERREIRA *et al.*, 2018).

Entretanto, a atividade enzimática recuperada foi maior na butil-agarose, apesar dessa resina ter imobilizado uma menor quantidade de enzimas por adsorção em sua superfície. Na imobilização por adsorção hidrofóbica, os sítios ativos das lipases interagem com as resinas, esse mecanismo é conhecido como ativação interfacial. Os centros ativos da lipase são orientados para as superfícies de suporte, assim, se o espaço resultante entre o suporte e o sítio ativo da enzima for pequeno, pode ocorrer que substratos de grande massa molecular como os triglicerídeos encontrem uma dificuldade de acessibilidade, como ilustrado na Figura 14.

Figura 14 - Representação da adsorção das lipases de *P. africana* em resinas hidrofóbicas



Fonte: Autor.

Além disso, a imobilização em baixo carregamento (10 mg de enzima/g de suporte) também poderia promover uma forte distorção na estrutura da lipase, justificando as baixas atividades obtidas por adsorção hidrofóbica para as resinas utilizadas. Quando comparada ao octil-agarose, a butil-agarose possui uma menor hidrofobicidade, levando a uma maior atividade recuperada (FERREIRA *et al.*, 2018; CAMBRAIA *et al.*, 2022).

Ferreira *et al.* (2018), quando imobilizaram as lipases de *G. candidum* em octil-agarose via adsorção hidrofóbica, também obteve um baixo desempenho catalítico, atingindo 3,2% de atividade recuperada. Nas condições de máxima eficiência, utilizando MANAE-agarose e imobilizando via adsorção iônica, o máximo de atividade recuperada obtida foi de 62,7%.

Brabcová *et al.* (2013), ao purificar lipases de *G. candidum* utilizando a octil-agarose, nas mesmas condições, observaram que 76,0 % das enzimas se adsorviam ao suporte sólido. Quando esse resultado foi comparado ao obtido utilizando-se diferentes suportes, também foi observado que o suporte mais hidrofóbico, a octil-agarose, foi mais eficiente.

5.3.1 Imobilização da lipase de massa molecular próxima a 45 kDa

De forma análoga, foram realizados ensaios de imobilização somente para a fase R1, obtida após a centrifugação da enzima purificada, na qual foi encontrada uma maior quantidade da lipase de massa molecular próxima a 45 kDa. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos para os parâmetros de imobilização.

Tabela 10- Parâmetros de imobilização da lipase de *P. africana* presente na fase R1 utilizando-se as resinas butil e octil-agarose.

Derivados	AO (U)	AD (U)	RI (%)	AH (U)	AR (%)
Butil-agarose	186,72 ± 0,05	7,27 ± 0,11	3,89	0,24 ± 0,01	3,30
Octil-agarose	181,27 ± 0,02	61,51 ± 0,07	33,94	0,31 ± 0,04	0,50

Fonte: Autor.

Legenda: AO= atividade oferecida; AD= atividade desaparecida; RI= rendimento de imobilização; AH= atividade hidrolítica do derivado, AR= atividade recuperada.

O maior rendimento de imobilização também foi observado para a octil-agarose, atingindo um valor próximo a 34%, entretanto a atividade recuperada obtida (0,50 %) foi inferior ao observado para a butil agarose, acredita-se que a explicação disso seja a mesma já discutida no tópico anterior.

6 CONCLUSÕES

O uso de solventes orgânicos em apenas um estágio de purificação não é suficiente para que haja uma purificação efetiva das lipases de *P. africana*. Apesar disso, os solventes iso-propanol e acetona apresentaram os melhores desempenhos, sendo escolhidos para estudos posteriores.

Após duas etapas de precipitação, o iso-propanol foi capaz de precipitar toda a proteína presente no caldo de cultivo, quando utilizado a 10 °C, tanto na proporção 1:3 (v/v) quanto na 1:2 (v/v), na segunda etapa de purificação. Entretanto, nesta última situação, houve uma maior perda na atividade catalítica das enzimas precipitadas.

Ao utilizar a proporção de 1:3 (v/v) caldo: solvente na segunda etapa, tanto o iso-propanol quanto a acetona, ambos a 10°C, foram eficientes na precipitação das lipases de *P. africana*, atingindo um fator de purificação de $1,88 \pm 0,01$.

A utilização de acetona a 10°C se mostrou a estratégia mais eficiente, uma vez que, mesmo utilizando menores quantidades desse solvente (proporção 1:2 v/v), ela foi capaz de obter um fator de purificação de $1,89 \pm 0,01$.

Após a etapa de purificação com solvente, a etapa adicional de centrifugação a 4°C foi capaz de isolar somente uma enzima, possuindo massa molecular de aproximadamente 45 kDa, atingindo a atividade de $72,80 \pm 1,29$ U/mL e um fator de purificação de $2,91 \pm 0,08$. Ao caracterizar esta enzima, observou-se que a maior atividade hidrolítica foi expressa utilizando-se óleo de oliva, e na temperatura de 37°C e pH 7.

A resina octil-agarose foi utilizada para imobilizar as lipases de *P. africana*, entretanto, apesar de ter sido observado uma alta taxa de imobilização (81,56 %), as enzimas não expressaram a mesma atividade após a imobilização, obtendo-se uma atividade recuperada de apenas 4,63%.

De forma semelhante, a butil-agarose, apesar de expressar 6,49% da atividade recuperada, não apresentou uma alta taxa de imobilização das lipases em sua superfície, obtendo um rendimento de imobilização de apenas 27,18 %.

A imobilização somente da enzima de tamanho próximo a 45 kDa em butil e octil-agarose apresentou um rendimento de imobilização de 3,89 e de 33,94%, respectivamente, entretanto a atividade recuperada para ambas as resinas foi pequena (3,30 e 0,50 %), sugerindo-se que, em estudos futuros, novas resinas sejam estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Francisco Lucas *et al.* Trends in lipase immobilization: bibliometric review and patent analysis. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 110, p. 37-51, Nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2021.07.005>.

AMEEN, Fuad *et al.* Isolation, identification and bioactivity analysis of an endophytic fungus isolated from Aloe vera collected from Asir desert, Saudi Arabia. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.l.], v. 44, n. 6, p. 1063-1070, Jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-020-02507-1>.

ARENAL, Francisco; PLATAS, Gonzalo; PELÁEZ, Fernando. Two new *Preussia* species defined based on morphological and molecular evidence. **Fungal Diversity**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 1-15, Sept. 2005.

ATTIQUE, Syed Awais *et al.* Enzyme immobilization approaches. **Biocatalyst Immobilization**, [S.l.], p. 37-54, Dec. 2023. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-91317-1.00007-4>.

BHARATHI, Devaraj; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: an overview of screening, production and purification. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.l.], v. 22, p. 101368, Nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>.

BRABCOVÁ, Jana *et al.* Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.l.], v. 98, p. 62-72, Dec. 2013. Elsevier BV.

BRADFORD, Marion. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athens, v. 72, n. 1, p. 248-254, Jan. 1976.

BRUM, Maria Cristina *et al.* Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. **Genetics And Molecular Research**, [S.l.], v. 11, n. 4, p. 4187-4197, 2012. Dec. 2012. <http://dx.doi.org/10.4238/2012.december.6.2>.

CAMBRAIA, Marcus *et al.* Process optimization for enzymatic production of a valuable biomass-based ester from levulinic acid. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.l.], v. 46, n. 1, p. 53-67, 21 Nov. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-022-02813-w>.

CAVALCANTE, Francisco Thálysson *et al.* Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, [S.l.], v. 288, p. 119577, Mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119577>.

COSTA, Matheus *et al.* Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. **Chemical Engineering And Processing - Process Intensification**, [S.I.], v. 157, p. 108131, Nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2020.108131>.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. DA G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

ENEVA, Romyana *et al.* Safe sialidase production by the saprophyte *Oerskovia paurometabola*: gene sequence and enzyme purification. **Molecules**, [S.I.], v. 27, n. 24, p. 8922, 15 Dec. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27248922>.

FERREIRA, Matheus *et al.* Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, [S.I.], v. 67, p. 55-63, Apr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.028>.

GURKOK, Sumeyra; OZDAL, Murat. Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. **Protein Expression And Purification**, [S.I.], v. 180, p. 105819, Apr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2021.105819>.

HAGE, David; CARR, James. **Química analítica e análise quantitativa**. São Paulo: Pearson, 2013. p.736

ISMAIL, Abdallah; BAEK, Kwang-Hyun. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: present and future aspects. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 163, p. 1624-1639, Nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.021>.

JACOBSEN, Tomas *et al.* Production, partial purification, and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.I.], v. 11, n. 2, p. 90-95, Feb. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90066-5](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(89)90066-5)

JANSON, J. C. **Protein purification: principles, high resolution methods and applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011.

KAR, Supratik *et al.* Green Chemistry in the synthesis of pharmaceuticals. **Chemical Reviews**, [S.I.], v. 122, n. 3, p. 3637-3710, Dec. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00631>.

KILIKIAN, Beatriz Vahan; PESSOA JUNIOR, Adalberto. Purificação de produtos biotecnológicos. *In*: SCHMIDELL, Willibaldo *et al.* (comp.). **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Blucher, 2001. p. 493-522.

LAEMMLI, Ulrich. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Dec. 1970.

LIU, Shuai *et al.* Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 190, p. 396-408, Nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.006>.

LOTTI, Marina *et al.* Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. **Chemistry And Physics Of Lipids**, [S.l.], v. 93, n. 1-2, p. 143-148, June. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-3084\(98\)00038-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-3084(98)00038-3).

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

MENEGOTTO, Anne Luize *et al.* Protein purification of *Arthrospira platensis* using aqueous two-phase system composed of polyethylene glycol and potassium phosphate/sodium citrate. **Journal Of Applied Phycology**, [S.l.], v. 34, n. 1, p. 311-320, Dec. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-021-02652-4>.

MONTEIRO, Rodolpho *et al.* Biotechnological relevance of the lipase a from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, [S.l.], v. 362, p. 141-154, Feb. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.026>.

NAZARIO, Carlos Eduardo Domingues; LANÇAS, Fernando Mauro. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. **Scientia Chromatographica**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 111-135, nov. 2013. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2013.009>

NIMKANDE, Vijay; SIVANESAN, Saravanadevi; BAFANA, Amit. Screening, identification, and characterization of lipase-producing halotolerant *Bacillus altitudinis* Ant19 from Antarctic soil. **Archives Of Microbiology**, [S.l.], v. 205, n. 4, 11 Mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-023-03453-8>.

OBRADORS, Núria *et al.* Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 15, n. 4, p. 357-360, Apr. 1993. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00128276>.

OLIVEIRA, Gustavo F.; SILVA, Milena R. L.; HIRATA, Daniela. Production of new lipase from *Preussia africana* and partial characterization. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [S.l.], v. 52, n. 8, p. 942-949, 19 Dec. 2021. Informa UK Limited.

OTA, Yasuhide; SAWAMOTO, Takeshi; HASUO, Masaki. Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [S.l.], v. 64, n. 11, p. 2497-2499, Jan. 2000.

PACHECO, Sidney *et al.* History of liquid chromatography. **Revista Virtual de Química**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 1225-1271, dez. 2015. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20150069>.

PARK, Jun-Young; PARK, Kyung-Min. Lipase and its unique selectivity: a mini-review. **Journal Of Chemistry**, [S.l.], v. 2022, p. 1-11, Oct. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/7609019>

PEREIRA, Adejanildo *et al.* Lipases as effective green biocatalysts for phytosterol esters' production: a review. **Catalysts**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 88, Jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/catal12010088>.

PODREPŁEK, Gordana Hojnik; KNEZ, Željko; LEITGEB, Maja. Activation of cellulase cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in scCO₂. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.l.], v. 154, p. 104629, Dec. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104629>.

PRECZESKI, Karina Paula *et al.* *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. as keratinase producers using swine hair from agroindustrial residues. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.l.], v. 8, n. 1, Feb. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.00071>.

PRECZESKI, Karina *et al.* Efficient and low-cost alternative of lipase concentration aiming at the application in the treatment of waste cooking oils. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.l.], v. 41, n. 6, p. 851-857, Mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-018-1919-y>.

RAMOS, Eliza *et al.* Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, 89 p. 43–51, Aug. 2015.

SANTOS, Luís Fernando *et al.* Decyl oleate production by enzymatic esterification using *Geotrichum candidum* lipase immobilized on a support prepared from rice husk. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.l.], v. 36, p. 102142, Sept. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102142>.

SAMPAIO, Camila *et al.* Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: problems and prospects: a review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 215, p. 434-449, Aug. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139>

SEDDOUK, Loubna *et al.* Isolation and characterization of a mesophilic cellulolytic endophyte *Preussia africana* from *Juniperus oxycedrus*. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.l.], v. 29, n. 30, p. 45589-45600, Feb. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-022-19151-9>.

SHIMADA, Yuji *et al.* Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. **Journal Of Fermentation And Bioengineering**, [S.l.], v. 74, n. 2, p. 77-80, Jan. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338x\(92\)80004-3](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338x(92)80004-3).

SILVEIRA, Erick ; TARDIOLI, Paulo ; FARINAS, Cristiane . Valorization of palm oil industrial waste as feedstock for lipase production. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.l.], v. 179, n. 4, p. 558-571, Feb. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2013-z>.

SOARES, Cleide *et al.* Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77–79, p. 745–757, Mar. 1999.

SOUZA, Isabela *et al.* Isolation and screening of extracellular lipase-producing endophytic fungi from *Handroanthus impetiginosus*. **Asian Journal Of Biotechnology And Bioresource Technology**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 1-10, Aug. 2018. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/ajb2t/2018/43014>.