

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS ISOLADOS DE
AMOSTRAS DE SOLO DA FLORESTA AMAZÔNICA

PATRÍCIA MOTA DA SILVA

MANAUS
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PATRÍCIA MOTA DA SILVA

PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS ISOLADOS DE
AMOSTRAS DE SOLO DA FLORESTA AMAZÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS
2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Silva, Patrícia Mota
D111p Produção de lipases por fungos isolados de
amostras de solo da Floresta Amazônica / Patrícia
Mota da Silva. 2015
68 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Vicente Braga de Souza
Coorientador: Emerson Silva Lima
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. bioprospecção. 2. bioativos. 3. fungos amazônicos. 4.
enzimas.
5. pigmentos. I. Souza, João Vicente Braga de
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLO DA FLORESTA AMAZÔNICA

PATRÍCIA MOTA DA SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos farmacêuticos. Linha de pesquisa: desenvolvimento, avaliação da qualidade e da utilização de insumos e produtos farmacêuticos e cosméticos. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Profª. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

Profª. Dra. Alita Moura de Lima
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Patrícia Mota da Silva
Aluna de mestrado do PPGCF - UFAM

Manaus, 31 de agosto de 2015

*Àquele que está assentado no trono e
ao Cordeiro sejam o louvor, a honra, a
glória e o poder para todo o sempre.*

(Apocalipse 5:13)

AGRADECIMENTOS

Àquele que me livrou do laço do passarinho; o meu refúgio e minha fortaleza, que me permitiu viver, e sobreviver, para amar e cuidar do meu filho, João Pedro.

Agradeço também à Deus, por sua infinita misericórdia cuidando da vida, da caminhada, do discernimento, da compaixão e do companheirismo daquele que, sem, não seria possível colocar uma única vírgula neste trabalho, Dr. João Vicente Braga de Souza. Obrigada pelas horas em que ofereceu os ouvidos para o que fugia do contexto deste trabalho e pelos momentos de descontração. Estendo esse agradecimento a todos que estão debaixo de sua tutela no Laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, que colaboraram de forma direta (Bia, Thaís e Diego) ou indireta, oferecendo amizade, companheirismo, força e muita fé.

Aos técnicos e servidores do INPA, pela ajuda e amizade.

Àquele que foi a força, a luta, a persistência e o convencimento, sendo inclusive minha voz, impulsionando-me nos momentos de fraqueza: Prof Dr. Emerson Silva Lima.

Agradeço também aos integrantes do Grupo Biophar, em especial à Patrícia Danielle, Ana Paula e Leonard, por toda colaboração e incentivo.

À FAPEAM, pela concessão da bolsa de estudo e à NATURA pelo investimento e apoio.

Faço um agradecimento, em especial, à Ana Cláudia Cortez. Chorou comigo, riu de mim e pra mim, me deu colo, conselhos e, principalmente, sua amizade.

Ao meu companheiro, André Iannuzzi, pela amizade, conselhos, amor, carinho e proteção dedicados de maneira tão intensa e, assim, conseguir sempre me fazer acreditar em mim.

Que Deus prolongue os dias de todos vocês.

RESUMO

Lipases microbianas têm um grande potencial para aplicações industriais, inclusive para indústria de cosméticos. Frente a grande diversidade de micro-organismos da floresta amazônica, pode-se afirmar que poucos trabalhos de bioprospecção de fungos produtores de lipases foram realizados. Este trabalho teve como objetivo investigar a produção de lipases por fungos isolados de amostras de solo da floresta amazônica. Foram coletadas amostras na Reserva Florestal Adolpho Ducke. Os fungos foram isolados, purificados e identificados (macro e micromorfológicamente). Foram selecionados fungos produtores de lipase pela capacidade desses em hidrolisar o pNPP (p-nitrofenilpalmitato). Foram realizados experimentos univariados com a finalidade de investigar a influência das variáveis de bioprocessamento na produção de lipases pelo isolado selecionado *Fusarium* INPA 4. Foi investigada também a temperatura e pH ótimos das lipases de *Fusarium* INPA 4 e uma análise preliminar quanto a citotoxicidade do caldo de cultivo deste fungo. Como resultados observou-se que: foram obtidos 100 isolados e os três gêneros fúngicos mais frequentes foram *Aspergillus* (41%), *Penicillium* (34%) e *Trichoderma* (13%). Os isolados destacados na produção de lipases foram: *Penicillium* INPA83, *Fusarium* INPA 4, *Paecilomyces* INPA 53 e *Aspergillus* INPA 59. Os níveis dos fatores mais adequados para produção das lipases pelo *Fusarium* INPA 4 foram 15 g/L de óleo de soja, 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5, relação entre meio de cultura e vidraria de 1/5, inóculo inicial de 10^5 cell/mL, agitação orbital de 100 rpm e o tempo de 72 h. Na determinação do pH e temperatura ótimos, a lipase do *Fusarium* INPA 4 foi mais ativa na faixa de pH entre 7,0-9,0 e na faixa de temperatura de 20°C a 30°C. O caldo de cultivo do *Fusarium* INPA 4 não apresentou citotoxicidade a partir da terceira diluição, tendo uma viabilidade acima de 100%. O *Fusarium* INPA 4 se mostrou um bom produtor de lipase, podendo ser uma fonte dessa enzima para futuras aplicações industriais, mas para isso, torna-se necessário um estudo complementar para que o melhor potencial biotecnológico da enzima e seu produtor sejam explorados.

Palavras-chave: bioprospecção, bioativos, fungos amazônicos, enzimas, pigmentos

ABSTRACT

Microbial lipases have a great potential for industrial applications, including cosmetic industry. Forward the great diversity of the Amazon forest micro-organisms, it can be said that few bioprospecting work of producing lipases fungi were performed. This study aimed to investigate lipase production by fungi isolated from soil samples of the Amazon rainforest. Samples were collected in Reserva Florestal Adolpho Ducke. The fungi were isolated, purified and identified (macro and micromorphologically). Lipase producing fungi were selected by the ability of those in hydrolyzing pNPP (p-nitrophenylpalmitate). Univariate experiments were conducted in order to investigate the influence of bioprocess variables in the production of lipase-selected isolated Fusarium INPA 4. It was also investigated the optimum temperature and pH of Fusarium lipases INPA 4:01 preliminary analysis as the cytotoxicity of broth cultivation of the fungus. The results revealed that: 100 isolates were obtained and the three most common genera of fungi were *Aspergillus* (41%), *Penicillium* (34%) and *Trichoderma* (13%). The isolated highlighted on lipase production were INPA83 *Penicillium*, *Fusarium* INPA 4, *Paecilomyces* *Aspergillus* INPA INPA 53 and 59. The levels of the most appropriate factors for production of the *Fusarium* lipases INPA 4 were 15 g / L Soy oil 1 g / L (NH₄)₂SO₄, pH 5, the relationship between the culture medium and glassware 1/5, initial inoculum of 10⁵ cell / ml, orbital stirring of 100 rpm and a time of 72 h. Na determination of pH and temperature optimum the lipase of *Fusarium* INPA 4 was more active in the pH range of 7.0-9.0 and temperature range of -20°C to 30°C. The cultivation broth of *Fusarium* INPA 4 showed no cytotoxicity from the third dilution having a viability above 100%. The *Fusarium* INPA 4 showed a good lipase producer, may be a source of this enzyme for future industrial applications, but for this, it is necessary an additional study for the best biotech enzyme potential and his producer are exploited.

Keywords: bioprospecting, bioactive, Amazonian fungi, enzymes, pigments

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxo das atividades do presente projeto que teve como objetivo verificar a produção de lipases de interesse da indústria de cosméticos produzidas por fungos isolados de amostras de solo da floresta Amazônica	31
Figura 2	Localização da Reserva Ducke (RFAD) próxima à cidade de Manaus/AM.	32
Figura 3	Número de isolados fúngicos obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke (Manaus-AM) distribuídos por genero identificado.	37
Figura 4	Número de isolados fúngicos (obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke-Manaus-AM) distribuídos pela capacidade de produzir lipases (UI/L) em cultivo submerso. Atividades: <2 UI/L fraco produtor; 2-3,9 UI/L fraco produtor; 4-5,9 produtor ;6-7,9 bom produtor e >8 forte produtor.	38
Figura 5	Influência do fator concentração de óleo de soja na produção de lipases pelo isolado <i>Fusarium</i> INPA 4.	40
Figura 6	Influência do fator $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produção de lipases pelo isolado <i>Fusarium</i> INPA 4. A melhor concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi a de 1 g/L.	40
Figura 7	Influência do pH inicial do meio de cultivo na produção de lipases pelo isolado <i>Fusarium</i> INPA 4	41
Figura 8	Influência do fator razão volume de meio de cultura e volume do erlemeyer na produção de lipases pelo isolado <i>Fusarium</i> INPA 4.	41
Figura 9	Influência do inóculo inicial na produção de lipases pelo isolado <i>Fusarium</i> INPA 4.	42
Figura 10	Influência da agitação orbital na produção de lipases pelo isolado <i>Fusarium</i> INPA 4.	42
Figura 11	Influência do tempo na produção de lipases por <i>Fusarium</i> INPA 4.	43

Figura 12	Cinética de 120hs da produção de lipases de três isolados fúngicos (obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke-Manaus-AM) destacados na produção de lipase.	43
Figura 13	Efeito do pH na atividade e estabilidade da lipase.	44
Figura 14	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da lipase	45
Figura 15	Viabilidade celular em macrófagos murinos linhagem J774 do caldo fermentado em 96 horas de <i>Fusarium</i> INPA 4 no ensaio colorimétrico com Alamar Blue®.	45
Figura 16	Viabilidade celular em macrófagos murinos linhagem J774 do caldo fermentado em 120 horas de <i>Fusarium</i> INPA 4 no ensaio colorimétrico com Alamar Blue®.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade de lipase (UI/L) produzida em meio submerso pelos 10 isolados (obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke-Manaus-AM) destacados na produção de lipase.	39
-----------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	O solo como micro-habitat	15
2.2	Fungos isolados de solo produtores de bioativos	16
2.3	Bioativos de interesse para a indústria de cosméticos	19
2.4	Enzimas de Interesse Cosmético	22
2.5	Lipases	25
3	OBJETIVOS	30
3.1	GERAL	30
3.2	ESPECIFICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	AMOSTRAS DE SOLO	33
4.2	PROCEDIMENTOS	34
4.2.1	Isolamento dos microrganismos das amostras de solo	34
4.2.2	Influência dos fatores de bioprocessamento na produção DE LIPASES	35
4.2.3	Quantificação das lipases	34
4.2.4	Influência dos fatores de bioprocessamento na produção de lipases	34
4.2.5	Determinação do pH e temperatura ótimos da lipase produzida	35
4.2.6	Ensaio de viabilidade celular	35
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Identificação de fungos cultiváveis presentes em amostras de solo da região amazônica	37
5.2	Estudo da produção de lipases pelos fungos isolados das amostras de solo	38
5.3	Avaliação a influência dos fatores de bioprocessamento na produção de lipases pelo Fusarium INPA 4	39
5.4	Influência do pH e da temperatura na atividade das lipases produzidas por Fusarium INPA	44
5.5	Citotoxicidade do caldos oriundos do bioprocessamento para produção de lipases com Fusarium INPA 4	45

5.6 DISCUSSÃO.....	47
6 CONCLUSÃO.....	54
7 REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICE A.....	64

1 INTRODUÇÃO

As lipases são biocatalisadores que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e alcoóis orgânicos. Elas são capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito (BON *et al.*, 2008; CARVALHO; CONTESINI, 2005). As lipases se destacam por suas múltiplas aplicações, sendo utilizadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos (panificação, queijos, chás), têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (JAEGER; REETZ, 1998; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Atualmente, grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias brasileiras é importada. Isso pode ser mudado, pois o Brasil possui uma grande biodiversidade de microrganismos que poderiam ser utilizados para a produção dessas enzimas (FERNANDES, 2009). A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de micro-organismos, de plantas ou células animais representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial (JAEGER, 1994). Os micro-organismos, neste caso, são de particular interesse devido ao curto período de geração, à grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas (VULFSON, 1994).

As lipases podem ser comumente encontradas na natureza e são obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Numerosas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são produtoras de lipases. (CASTRO *et al.*, 2004; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; COLEN, 2006; HASAN *et al.*, 2006; VARGAS *et al.*, 2008; CONTESINI *et al.*, 2009). Entre as fontes, as microbianas são as mais utilizadas e, na sua grande maioria, não são nocivas a saúde humana, sendo reconhecidas como

“Generally Regarded as Safe – GRAS” (JAEGER, 1994). Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação, além de terem rendimento de produção elevado, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular devido à ausência de sazonalidade (HASAN et al, 2006).

A Floresta Amazônica possui a maior diversidade de flora e fauna entre as florestas existentes, o que se reflete na diversidade microbiana. No entanto, pouco se conhece do potencial econômico-biotecnológico dos seus micro-organismos. A indústria de cosméticos pode se tornar mais competitiva e elaborar novos produtos a partir do uso de metabólitos de micro-organismos da floresta, tornando-os mais atrativos em relação à atividade e ao apelo de uso sustentável das florestas e das tecnologias sociais.

O interesse na utilização de enzimas em formulações cosméticas, como as lipases, que hidrolisam os lipídios reduzindo nódulos e facilitando sua eliminação do organismo, podendo ser utilizadas para tratamento de celulite, por exemplo, tem aumentado muito em função do melhor conhecimento da fisiologia cutânea, da evolução no desenvolvimento de novos veículos e dos avanços na área de biotecnologia (BON *et al.*, 2008; DELGADO, 2007).

O grande número de artigos publicados com o estudo de lipases de origem microbiana demonstram a importância dessa enzima. Ao longo dos últimos anos, observa-se um aumento progressivo no número de publicações relacionadas com aplicações industriais de lipases, no entanto são ausentes estudos com uso de lipase originada de micro-organismos da floresta amazônica. Buscando dar proveito aos recursos disponíveis, este trabalho teve por objetivo verificar a produção de lipases de

interesse da indústria de cosméticos por fungos isolados de amostras de solo da floresta Amazônica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O solo como micro-habitat

O solo é o resultado da combinação de matéria orgânica e mineral inconsolidados que fornece habitats para uma ampla variedade de organismos no qual interagem. Os micro-organismos adaptam-se a esses micro-habitats e formam consórcios, interagindo entre si e com outras partes da biota do solo (TORSVIK; OVERAS, 2002).

Em todos os ecossistemas do planeta, assim como em ambientes agrícolas, os micro-organismos são peças fundamentais na ciclagem de nutrientes, os disponibilizando para as plantas. Eles degradam moléculas complexas presentes no solo, como tecidos de plantas, animais, e até mesmo pesticidas e outros xenobióticos (GADD, 2007). Portanto, a população microbiana do solo é essencial para a manutenção dos ecossistemas terrestres, pois é responsável por seu envolvimento na dinâmica da matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O solo da floresta Amazônica, assim como outros solos, são habitats pouco explorados e com grande possibilidade de se encontrar novas espécies microbianas. Nas florestas tropicais a riqueza do solo normalmente está concentrada na camada superficial, devido ao depósito de resíduos vegetais, que são parcialmente decompostos e incorporados pelos micro-organismos. Havendo disponibilidade de água essa decomposição gera matéria orgânica que retém nutrientes e que posteriormente são liberados lentamente para outros micro-organismos do solo (BORNEMAN; TRIPLETTI, 1997; MOUTINHO, 2002).

Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial (LEWINSONHN, 2002). E dentro do território nacional, a Amazônia se apresenta com uma região tropical imensa, com alta diversidade biológica, com um grande número de plantas, animais e micro-organismos pouco conhecidos, e com muita água, existindo forte interação da floresta com a atmosfera, rios e lagos (DAVIDSON; ARTAXO, 2004; CALDERON et al., 2009). A floresta tropical densa de terra firme, que cobre a maior parte da região e que se situa predominantemente sobre solos de baixa fertilidade química natural, deve sua sobrevivência e produtividade à sua alta diversidade vegetal, composta por espécies nativas adaptadas as condições climáticas e nutricionais do solo (ANDRESON; INGRAN, 2003). Essas espécies teriam uma baixa demanda por nutrientes minerais e dependeriam, então, de uma eficiente reciclagem da matéria orgânica produzida pela própria floresta (PRADO, 2009).

O solo Amazônico garante a manutenção de uma floresta tão rica a partir da sua diversidade microbiana presente no solo, que reutiliza os componentes dos próprios vegetais e animais presentes no ambiente (MELO et al., 2012; SOUZA et al., 2011). Com o uso dessas substâncias ocorre a redistribuição de elementos primários, como carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo e outros, entre os organismos e o ambiente (GADD, 2007). Logo, os micro-organismos são muito importantes porque participam da reciclagem dos componentes da natureza por meio dos ciclos biogeoquímicos (PETIT et al., 2009).

2.2 Fungos isolados de solo como produtores de bioativos

Embora os produtos naturais tenham sido empiricamente usados pelas antigas populações (BASSETT; KEITH, 1980), foi apenas no Século 20 que começamos a

identificar e caracterizar sistematicamente estes compostos importantes (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011).

A primeira referência sobre metabólitos fúngicos foi publicada em 1911(GAINEY, 1917), mas em menos de 100 anos, até o segundo trimestre de 2007, haviam sido cadastradas nos bancos de dados Caplus e Medline 11376 publicações sobre este tema, inclusive patentes, evidenciando o crescente interesse por esta área (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

A evolução destes chamados metabólitos secundários por meio do tempo foi provavelmente realizado por micro-organismos como sinais químicos para a comunicação, para defender o habitat ou para inibir o crescimento de competidores (YIN et al., 2007). O primeiro metabólito fúngico de notória eficácia foi, sem dúvida, a penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi descoberta acidentalmente por Alexander Fleming, em 1928. Deu-se início, com esta descoberta, à exploração dos micro-organismos como fonte de substâncias biologicamente ativas (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

O solo fornece uma grande variedade de micro-organismos. As bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus formam a coleção microscópica que pode alcançar um total de bilhões de organismos por grama (ROSSELO-MORA; AMANN, 2001). A diversidade de populações microbianas indica que elas tiram proveito de qualquer nicho encontrado em seu ambiente, assim sendo, os micro-organismos detêm a maior proporção da diversidade genética global estimada (PRADO, 2009).

A maior diversidade de fungos é encontrada nas regiões tropicais do mundo, cujo clima quente e úmido é favorável a sua multiplicação (BLACKWELL, 2011). O ambiente afeta diretamente o metabolismo microbiano. Por isso, os fungos do solo são

capazes de ativar muitas rotas metabólicas para a degradação de variados componentes, dependendo das condições do meio em que se encontram e da disponibilidade de nutrientes (PETIT et al., 2009).

Dentro deste contexto, percebe-se a vantagem da prospecção de metabólitos fúngicos comparados à outras fontes, pois os fungos apresentam-se como matéria-prima renovável e de preservação ambiental já que podem ser cultivados em larga escala e não prejudicam o ecossistema, o que pode ocorrer com uso de plantas, além de se evitar problemas éticos que podem surgir ao se estudar metabólitos bioativos a partir de animais.

Além disso, sabe-se que o número de micro-organismos encontrados depende do tipo do solo e de suas condições físicas, químicas e nutricionais (HARGREAVES, 2008) e o estudo de metabólitos fúngicos a partir do solo Amazônico se torna ainda mais atraente já que a atividade biológica dos fungos é fortemente favorecida pelas condições naturais de temperatura e umidade da floresta (LUIZÃO, 2004).

Entre os organismos vivos, os fungos filamentosos são os principais produtores de bioativos microbianos com atividade biológica (42%), seguidos dos *Streptomyces* (32,1%) (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011). Os gêneros de fungos filamentosos mais comumente encontrados são representantes de *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Verticillium* e *Alternaria* (GAMS, 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Esses micro-organismos possuem a capacidade de secretar enzimas no meio ambiente e essas enzimas auxiliam na degradação de produtos e compostos (SCHUSTER et al., 2002). Muitos micro-organismos do solo produzem enzimas extracelulares para degradar biomoléculas de elevado peso molecular que os mesmos não conseguem absorver de modo direto (PRADO, 2009).

Fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* tem sido amplamente empregados em processos biotecnológicos, devido à produção de enzimas importantes, como lipases e proteases (SCHUSTER et al., 2002; CONTESINI, 2009; PERICIN et al., 2009).

Existem vários trabalhos com o estudo de enzimas produzidas por fungos. Estudos relatam a produção de lipase a partir do *Aspergillus niger* NCIM 1207 (MEHTRAS et al., 2009), *Aspergillus carneus* (SAXENA et al., 2003), *Yarrowia lipolytica* (DOMÍNGUEZ et al., 2003; YU et al., 2007), *Geotrichum* sp. (BURKET et al., 2004), *Fusarium globulosum* (GULATI et al., 2005), *Fusarium oxysporum* (PRAZERES et al., 2006; OLIVEIRA, 2012), *Penicillium aurantiogriseum* (LIMA et al., 2003), *P. verrucosum* (KEMPKA et al. 2008), *Candida rugosa* (DALMAU et al., 2000). El-Diasty e Salem (2007) testaram a atividade proteolítica de 89 isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Cladosporium* e *Penicillium*.

No trabalho realizado por Prado (2009), foi realizado o estudo de micro-organismos do solo amazônico produtores de enzimas, incluindo bactérias e fungos isolados. O número de bactérias isoladas de amostras de solo de floresta nativa foi superior ao de fungos, no entanto, apenas 64% das bactérias apresentaram atividade proteolítica, enquanto 100% dos fungos demonstraram tal atividade. Na verificação da atividade lipolítica, as bactérias ocorreram em número menor que os fungos lipolíticos.

2.3 Bioativos de interesse para a indústria de cosméticos

A indústria de cosméticos destaca-se pelas suas pesquisas e pelo desenvolvimento de produtos inovadores e quase sempre com muita tecnologia agregada. Os cosméticos possuem uma grande importância econômica. A Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos apresentou um crescimento médio deflacionado composto próximo a 10% aa nos últimos 19 anos, tendo passado de

um faturamento "Ex-Factory", líquido de imposto sobre vendas, de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 43,2 bilhões em 2014 (ABIHPEC, 2015).

A indústria brasileira de cosméticos tem papel fundamental na economia brasileira e já representa mais de 1,8% do PIB nacional. No mercado mundial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC), o Brasil passou de sexto principal mercado em 2000, para terceiro em 2006, mantendo a posição no ranking em 2014, representando 9,4% do consumo mundial (EUROMONITOR, 2011; 2014). Com um faturamento na ordem de R\$ 101,7 bilhões, o setor registrou crescimento nominal de 11% em 2014, se comparado aos R\$ 91,9 bilhões, de 2013. Esse desempenho está associado a importantes fatores que impulsionam a indústria nacional, como o investimento em inovação e publicidade (ABIHPEC, 2014).

O Brasil ocupa uma fatia de mais de 53% do mercado latino-americano de HPPC. Sem dúvida, o país é a grande potência da América Latina. Entre os principais mercados destino das exportações brasileiras do setor estão Argentina, Chile, Venezuela, México e Colômbia, sendo que a categoria de produtos para cabelos é a mais exportada (ABIHPEC, 2014).

Além da tendência de aumento da importância dos países emergentes como mercados consumidores e centros de produção e exportação, também é possível destacar outras tendências que vêm ganhando importância e que podem ser percebidas nas estratégias empresariais das principais empresas do setor. Em primeiro lugar, a liderança dos produtos de beleza e maquiagem, em especial os produtos associados a cuidados com a pele. Dentre os fatores que têm estimulado essa tendência está o aumento da expectativa de vida e o aumento da idade média da população, especialmente nos países desenvolvidos. Essa tendência tem se traduzido, em termos de estratégias empresariais, em aumento crescente da incorporação de novos ingredientes

ativos, por exemplo, com ações anti-idade, anti-sinais, de hidratação, para aumento da elasticidade e firmeza da pele. (HIRATUKA, 2008).

Uma segunda tendência importante, que pode ser verificada em período recente, é a crescente preocupação das empresas com o desenvolvimentos de produtos que utilizam ingredientes naturais e orgânicos, estimulados pela preocupação ambiental e ecológica dos consumidores. Nesse sentido, a indústria de cosméticos vem utilizando-se da Biotecnologia para a obtenção de substâncias que a torne mais competitiva (HIRATUKA, 2008).

Outros fatores que também têm contribuído para o crescimento do mercado de cosméticos no Brasil, é a utilização de tecnologia de ponta e o conseqüente aumento de produtividade, favorecendo os preços praticados pelo setor, que tem aumentos menores do que os índices de preços da economia em geral. Adicionado a isso, tem-se os lançamentos constantes de produtos atendendo cada vez mais as necessidades de mercado (ABIHPEC, 2014).

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas. A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas. Várias pesquisas de bioprospecção dos nossos biomas vêm sendo incrementadas objetivando a busca racional de bioprodutos de valor agregado (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Nesse contexto a floresta Amazônica se apresenta como um celeiro de biodiversidade com grande potencial para os estudos de prospecção.

2.4 Enzimas de interesse cosmético

Há milhares de anos, as enzimas vêm sendo utilizadas em processos tradicionais. Esses biocatalisadores podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e

de micro-organismos. Embora as enzimas obtidas de fontes vegetais e animais sejam muito utilizadas, as de origem microbiana são mais utilizadas por várias razões como, por exemplo: produção independente de fatores sazonais, possibilidade da utilização de substratos baratos como os resíduos agrícolas e o fato de o rendimento na produção poder ser elevado a partir da otimização das condições nos processos fermentativos por mutações ou a partir da tecnologia do DNA recombinante (SAID; PIETRO, 2002).

O interesse industrial por novas fontes de enzimas utilizadas em processos de baixo impacto ambiental como fontes de biocatalisadores tem contribuído para o desenvolvimento de estudos envolvendo a triagem de micro-organismos, que vêm sendo realizados por meio da bioprospecção de atividades metabólicas de enzimas (ROMERO et al., 2007). Nos últimos anos, observou-se um aumento significativo de pesquisas focalizando bioprospecção, por meio de trabalhos cooperativos empregando-se técnicas como a biocatálise e biotransformações (ANDRADE et al., 2009).

As enzimas são bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem investimentos de baixo custo (DZIEZAK, 1991; COLEN, 2006).

A produção de enzimas é uma área da biotecnologia em expansão, que movimenta bilhões de dólares anualmente (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003). Segundo estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated, "Word Enzymeto 2009", a indústria mundial de enzimas obteve um faturamento total de US\$ 3,7 bilhões em 2004, com uma previsão de crescimento da demanda mundial de 6,5% ao ano até 2009 (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Novas enzimas, e seus usos, estão sendo descobertas a partir do trabalho conjunto de equipes multidisciplinares da microbiologia, bioquímica, química, engenharia bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas. E são decrescentes os custos das enzimas industriais; assim, a utilização delas tende a aumentar continuamente (SANT'ANNA, 2001).

O interesse na utilização de enzimas em formulações cosméticas tem aumentado muito em função do melhor conhecimento da fisiologia cutânea, da evolução no desenvolvimento de novos veículos e dos avanços na área de biotecnologia (BON, 2008).

As enzimas são utilizadas na indústria de cosméticos (enzimocosmética) com o objetivo de facilitar/dificultar as reações bioquímicas da pele, proteger/reparar a pele, destruir/remover parcial ou totalmente algumas estruturas da pele. Na enzimocosmética direta as enzimas são responsáveis pela proteção da pele contra agentes externos, combate aos radicais livres, promoção de *peeling* biológico, limpeza profunda e facilitação da penetração de substâncias ativas (SIM et al., 2003). Já na enzimocosmética indireta, são utilizadas substâncias que atuam sobre as enzimas da pele, estimulando as atividades benéficas ou inibindo as maléficas (FOX, 2005).

As enzimas podem ser incorporadas nos produtos cosméticos com diversas finalidades: antiacne, antienvelhecimento, esfoliante, tintura capilar, remoção de pêlos, conservantes, anticaspa e outros (BON, 2008).

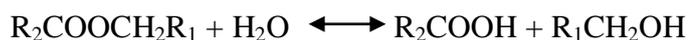
A produção de enzimas microbianas é um dos principais setores atual da biotecnologia industrial, sendo que as proteases ocupam o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente, seguidas pelas amilases (MICHELIN, 2005).

O conhecimento da fisiologia, bioquímica e genética de fungos filamentosos tornou possível a exploração de seu imenso potencial para a produção de uma grande variedade de enzimas de aplicação industrial (TORRES, 2008). Muitas enzimas produzidas por fungos são produzidas para fins comerciais, sendo elas: pectinase, β -glucanase, aminopeptidase, α -amilase, α -galactosidase, catalase, celulase, fitase, glucoamilase, hemicelulase, inulase, xilanase, lactase, dextranase, protease e lipase, sendo as espécies produtoras pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Humicola*, *Chaetomium*, *Chryphonectria* e *Penicillium* (BON et al., 2008; ORLANDELLI et al., 2012).

2.5 LIPASES

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas ubíquas de considerável significado fisiológico e potencial industrial. Elas catalisam a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa na interface óleo-água. (MARTINELLE et al., 1995; JAEGER et al., 1999; SAXENA, 2003). Apresentam peso molecular entre 40-50 kDa com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. São glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo (BORGSTON & BROCKMAN, 1984).

A função biológica das lipases é hidrolisar triacilgliceróis para formar ácidos graxos livres, di e mono-acilgliceróis e glicerol, segundo a reação geral:



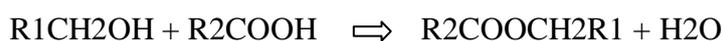
Em condições de reação com baixo teor de água, *in vitro*, entretanto, catalisam a reação de esterificação, levando a formação de acilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol. A hidrólise de gorduras e óleos, portanto, é direcionada pelo conteúdo de água da mistura de reação, de tal modo que em um ambiente não aquoso a lipase catalisa a

síntese do éster (NAKAMURA et al., 1994; MILLER et al., 1988; CERNIA; PALOCCI, 1997).

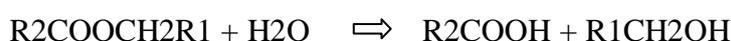
Ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, facilitando a catálise de muitas reações, tais como esterificação, transesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (SUN et al., 2009; MARTINS et al., 2008).

In vitro, as reações de síntese com lipases podem ser com síntese comum de éster a partir de glicerol e ácidos graxos e reações de transesterificação que são mais importantes para processos biotecnológicos, nos quais o doador do grupo acila é um éster. As reações de transesterificação de gorduras e óleos, dependendo do tipo de acceptor do grupo acila, são denominadas glicerólise (glicerol como acceptor) ou alcoólise (álcool como acceptor). Nas interesterificações o grupo acila é trocado entre duas moléculas de éster. A interesterificação exige uma pequena quantidade de água além daquela necessária para a enzima manter-se num estado hidratado ativo. Como a presença de muita água diminui a síntese de éster, o conteúdo de água pode ser controlado cuidadosamente para controlar a quantidade formada dos produtos desejados (COLEN, 2006). As lipases catalisam, em determinadas condições, reações de síntese, entre elas:

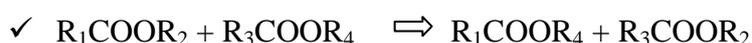
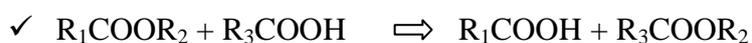
- Esterificação:



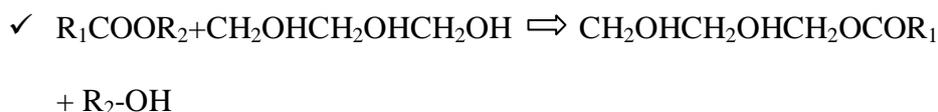
- Hidrólise



- Interesterificação



- Transesterificação



Pela escolha correta da enzima e do substrato, tais reações podem ser fortemente influenciadas por esteroisomeria e, pela modificação das condições de reação, pode-se alterar o equilíbrio termodinâmico em favor da direção de síntese (WELSH & WILLIAMS, 1989).

De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis à altas temperaturas; possuem elevada especificidade e propriedades de régio, quimio e enantiosseletividade que fazem com que sejam altamente aplicáveis em processos industriais (VILLENEUVE et al., 2000; HASAN et al., 2006).

As lipases ocorrem amplamente na natureza, sendo encontradas tanto em micro-organismos (bactérias e fungos) como em animais e vegetais (OLSON et al., 1994). Do ponto de vista industrial as lipases microbianas são consideradas de maior importância, porque além de apresentarem procedimentos mais simples de obtenção, a partir do caldo fermentativo, são geralmente mais estáveis, com propriedades mais diversificadas, grande estabilidade, especificidade de substrato e menores custos de produção. Além disso, a imensa biodiversidade de micro-organismos melhora sua importância biotecnológica e justifica a busca de novas fontes de lipases (CARVALHO et al., 2005; GANDRA et al., 2008; PASTORE et al., 2003).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como os melhores produtores de lipases porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (VULFSON, 1994).

As espécies produtoras lipases mais relatadas pertencem aos gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Penicillium* e *Aspergillus* (CONTESINI et al, 2010).

A produção de lipases tem sido desenvolvida principalmente por fermentação submersa (FSM) que está associada ao crescimento microbiano e conseqüentemente, às variações da composição e condições do cultivo (SHARMA et al., 2001). Estas enzimas também podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES), no qual são utilizados substratos insolúveis com baixas porcentagens de água em sua composição. Tais substratos atuam como fonte de nutrientes e como suporte fisiológico (PANDEY, 2003). A via FES tem sido relatada principalmente para a produção de lipase por fungos filamentosos (MESSIAS, 2011).

Na indústria cosmética a utilização das enzimas vem se intensificando, não apenas na síntese de matérias-primas, mas também como ingredientes ativos nas formulações. Vários exemplos de síntese de fragrâncias utilizando lipase foram relatados, com (-)-mentol sendo o mais proeminente. Uma nova forma de isolar ésteres de (-)-mentol enantiomericamente puros é através de uma etapa de transesterificação com (±)-mentol usando lipase de *B. cepacia* (ATHAWALE, MANJREKAR e ATHAWALE, 2001). O produto final metacrilato de metila foi subseqüentemente polimerizado para ser usado como um perfume de liberação sustentada. O jasmonato de metila é outro componente de perfumaria importante, que pode ser sintetizado com uma reação catalisada por lipase para produzir o intermediário quiral epicucurbato de metila (KIYOTA et al., 2001).

As lipases podem também funcionar como ingredientes ativos numa formulação cosmética e como biocatalisador na síntese de substâncias químicas cosméticas específicas (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013). Elas podem ser usadas principalmente em cosméticos para limpeza facial, tratamento de celulite e

redução de gordura (MASUNAGA, 2002; OBORSKA, 2009; LINTNER, 2009; HUBER,2004).

Centenas de toneladas de ésteres de cosméticos são produzidas todos os anos pela indústria de cosméticos. Sendo o miristato mirístico, ricinoleato cetílico e cocoato decílico os emolientes de ésteres mais populares na Europa (HOLM, 2007). No Brasil, além dos citados, também são comuns o palmitato de cetila, miristato de isopropila, oleato de octila, oleato de isobutila, estearato de octila, palmitato de octila, oleato de isodecila, entre outros (FORTINBRÁS). Estes ésteres de cosméticos são ésteres alquílicos que são utilizados em cremes e loções emulsionadas, cremes anidros (batons, blushes e pomadas) e demaquilantes e são produzidos por rotas químicas, porém, pela capacidade das lipases em agir em reações de síntese, estas também podem ser utilizadas para produção desses ésteres por via enzimática (OLIVERIA, 2012). Além da vantagem enantiosseletiva das lipases, ao comparar o impacto ambiental dos processos químico e enzimático, a biocatálise demonstra oferecer vantagens claras. Na empresa Degussa (Alemanha), líder mundial em especialidades químicas, o consumo de energia na produção de miristato mirístico foi reduzido em mais de 60%, e as emissões de diferentes poluentes, entre 60% e 90%, além de proporcionarem produto de qualidade superior, oferecendo conteúdo 2-17% maior de ingrediente ativo, menos subprodutos indesejáveis, melhor cor e odor (HOLM, 2007).

Existem descrições do uso de lipases por algumas empresas de produtos cosméticos. A Unichem Internacional (Espanha), por exemplo, lançou a produção de miristato de isopropil, palmitato de isopropil e palmitato de octila para uso como emolientes de produtos para cuidados pessoais, como os para pele, cremes solares e óleos de banho. Foi usada lipase imobilizada de *Rhizomucor meihei* como biocatalisador. A empresa afirma que a utilização da enzima substituindo o catalisador

convencional permitiu a produção de produtos de maior qualidade, exigindo o mínimo de refinação (HASAN et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar a produção de lipases por fungos isolados de amostras de solo da floresta amazônica.

3.2 ESPECIFICOS

- Investigar a presença e a identidade de fungos cultiváveis presentes em amostras de solo da região amazônica.

- Estudar a produção de lipases pelos fungos isolados das amostras de solo.

- Avaliar a influência dos fatores de bioprocessos na produção de lipases.

- Determinar o pH e a temperatura ótima das lipases produzidas pelo isolado selecionado.

- Determinar a citotoxicidade do caldo oriundo do bioprocessos para produção de lipases com *Fusarium* INPA 4.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia deste estudo foi estruturada de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1 . Inicialmente foram realizadas coletas de amostras de solo e, a partir dessas, foram isolados os fungos cultiváveis. Esses últimos foram purificados, preservados, identificados e submetidos a bioensaios para avaliação da sua capacidade de produção de lipases.

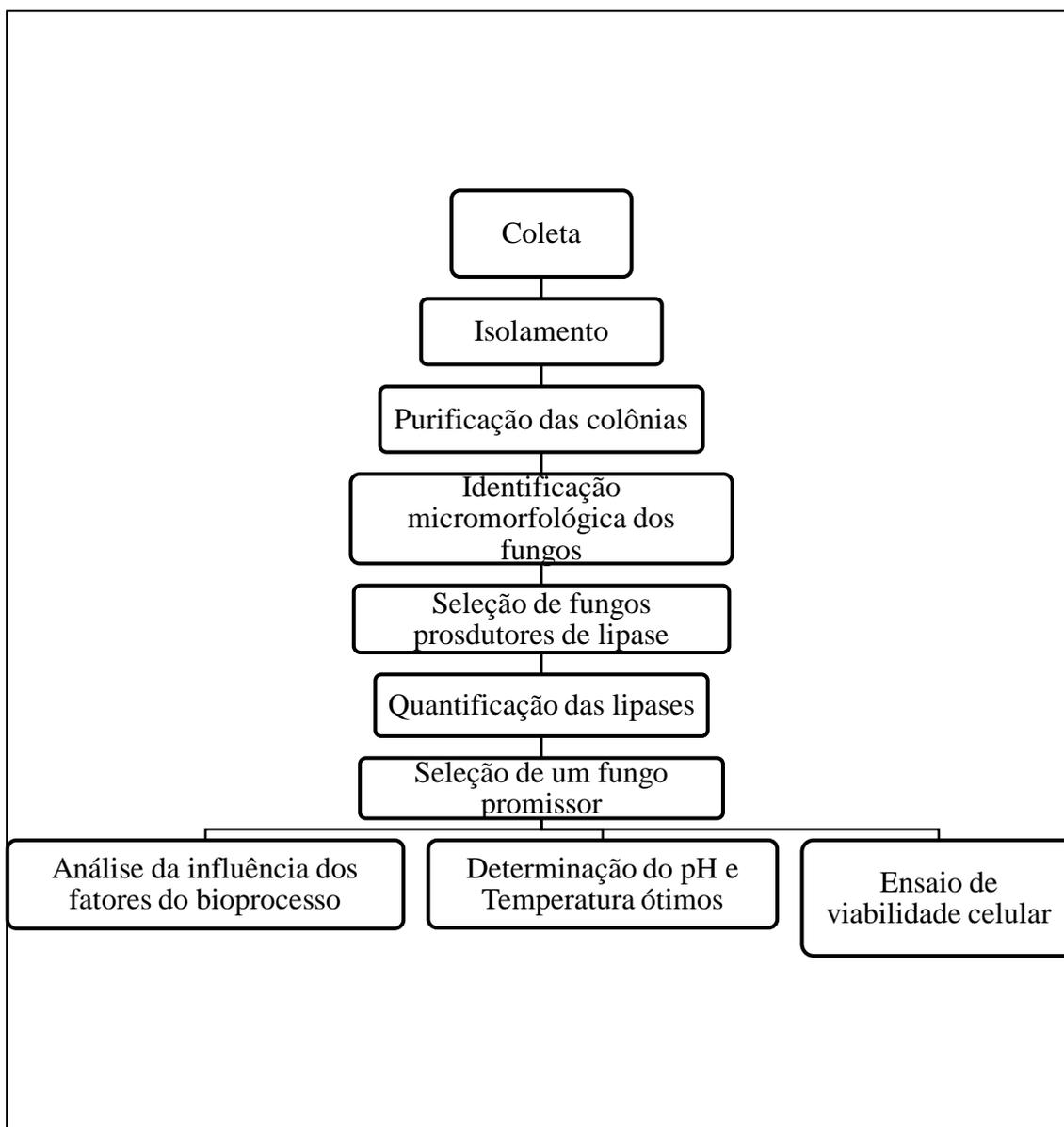


Figura 1- Fluxo das atividades do presente projeto que teve como objetivo verificar a produção de lipases de interesse da indústria de cosméticos produzidas por fungos isolados de amostras de solo da floresta Amazônica

4.1 AMOSTRAS DE SOLO

Foram coletadas dez amostras (1g) de solo da Reserva Florestal Adolpho Ducke, pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil (Lat.: 02°95'43''S; Long.: 59°93'39''O). A coleta foi realizada no período chuvoso, no mês de Fevereiro de 2014 e, para acesso ao local, foi autorizada pelo CGEN - Processo nº 010344/2013-6.



Figura 2: Imagem de satélite demonstrando o local de coleta das amostras de solo que foram utilizadas no presente trabalho. (Lat.: 02°95'43''S; Long.: 59°93'39''O =)▲

Fonte: <http://peld.inpa.gov.br/sitios/ducke>

4.2 PROCEDIMENTOS

4.2.1 Isolamento dos microrganismos das amostras de solo

Para o isolamento, 1 g de solo foi transferido para um tubo contendo 9 mL de água destilada estéril, que foi agitado por 10 segundos. A partir desse tubo de concentração 10^{-1} , foram realizadas quatro diluições sucessivas (10^{-2} a 10^{-5}), e 0,1 mL de cada tubo foram inoculados nas placas de Petri contendo o meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) com cloranfenicol (250 mg/L), e espalhados sobre o meio com alça de Drigalsky. O experimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas à temperatura ambiente (± 28 °C) por até 14 dias, sendo avaliadas para obtenção de isolados a cada 24 horas. As colônias obtidas foram purificadas por cultivo monospórico e submetidas à identificação fenotípica.

Após o crescimento em tubo, os fungos foram semeados em placas de BDA para a obtenção de colônias isoladas. Depois de isolados, os fungos foram repicados para dois tubos, um foi estocado a 4°C (tubo mãe) e o outro foi utilizado nos ensaios. O gênero dos fungos isolados foi definido por meio das características macro e microscópicas das colônias, como sugerido por Lacaz *et al.*, 2002 e BARNETT & HUNTER (1998).

4.2.2 Seleção dos fungos na produção de lipases

Todos os 100 isolados foram inoculados (10^4 esporos/mL) em Erlenmeyers (125 ml) contendo 50 mL do meio de cultivo indutor de produção de lipases. O Meio utilizado como indutor de produção de lipases foi a *Solução de Manachini* (KH_2PO_4 , 2 g.L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 1 g.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g.L⁻¹; $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 g.L⁻¹;

extrato de levedura, 1 g.L⁻¹; água destilada, 1000 mL), adicionado de substrato indutor (0,5%). Esses cultivos foram mantidos sob agitação orbital (100 rpm) por 120 horas.

4.2.3 Quantificação das lipases

A atividade de lipases foi determinada pela hidrólise pNPP (p-nitrofenilpalmitato). Foram adicionados 1,0 mL de tampão Tris-HCl (40 mM, pH 8,0), 0,5 mL de pNPP (p-nitrophenylpalmitate, 0,20 mM), como substrato e 0,5 mL do caldo da cultura. Após 10 min de incubação a 40 °C, a reação foi parada pela adição de 2 mL de etanol a 96% e o p-nitrofenol liberado foi quantificado espectrofotometricamente a 420 nm, utilizando uma curva padrão. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libertado 1 umol de p-nitrofenol por minuto (Prazeres et al., 2006).

4.2.4 Influência dos fatores de bioprocesso na produção de lipases

A partir dessas condições descritas (Item 4.2.2), foi investigada, de forma univariada, a influência dos fatores: Óleo de soja (0-30 g/L), (NH₄)₂SO₄ (0-5 g/L), pH (4-7), razão Meio/Vidraria (1/5-4/5), inóculo (1x10²- 1x10⁵), agitação orbital (0-100 rpm) e horas (48-120 horas). Uma cinética de produção de lipases, a cada 24 horas durante 120 horas, foi realizada utilizando-se os parâmetros otimizados.

4.2.5 Determinação do pH e temperatura ótimos da lipase produzida

O efeito do pH na atividade da lipase foi avaliado na faixa de 5 a 9,5 com intervalos de 0,5 unidade. As soluções tamponantes utilizadas foram: tampão acetato (pH 5 e 5,5), tampão fosfato (pH 6,0-8,0) e tampão Tris-HCl (pH 8,5-9,5).

O pH ótimo foi determinado preparando-se o substrato e a lipase nas soluções tampão com diferentes valores de pH.

O efeito da temperatura na atividade da enzima foi determinado incubando-se a mistura de reação em temperaturas que variaram de 20-60°C, pH 8,5. Após 30 minutos de incubação em cada temperatura, a atividade enzimática foi determinada nas condições padrão, anteriormente descritas no item 4.2.3.

4.2.6 Ensaio de viabilidade celular

Foi realizado o ensaio de citotoxicidade do caldo do fungo *Fusarium* INPA 4 a fim de determinar as diluições não tóxicas da fermentação. A citotoxicidade foi avaliada pelo método Alamar blue[®] segundo (NAKAYAMA *et al*, 1997) e utilizado macrófagos murinos da linhagem J774. Esses macrófagos foram mantidos na concentração para o experimento de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Observada às 24 horas de incubação e aderência das células, estas foram tratadas com o caldo nas diluições de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320. Para o ensaio as células foram tratadas em triplicata para cada tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas) e utilizado meio de cultura RPMI 1640 como controle negativo. Após esse tempo de tratamento foi adicionado 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1: 10), esperando 2 horas para metabolização da resazurina para em seguida realizar a leitura da fluorescência. A referida viabilidade foi calculada conforme a fórmula

abaixo, onde Ft= (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e ΔFb= (fluorescência da célula + meio + resazurina).

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{F_t}{F_b} \times 100$$

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram calculados a média e o desvio padrão para cada uma das determinações realizadas.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação de fungos cultiváveis presentes em amostras de solo da região amazônica.

Foram realizadas duas coletas de solo, durante o período chuvoso, na Reserva Adolpho Ducke, que permitiram a obtenção de 100 isolados. O isolamento foi realizado pelo método de diluições sucessivas. Com a finalidade de investigar a identidade dos isolados, as culturas foram submetidas a identificação macro e micromorfológica (Apendice A). A Figura 3 apresenta o número de isolados fúngicos, distribuídos por gênero, obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke (Manaus-AM). Os três gêneros fúngicos mais frequentes foram *Aspergillus* (41%), *Penicillium* (34%) e *Trichoderma* (13%).

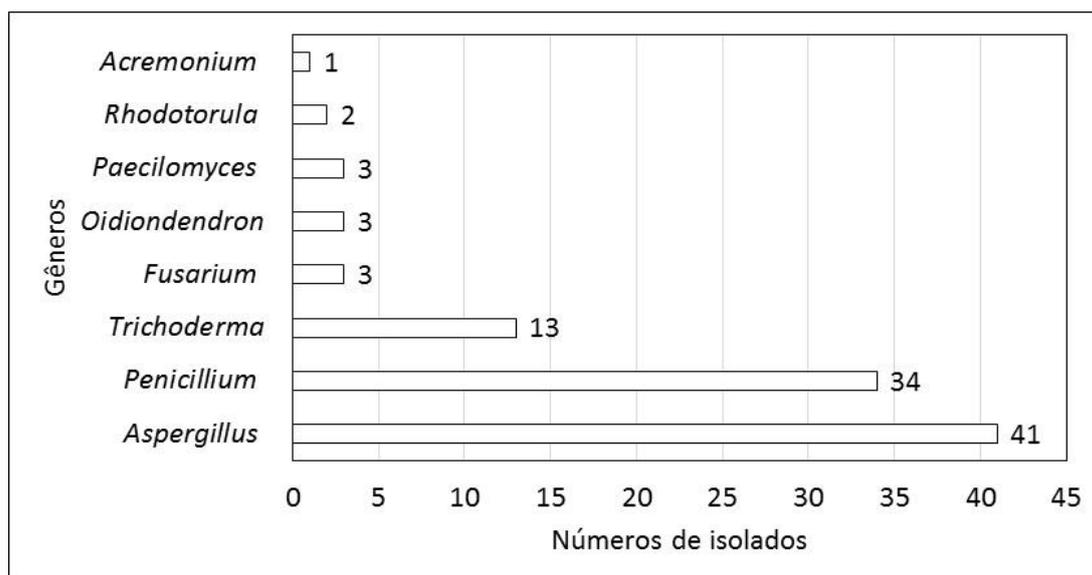


Figura 3 - Número de isolados fúngicos, distribuídos por gênero identificado, obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke (Manaus-AM).

5.2 Estudo da produção de lipases pelos fungos isolados das amostras de solo.

Todos os isolados do solo foram submetidos a bioprocessamento submerso com a finalidade de investigar o potencial desses em produzir lipases. A Figura 4 apresenta o número de isolados fúngicos (obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke-Manaus-AM) distribuídos pela capacidade de produzir lipases (UI/L) em cultivo submerso. Onze isolados foram classificados como bons ou ótimos produtores de lipases (>6 UI/mL).

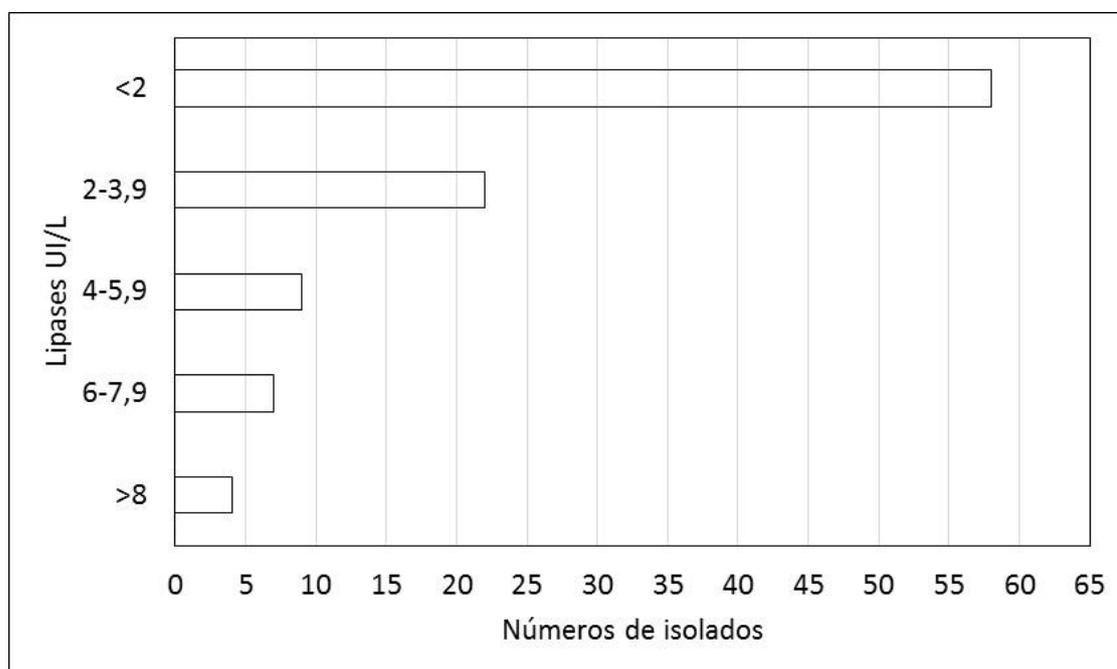


Figura 4 - Número de isolados fúngicos (obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke-Manaus-AM) distribuídos pela capacidade de produzir lipases (UI/L) em cultivo submerso. Atividades: <2 UI/L fraco produtor; 2-3,9 UI/L fraco produtor; 4-5,9 produtor; 6-7,9 bom produtor e >8 forte produtor.

A Tabela 1 apresenta a atividade de lipase (UI/L) produzida em meio submerso pelos 11 isolados (obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke-Manaus-AM) destacados na produção de lipase. Os gêneros *Penicillium*

INPA83, *Fusarium* INPA 4, *Paecilomyces* INPA 53 e *Aspergillus* INPA 59 apresentaram-se como os melhores produtores.

Amostra	Código	UI/L
<i>Penicillium</i>	INPA 83	13,6
<i>Fusarium</i>	INPA 4	11,5
<i>Paecilomyces</i>	INPA 53	8,3
<i>Aspergillus</i>	INPA 59	8,1
<i>Penicillium</i>	INPA 62	7,3
<i>Aspergillus</i>	INPA 43	7,0
<i>Aspergillus</i>	INPA 60	6,5
<i>Aspergillus</i>	INPA 73	6,4
<i>Aspergillus</i>	INPA 12	6,1
<i>Penicillium</i>	INPA 39	6,1
<i>Aspergillus</i>	INPA 28	6,0

Tabela 1- Atividade de lipase (UI/L) produzida em meio submerso pelos 11 isolados (obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke-Manaus-AM) destacados na produção de lipase.

5.3 Avaliação a influência dos fatores de bioprocessos na produção de lipases pelo *Fusarium* INPA 4.

Com a finalidade de investigar a influência das variáveis de bioprocessos na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4 foram realizados experimentos univariados. A Figura 5 apresenta a influência do fator concentração de óleo de soja na

produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4. A melhor concentração de óleo de soja foi a de 15 g/L.

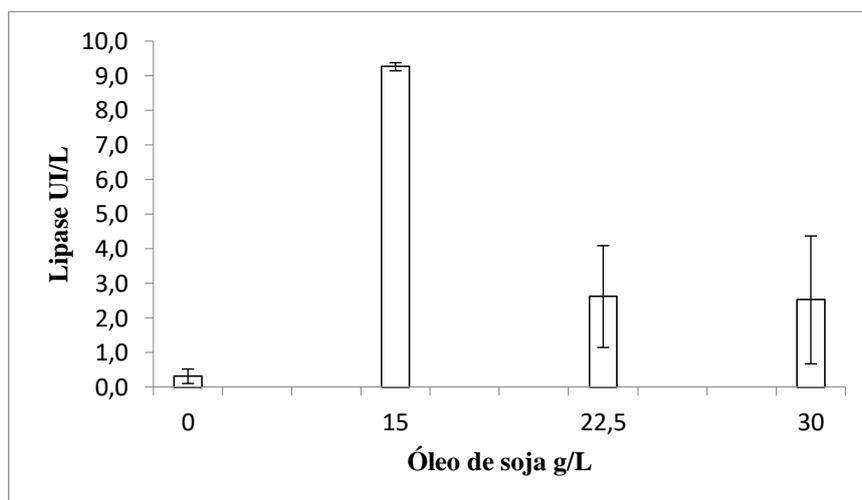


Figura 5 - Influência do fator concentração de óleo de soja na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4.

A Figura 6 apresenta a influência do fator $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4. A melhor concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi a de 1 g/L.

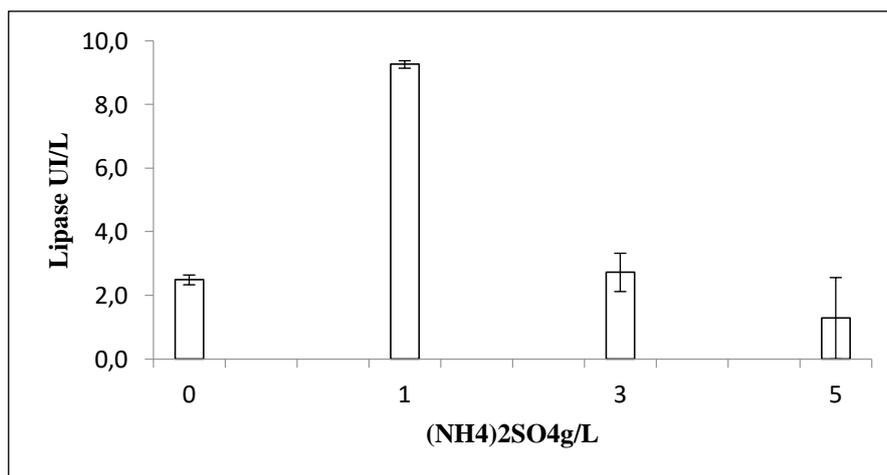


Figura 6 - Influência do fator $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4. A melhor concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi a de 1 g/L.

A Figura 7 apresenta a influência do pH inicial do meio de cultivo na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4. A melhor atividade de lipase observada foi em pH inicial igual a 5,0.

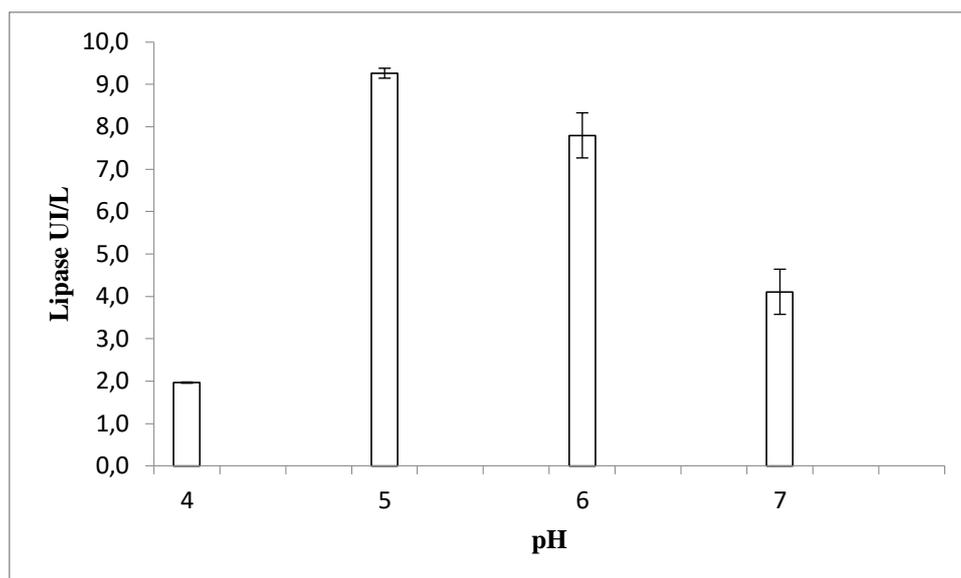


Figura 7 - Influência do pH inicial do meio de cultivo na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4.

A Figura 8 apresenta a influência do fator razão volume de meio de cultura e volume do Erlemeyer na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4. A melhor razão volume de meio por volume de vidraria foi a de 1 para 5.

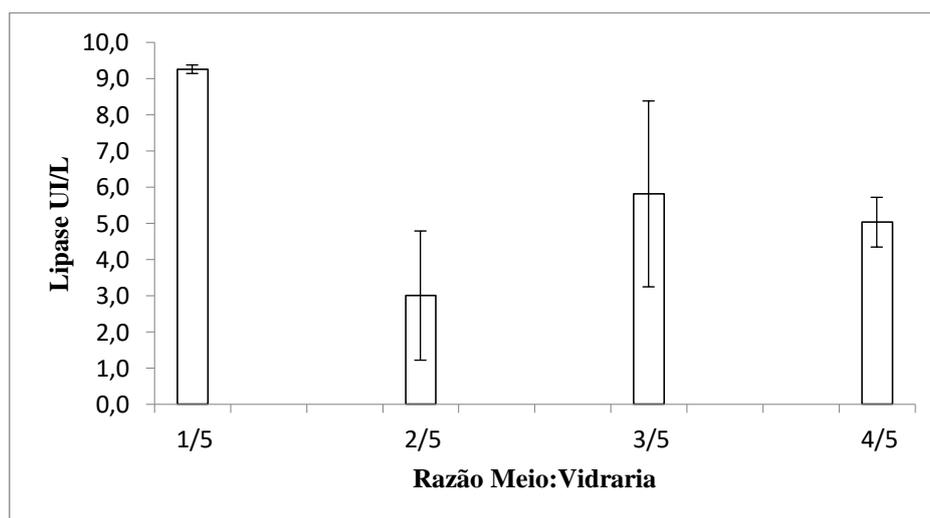


Figura 8- Influência do fator razão volume de meio de cultura e volume do erlemeyer na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4.

A Figura 9 apresenta a influência do *inóculo* inicial na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4. Os melhores tamanhos de inóculo foram 1×10^4 e 1×10^5 células/mL.

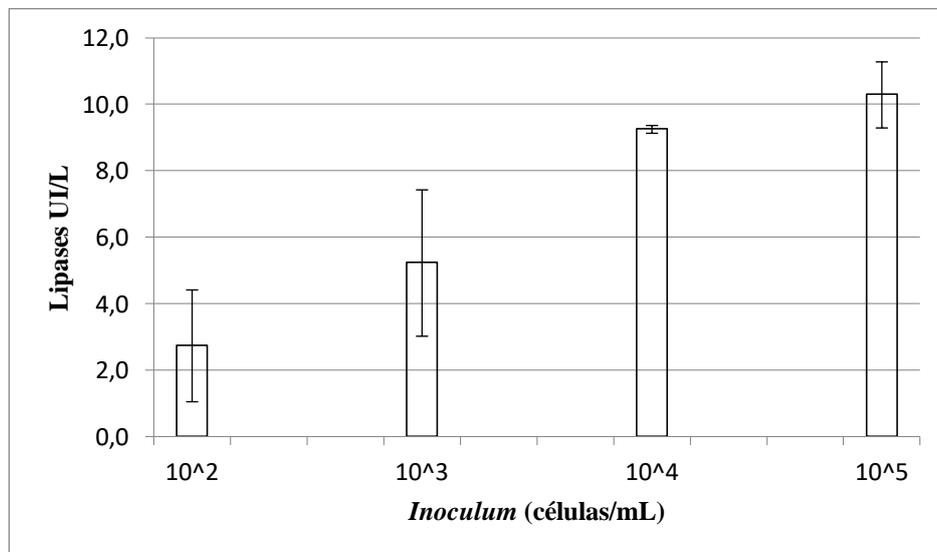


Figura 9- Influência do *inóculo* inicial na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4.

A Figura 10 apresenta a influência da agitação orbital na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4. O melhor agitação orbital foi a de 100 rpm.

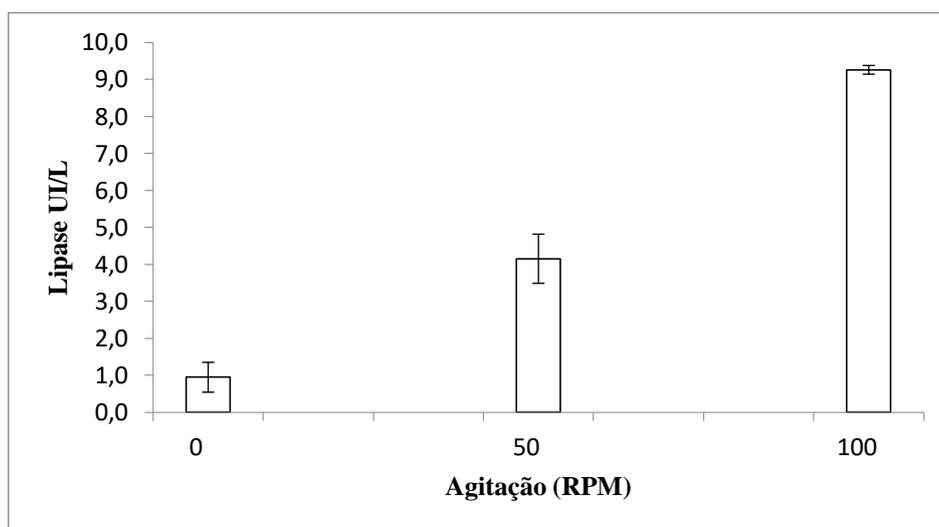


Figura 10 - Influência da agitação orbital na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA4.

A Figura 11 apresenta a influência do tempo na produção de lipases por *Fusarium* INPA 4. Nas condições experimentais, a máxima atividade de lipases foi observada no tempo de 72 hs.

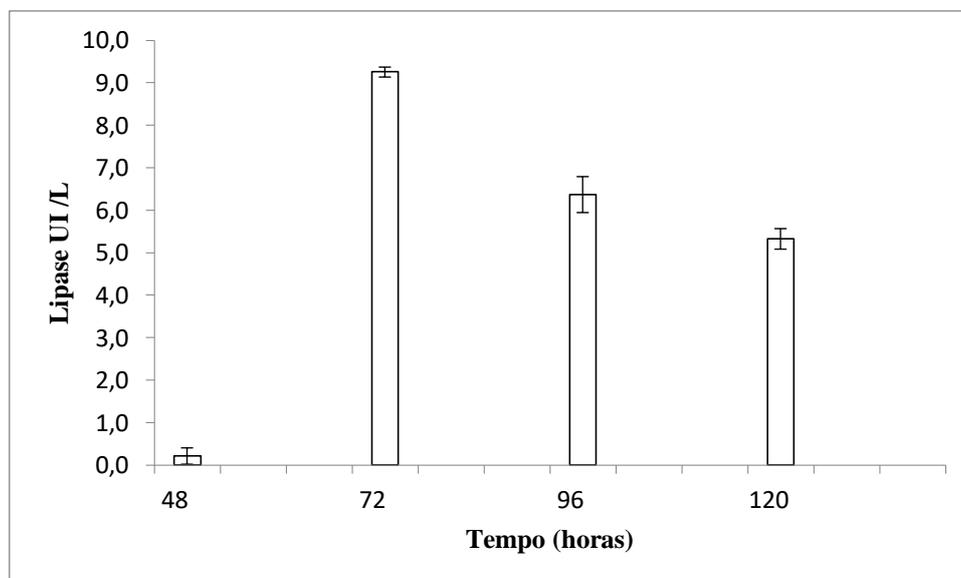


Figura 11 - Influência do tempo na produção de lipases por *Fusarium* INPA 4.

Também foi realizada a investigação quanto a cinética de produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4 nas melhores condições apresentadas nos experimentos de investigação da influência dos fatores de bioprocessamento (Figura 12). Os maiores níveis de lipases foram obtidos a partir de 72 horas.

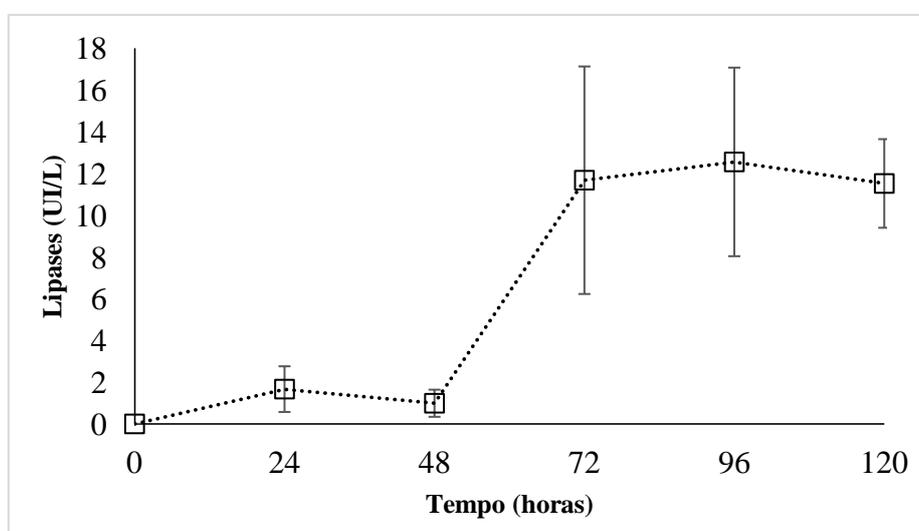


Figura 12- Cinética de 120hs da produção de lipases de três isolados fúngicos (obtidos a partir de amostras de solo da Reserva Florestal Adolfo Ducke-Manaus-AM) destacados na produção de lipase.

5.4 Influência do pH e da temperatura na atividade das lipases produzidas por *Fusarium INPA 4*

O pH ótimo foi determinado por meio do método padrão, usando soluções tampão com diferentes valores de pH variando entre 5,0 a 9,5. Na Figura 13 pode-se observar que as melhores atividades enzimáticas ocorram no pH entre 7,0 e 9,0.

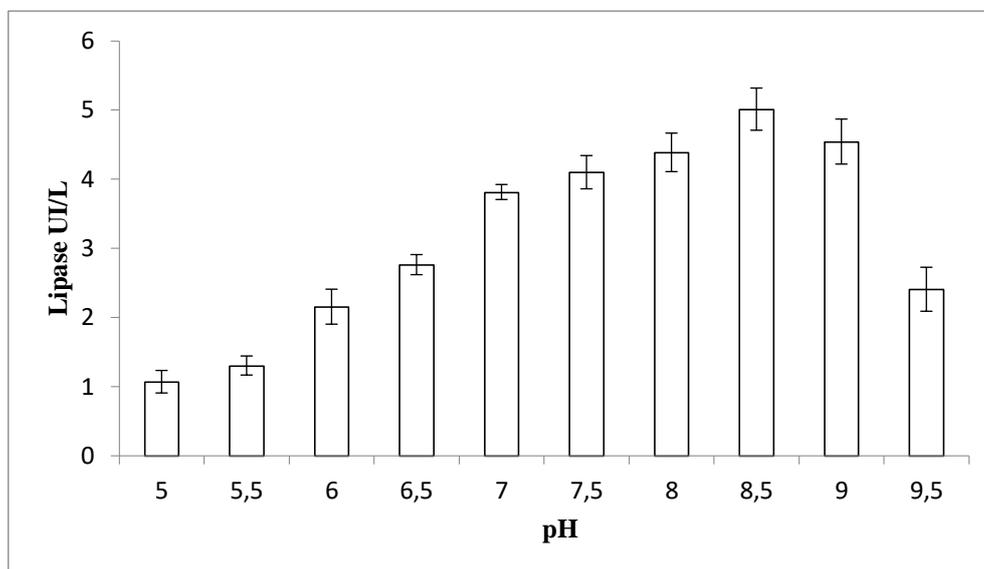


Figura 13 - Efeito do pH na atividade da lipase produzida por *Fusarium INPA 4*.

A influência da temperatura na atividade enzimática foi investigada por meio do método padrão, numa faixa de temperatura de 20 a 60°C (Figura 14). A atividade ótima da enzima ocorre entre as temperaturas de 20 e 30°C.

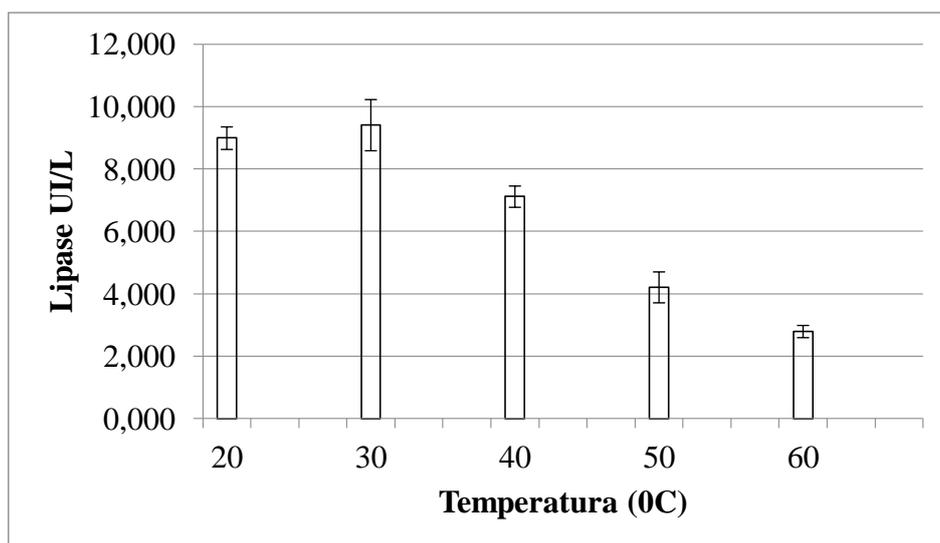


Figura 14: Efeito da temperatura na atividade da lipase produzida por *Fusarium INPA 4*.

5.5 Citotoxicidade do caldos oriundos do bioprocesso para produção de lipases com *Fusarium INPA 4*

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com caldos que fermentaram em 96 horas e em 120 horas. As figuras 15 e 16 representam os títulos onde cada caldo foi analisado quanto a toxicidade celular. Os caldos apresentaram moderada citotoxicidade nas duas primeiras diluições (1/10 e 1/20), mas a partir da terceira (1/40) a viabilidade celular foi satisfatória.

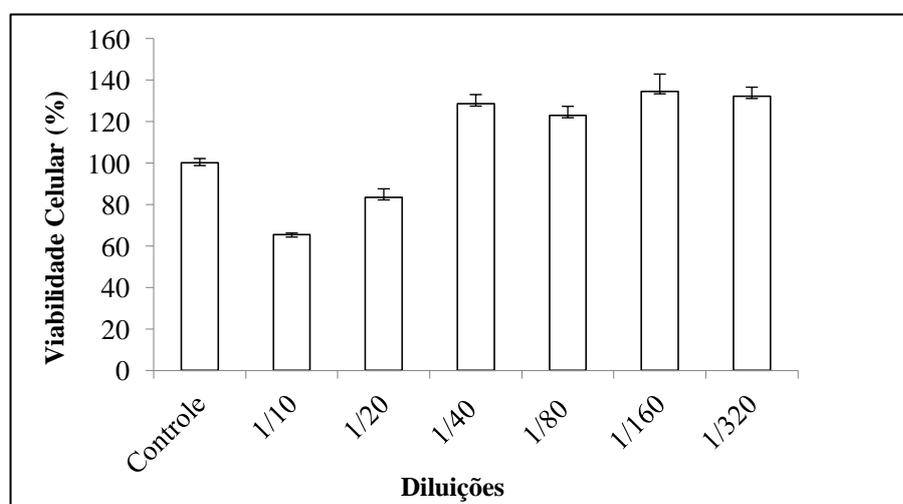


Figura 15: Viabilidade celular em macrófagos murinos linhagem J774 do caldo fermentado em 96 horas de *Fusarium INPA 4* no ensaio colorimétrico com Alamar Blue®.

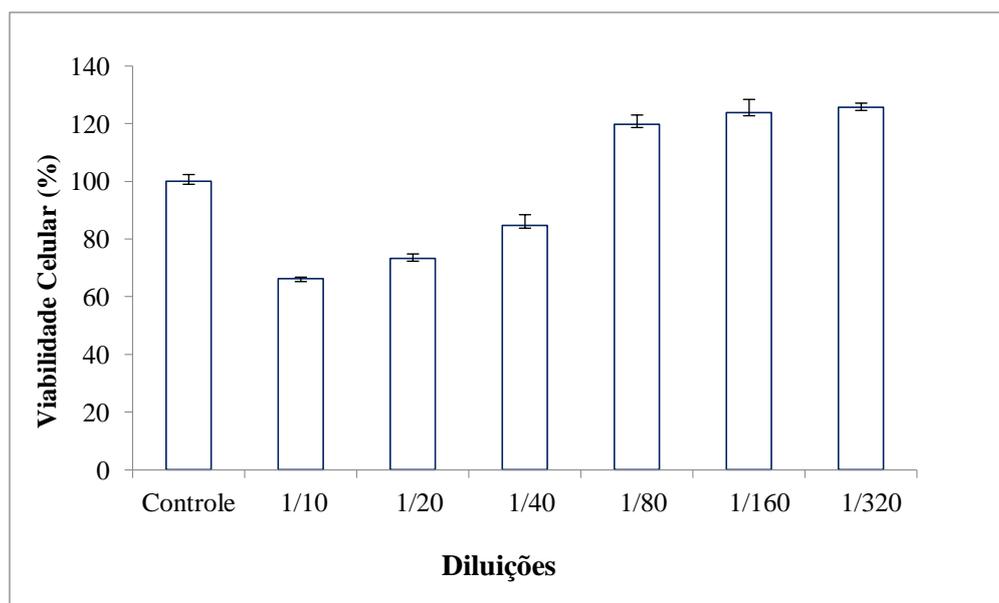


Figura 16: Viabilidade celular macrófagos murinos linhagem J774 do caldo fermentado em 120 horas de *Fusarium* INPA 4 no ensaio colorimétrico com Alamar Blue®.

5.6 Discussão

O presente trabalho foi iniciado com o isolamento de micro-organismos isolados de amostras de solo, em seguida, foi realizado um screening para selecionar bons produtores de lipase e um bom produtor foi conduzido para investigação da influência dos fatores de bioprocessamento na produtividade e por fim foram avaliadas as características das lipases produzidas.

O trabalho realizado foi importante pois resultou no isolamento e no estudo das condições de produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4, um micro-organismo que apresenta um potencial a ser explorado.

O isolamento fúngico resultou em 100 micro-organismos, sendo que os gêneros mais frequentes foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Esse resultado está de acordo com a literatura que demonstra a alta frequência desses gêneros em amostras de solo. Esses gêneros pertencem ao Filo Ascomycota, trata-se de

microrganismos capazes de produzir um diversificado número de enzimas e de se adaptar a diferentes tipos de substratos (CARDENAS et al.,2001; CONTESINI et al., 2009; BON et al., 2008; COLEN et al., 2006). Esses dados estão de acordo com o trabalho realizado por Cavalcanti et al., 2006, que investigaram a diversidade de fungos cultiváveis em amostras de solo e concluíram que os principais gêneros isolados foram *Penicillium* e *Fusarium*. Celestino et al., 2014 isolou micro-organismos de solo da floresta amazônica para serem investigados quanto a produção de pigmentos, onde os gêneros mais predominantes foram *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Aspergillus*.

Todos os isolados mostraram ser produtores de lipase, o que está de acordo com o trabalho realizado por Prado, 2009, que estudou as possíveis ocorrências de microrganismos produtores de enzimas de interesse ecológico na Província Petrolífera de Urucu (Coari) e propriedades agrícolas rurais do ramal do Brasileirinho (Manaus).

Onze por cento dos isolados produziram altas concentrações de lipases e qualquer um desses isolados possui potencial a ser investigado para desta enzima. Os isolados *Penicillium* INPA83, *Fusarium* INPA 4, *Paecilomyces* INPA 53 e *Aspergillus* INPA 59 apresentaram-se como os melhores produtores e nas condições experimentais o isolado *Fusarium* INPA 4 foi selecionado para fazer parte das demais etapas do trabalho. Justifica-se essa escolha devido a possibilidade de investigar as lipases produzidas por esse gênero que produz lipases que foram menos investigadas que as lipases dos generos *Aspergillus* e *Penicillium* e, ainda, pelo potencial biotecnológico das espécies desse gênero.

Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade de síntese de várias enzimas por *Fusarium*, como por exemplo amilase, celulase, proteases e lacase (BUENO et al., 2009); cutinases (MANNESSE et al., 1995), xilanases e celulases (PANAGIOTOU et al., 2003) e lipases (PRAZERES, et al., 2006; OLIVEIRA, 2012).

Apesar dos estudos sobre lipases de *Fusarium* não serem tão vastos e abrangentes, alguns artigos relatam as características interessantes das lipases produzidas por estes micro-organismos. Shimada et al. (1993), por exemplo, isolaram do solo uma cepa de *Fusarium heterosporum* produtora de uma lipase solvente-tolerante e a atividade obtida foi de 62700 U (método titulométrico) após 65 h de fermentação em meio contendo 3% de óleo de soja. Magau et al., 2001, investigaram a produção de lipases com atividades especiais como as lipases termoestáveis de *Fusarium heterosporum* (MAGAU et al., 2001). Oliveira, 2012 estudou a imobilização e caracterização parcial de lipase produzida por *Fusarium oxysporum* em fermentação submersa (OLIVEIRA, 2012). Maia et al., 2001, estudaram o efeito das condições de cultura na produção de lipase por *Fusarium solani* por fermentação em lotes. Produção, regulação, e algumas propriedades de atividade da lipase de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foram estudadas por Rapp, 1995. Prazeres et al., 2006, realizaram a caracterização de uma lipase alcalina de *Fusarium oxysporum* e os efeitos de diferentes surfactantes e detergentes na atividade enzimática.

Todos esses estudos com lipases de *Fusarium*, apresentando diferentes características, comprovam sua versatilidade. Esse gênero possui ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes, ocorrendo, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas (BURGESS et al., 1994). No contexto climático da Região Amazônica, observa-se a alta probabilidade de se obter um isolado de *Fusarium*, como no caso deste trabalho, podendo-se explorar sua potencialidade.

Os níveis dos fatores mais adequados para produção das lipases foram 15 g/L de óleo de soja, 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5, relação entre Meio de cultura e vidraria de 1/5, *inóculum* inicial de 10^5 cell/mL, agitação orbital de 100 rpm e o tempo de 72 h.

Esse tipo de investigação é importante para avaliar a regulação da produção da proteína alvo pelas condições ambientais impostas pelo bioprocessamento.

YOSHIDA *et al.* (1968), estudaram a produção de lipase pela levedura *Torulopsis emobii* e a maior produção foi obtida com 0,8% de óleo de oliva e quantidades acima disso conferiram um menor aumento. No estudo de COLEN *et al.* (2006) quanto a influência das variáveis do bioprocessamento na produção de lipase pelo fungo *Colletotrichum.gloesporioide*, observou-se que os caldos ficavam mais turvos com o aumento da concentração do óleo, percebendo-se a presença de gotículas de óleo a partir da concentração de 20mL/L, indicando que o óleo não foi totalmente utilizado. O mesmo resultado foi observado com a lipase do *Fusarium* INPA 4, demonstrando, portanto, que o aumento da concentração de óleo não influenciou a produção de lipase.

Dentre os compostos nitrogenados usados para a produção de lipase, nitrato e sais de amônia estão entre os mais utilizados e a fonte de nitrogênio inorgânico mais utilizado tem sido o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (HADEBALL, 1991; MONTESINOS *et al.*, 1996). Tan e colaboradores (2003) mostraram bons resultados utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte inorgânica de nitrogênio. PETROVIC *et al.* (1990) estudaram as condições para a produção de lipase extracelular de uma cepa de *Penicillium roqueforti* e obtiveram melhor resultado de produção usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na concentração de 0,3%. A lipase do *Fusarium* INPA 4 apresentou melhor atividade com a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,1%.

O pH inicial, no estudo de COLEN *et al.* (2006), influenciou a produção de lipase, ocorrendo maior produção em faixa menos ácida e até mesmo alcalina. O mesmo não foi observado na lipase do *Fusarium* INPA 4, onde a melhor produção da enzima foi na faixa mais ácida. Isso comprova que as lipases são capazes de atuar em amplas faixas de pH (GUPTA *et al.*, 2004).

TAN *et al.* (2003), estudaram a otimização das condições de cultivo de *Penicillium camembertii* para a produção de lipases onde o melhor tempo de fermentação foi de 96 horas. No estudo da produção de lipase por *Fusarium* INPA 4, o melhor tempo foi 72 horas. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de a produção de lipase atingir seu ponto máximo quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento (ZAREVUCKA *et al.*, 2005). A atividade lipásica diminui rapidamente após alcançar o nível máximo, pois ocorre a sua proteólise catalisada por proteases produzidas durante a fase de crescimento celular (DALMAU *et al.*, 2000).

MAKHSUMKHANOV *et al.* (2003) verificaram a produção de lipases de *Penicillium melinii* influenciada pela agitação do frascos e os melhores resultados foram obtidos com a agitação de 150 rpm. A lipase do *Fusarium* INPA 4 apresentou a melhor atividade quando o caldo fermentou sob agitação de 100 rpm. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de, uma maneira geral, a utilização de agitação mecânica favorecer a dispersão de esporos e fornecer uma área interfacial adequada (JAEGER *et al.*, 1994).

Existem uma grande importância na etapa de inoculação em processos fermentativos, pois o tipo e a qualidade do *inóculum* têm um efeito considerável no resultado da fermentação (WHITAKER; LONG, 1973). MEYRATH & MCINTOSH (1963) destacaram os efeitos da concentração de esporos do inoculum sobre o metabolismo de *Aspergillus sp.*, mostrando que as culturas inoculadas com menor concentração de esporos são menos eficientes na utilização de carboidratos, afetando portanto o crescimento e metabolismo. STREHAIANO *et al.* (1983) estudaram o efeito do *inóculum* em fermentações alcoólicas e obtiveram a diminuição do tempo de fermentação com o aumento da fração do *inóculum*. MAIORANO (1982) estudou a influência da concentração de esporos do inóculo na produção de enzimas amilolíticas

por *Aspergillus oryzae* e verificou que a produção de enzimas aumentou com o aumento da concentração de esporos. A lipase do *Fusarium* INPA 4 apresentou aumento de atividade de acordo com o aumento da concentração do *inoculum*.

A lipase do *Fusarium* INPA 4 foi mais ativa na faixa de pH entre 7,0-9,0. Esse resultado está de acordo com o estudo de caracterização de uma lipase alcalina de *Fusarium oxysporium* e os diferentes efeitos de surfactantes e detergentes na atividade enzimática feito por PRAZERES *et al.* (2006), que demonstrou que a lipase em estudo mostrou-se mais ativa no pH que variava entre 7 e 9. No caso das lipases de origem microbiana o pH ótimo de atuação, nas diferentes reações, são os valores próximos a neutralidade ou alcalinidade (GUPTA *et al.*, 2004). De forma geral, a faixa de pH ótimo está entre o pH 4 e 11 (PASTORE *et al.*, 2003; SAXENA *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2009; HORCHANI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009).

A epiderme é recoberta por uma fina camada de gordura que impermeabiliza a pele contra a entrada de água e mantém seu pH entre 3.5 e 5.0, protegendo-a do ataque de micro-organismos. Qualquer cosmético criado para fornecer um princípio ativo para a pele ou para o organismo precisa vencer a proteção lipídica, que pode ser removida por solventes ou por agentes alcalinos (GALEMBECK; CSORDAS, 2009). Nota-se, desta maneira, que o pH da lipase de *Fusarium* INPA 4 pode ser útil em formulações em que se deseja a absorção de uma substância pela pele.

Quanto a temperatura ótima, o *Fusarium* INPA 4 foi estudado em uma faixa abrangendo de 20°C a 60°C, com intervalos de 10°C, em pH constante de 8,5. A atividade enzimática cresceu com o aumento da temperatura na faixa de 20°C a 30°C, porém, uma redução na atividade da enzima foi verificada em temperatura a partir de 40°C. O trabalho de Prazeres *et al.*, 2006, mostrou uma temperatura ótima para a lipase em estudo sendo na faixa de 50°C. Diversos pesquisadores determinaram que a

temperatura ótima das lipases geralmente está entre 30 e 60°C (HORCHANI et al., 2009; GAUR et al., 2008; SAXENA et al., 2003).

Apesar das vantagens no uso de enzimas em processos industriais, algumas desvantagens são observadas, dentre elas a sensibilidade das enzimas a variações de pH e temperatura. O efeito do pH na atividade das enzimas se dá devido ao fato de essas serem formadas por grupos químicos, na sua maior parte aminoácidos, que podem sofrer ionizações e adquirir cargas momentâneas, o que promove uma mudança conformacional da estrutura da enzima, afetando o modelo “chave-fechadura”. Já a temperatura influencia a atividade enzimática, no sentido de aumentar a energia cinética das moléculas e conseqüentemente aumentando a probabilidade de encontro entre a enzima e o substrato. Porém, a altas temperaturas a maioria das enzimas sofre mudanças conformacionais devido ao rompimento de ligações e interações fracas, um processo denominado de desnaturação que, para o caso da temperatura, é um processo irreversível. Apesar do processo de uso industrial exigir maiores cuidados quanto a pH e temperatura no uso da lipase do *Fusarium* INPA 4, a lipase oferece vantagens naturais dessas enzimas que justificam seu uso industrial, como: serem produtos naturais biológicos e biodegradáveis, apresentarem alta especificidade nas reações, não são consumidas durante o processo, aumentam a velocidade das reações por diminuir a energia de ativação e são estéreo seletivas (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Na análise preliminar de citotoxicidade, observou-se que nas duas amostras de caldo, a diluição 1/10, a mais concentrada, apresentou citotoxicidade moderada, pois matou 40% das células, ocorrendo o mesmo na segunda diluição, sendo a viabilidade celular de 83% no caldo que fermentou por 96 horas e 73% no caldo que fermentou em 120 horas. A partir da terceira diluição (1/40), o caldo que fermentou durante 96 horas não demonstrou citotoxicidade, ficando a viabilidade acima de 100%, enquanto o caldo

que fermentou durante 120 horas apresentou uma viabilidade de 85%. A partir da quarta diluição (1/80) nenhum dos caldos apresentou citotoxicidade. Este experimento pode ser melhor interpretado a partir da purificação e isolamento da lipase do *Fusarium* INPA 4, contudo estes experimento inicial pode-se inferir que o fungo não deve ser produtor de nenhuma substância potencialmente letal à células animais.

O presente estudo apresentou algumas limitações: a) A cinética dos melhores produtores não foi realizada, não permitindo comparar as produtividade dos isolados destacados em diferentes momentos; b) A investigação dos fatores na produção de lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4 deveria ter sido realizada por planejamento experimentais multi-variados com a finalidade de investigar a interação entre os fatores investigados.

O trabalho resultou no isolamento, na seleção e na otimização do isolado *Fusarium* INPA 4, um micro-organismo que apresenta um potencial a ser explorado para produção de lipases. Sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas com o objetivo de investigar as características bioquímicas das lipases produzidas, metodologias de concentração/purificação da enzima e, por fim, avaliação de escalonamento e viabilidade econômica.

6 CONCLUSÃO

- ❖ A partir das amostras de solo coletadas foi possível isolar fungos do Filo Ascomycota e os fungos mais freqüentemente encontrados foram aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, que também são descritos como mais freqüentes em trabalhos que utilizam amostras de solo.
- ❖ Todos os isolados obtidos se mostraram produtores de lipase, sendo que onze deles apresentaram uma alta produção de lipases. Os fungos *Penicillium* INPA83, *Fusarium* INPA 4, *Paecilomyces* INPA 53 e *Aspergillus* INPA 59 se destacaram quanto a produção de lipase.
- ❖ O isolado *Fusarium* INPA 4 foi selecionado para estudos subseqüentes, sendo realizada uma investigação dos fatores envolvidos no bioprocessamento. Entre os fatores analisados, os mais adequados para produção das lipases pelo isolado *Fusarium* INPA 4 foram: 15 g/L de óleo de soja, 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5, relação entre meio de cultura e vidraria de 1/5, inóculo inicial de 10^5 cels/mL, agitação orbital de 100 rpm e o tempo de 72 h.
- ❖ A atividade enzimática da lipase do *Fusarium* INPA 4 foi ótima no pH entre 7,0 e 9,0 e nas temperaturas entre 20 e 30°C.
- ❖ O ensaio de citotoxicidade realizado com caldos que fermentaram em 96 horas e em 120 horas, demonstrou moderada citotoxicidade nas duas primeiras diluições (1/10 e 1/20), mas a partir da terceira (1/40) a viabilidade celular ficou acima de 100%, não sendo observada citotoxicidade.
- ❖ O *Fusarium* INPA 4 pode ser uma fonte de lipase para futuras aplicações industriais, havendo antes a necessidade de estudos complementares que viabilizem o uso do potencial biotecnológico da enzima e seu produtor.

7 REFERÊNCIAS

ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos). Anuário ABIHPEC 2012. São Paulo: PUBLIC Projetos Editoriais, 2012.

ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos). Anuário ABIHPEC 2012. São Paulo: PUBLIC Projetos Editoriais, v. 21, 2014.

ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos). Anuário ABIHPEC 2012. São Paulo: PUBLIC Projetos Editoriais, v. 11, 2015.

ANDRADE, L. H.; PIOVAN, L.; PASQUINI, M. D. Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*: The role of glycerol as co-solvent. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 20, p. 1521-1525, 2009.

ANDRESON, J.M; INGRAN, J.S.I. 1993. *Tropical Soil Biology and Fertility: a handbook of methods*. Wallingford, UK, CAB International. p.221, 2003.

ANSORGE-SCHUMACHER, M.B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 6475--6490.

AZEVEDO, J.L. Fungos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 1:12-15, 1997.

BARNETT HL, HUNTER BB. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4a ed. USA: Burgess Publishing Co., 1998.

BARREIRO, E.; BOLZANI, V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BASSETT, E.J., KEITH, M.S., ARMELAGOS, G.J., MARTIN, D.L., 1980. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (AD 350). *Science* 209, 1532–1534.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, v. 98, n. 3, p. 426–438. 2011.

BON, E.; *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. vol.1, Editora Interciência, 2008.

BORGSTON, B. AND BROCKMAN, H. L., *Lipases*. Amsterdam, Elsevier (1984).

BORNEMAN, J. E.; TRIPLETTI, E. W. Molecular microbial diversity in soil from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63; N° 7, p. 2647-2653, 1997.

BRAKHAGE, A; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, n. 1, p. 15-22, 2011.

BUENO, C.S.; FISCHER, I.H.; ROSA, D.D.; FURTADO, E.L., Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. *Tropical Plant Pathology* 34 (5) September - October 2009.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S. GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D. Laboratory manual for *Fusarium* research. University of Sydney, Sydney-AUS. 1994.

BURKET, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, Essex, v. 91, p. 77-84, 2004.

CALDERON, L; SILVA-JARDIM, I; ZULIANI, J; SILVA, A; CIANCAGLINI, P; SILVA, L; STÁBELI, R. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. *Journal of the Brazillian Chemical Society*, v. 20, n. 6, p. 1011-1023, 2009.

CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme Microbial Technol.*, v.28, p. 145-154, 2001.

CARVALHO, P. O.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G.A. Kinetic Properties and Enantioselectivity of The Lipases Produced by Four *Aspergillus* Species. *Food Biotechnol.* 19 (2005)183–192.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificacao de oleos e gorduras por biotransformacao. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CAVALCANTI, M.A.Q., OLIVEIRA, L.G., FERNANDES, M.J. & LIMA, D.M. 2006. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20:831-837.

CELESTINO, J. R. ; CARVALHO, L. E.; LIMA, M.P.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; SOUZA, J.V. B. . Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochemistry* (1991), v. 49, p. 569-575, 2014.

CERNIA, E.; PALOCCI, C. Lipases in supercritical fluids. *Methods Ezymol.*,v. 296 (B), p. 495-508, 1997.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, p. 193–197, 2004.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CONTESINI, F. J.; SILVA, V. C. F.; MACIEL, R. F.; LIMA, R. J.; BARROS, F. F. C.; CARVALHO, P. D. Response surface analysis for the production of an enantioselective

lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation. *Journal of Microbiology*, v. 47, n.5, p. 563–571, 2009.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus* sp. lipase: Potencial biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.67 (2010) 163-171.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.26, p. 657-663, 2000.

DAVIDSON. E.A; ARTAXO, NETO P. Globally significant changes in biological processes of the Amazon Basin: results of the Large-Scale Biophere- Atmosphere Experiment. *Global Change Biology*, v.10, p 529-529, 2004.

DELGADO, P.G.; VECCHI, A.P.A.;FIGUEROA, L.;MICHELUZZI, R.; Tecnologias recentes para aplicação de enzimas em produtos cosméticos e um levantamento mercadológico 82-90, *Revista Científica da Faculdade Montessori*, Ano6- Número 6 - 2007.

DOMÍNGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M. A.; Sanromán, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 25, p. 1225-1229, 2003.

DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalyst for food processes. *Food Technology*, Chicago, v. 45, n. 1, p. 78-85, jan. 1991.

EL-DIASTY, E. M.; SALEM, R. M. Incidence of lipolytic and proteolytic fungi in some milk products and their public health significance. *Journal of Applied Sciences Research*, v. 3, n. 12, p. 1684-1688, 2007.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. EDUCS, Caxias do Sul, 2004.

EUROMONITOR. Euro Monitor World Cosmetics and Toiletries Directory. Euromonitor Internacional Pcl, 2009. Estatísticas Gerais. Euromonitor Internacional Ltd, 5ª Edição, 2011.

FERNANDES, M. L. M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 43-49, 2004.

FOX, C. A baby care skin protectant. *Cosmetics &Toiletries*, Carol Stream, n. 8, p. 34-38, ago. 2005

GADD, G. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, v. 111, n. 1, p. 3-49, 2007.

GAINEY, P. L.; *J. Agric. Res.* 1917, 10, 355.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. *Cosméticos: a química da beleza*, 2009. web. ccead.pucrio.br/condigital. Acesso em agosto de, 2015.

GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. D.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras, *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 2008.

GAUR, R.; ANSHU, G. et al.. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application, *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4796-4802, 2008.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases an overview of production, purification and biochemical properties, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 64, p. 763-781, 2004.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. *Acta Biotechnology*, v. 11, p. 159-167, 1991.

HARGREAVES, P.I. Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química). Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

HIRATUKA, C.; ARAÚJO, R.D.; MELLO, C.H.; CASADEI, J. Relatório de Acompanhamento Setorial (Volume II): Cosméticos. Projeto: Boletim de Conjuntura Industrial, Acompanhamento Setorial e Panorama da Indústria. Convênio: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI) e Núcleo de Economia Industrial e da Tecnologia do Instituto de Economia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP: Dezembro de 2008.

HORCHANI, H.; MOSBAH, H.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent

stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, p. 237-245, 2009.

HUBER, C.; MEYER, M. S.; SCHEREIER, T. *Cosmet. Toiletries*, 2004, 119, 49–50, 52–54, 56, 58.

JAEGER, K. E.; RANSAK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W.; *FEMS Microbiol. Rev.* 1994, 15, 29.

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

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*, Berlin, v. 31, p. 119-125, 2008.

LACAZ, C; PORTO, E; MARTINS, J. *Microbiologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8ª ed. São Paulo: Sarvier, 2001.

LEE, J.; PARULEKAR, S.J. Enhanced production of α -amylase in fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* TN106. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 42(29), p. 1142-1150, 1993.

LEWINSONHN, T. M.; Prado, P. I.; *Biodiversidade Brasileira – Síntese do Estado Atual do Conhecimento*, 1ª. ed., Ed. Pinsky: São Paulo, 2002, cap. 1, p. 17-25.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technology and Biotechnology*, Zagreb, v. 41, p. 105-110, 2003.

LINTNER, K. *Cosmet. Toiletries*, 2009, 124, 74, 76–78, 80.

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.

LUIZAO, F. J. Ciclos de nutrientes na Amazonia: respostas as mudanças ambientais e climáticas. In: E. A. DAVIDSON, ARTAXO, P. *Global Change Biology*, v.10, p. 519-529, 2004.

MAIA, M. M. D.; HEASLEY, A.; CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; MELO, E. H. M.; MORAIS JR., M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Biores. Technol.*, v.76, p. 23-27, 2001.

MAIORANO, A.E. Influência da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. São

Paulo, 1982. 144p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.

MAKHSUMKHANOV, A.A.; YAKUBOV, I.T.; DAVRANOV, K. Conditions for cultivation of the fungus *Penicillium melinii* UzLM-4 and its biosynthesis of lipases. *Appl. Biochem. Microbiol.*, v. 39, p. 40-43, 2003.

MANESSE, M. L. M.; COX, R. C.; KOOPS, B. C.; VERHEIJ H. U.; HAAS, G. H. EGMOND, M. R.; VAN DER HIJDEN H. T. W. M.; VLIEGS, J. Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. *Biochem.*, v. 34, p. 6400-6407, 1995.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim Biophys Acta* 1995;1258:272-6.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos, *Química Nova*, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MASUNAGA, T. *Cosmet. Sci. Technol. Ser.*, 2002, 25, 385-403.

MEHTRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology* 100 (2009) 1486-1490.

MELO, V; DESJARDINS, T; SILVA JR, M; SANTOS, E; SARRAZIN, M; SANTOS, M. Consequences of forest conversion to pasture and fallow on soil microbial biomass and activity in the eastern Amazon. *Soil Use and Management*, v. 28, n. 4, p. 530-535, 2012.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MEYRATH, J.; McINTOSH, A.F. Size of inoculum and carbon metabolism in some *Aspergillus* species. *Journal of General Microbiology*, v. 33, p. 47-56, 1963.

MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORKE, L.; GONZALES, J. Characteristics of an Immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.68, p.927-931, 1988.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*, ano 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MONTESINOS, J.L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M.A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÁ, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures

to lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 59, p. 25-37, 1996.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Mirobiologia e Bioquímica do solo*. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOUTINHO, P., Efeito da seca prolongada na Amazônia: quando a floresta torna-se inflamável?. Relatório técnico detalhado. Ref.: 1173/99, 2002.

NAKAMURA, K.; KINOSHITA, M.; OHNO, A. Effect of solvent on lipase-catalysed transesterification in organic media. *Tetrahed. Lett.*, v.50, p. 4681-4690, 1994.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*, n. 204, p. 205–208, 1997.

OBORSKA, A. *Sofw J.*, 2009, 135, 39–40, 42–44.

OLIVEIRA, B.H.; Imobilização e caracterização parcial de lipase Produzida por *Fusarium oxysporum* em fermentação Submersa. 2012. 133 f. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas). Programa de pós-graduação em ciências biológicas (microbiologia aplicada), Universidade Estadual Paulista.

OLSON, G.R.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.*, v. 176, p. 1-6, 1994.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *Rev. Saúde e Biol.*, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, v.18, p. 37- 45, 2003.

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

PASTORE, G. M.; COSTA, V. D. S. R. D.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp., *Ciência e Tecnologia Alimentar*, v. 23, p. 135-140, 2003.

PERICIN, D.M.; MADAREV-POPOVIC, S.V.; RADULOVIC-POPOVIC, L.M. Optimization of condition for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology, *Biotechnology Letters*, v.31, p. 43-47, 2009.

PETIT, P; LUCAS, E; ABREU, L; PFENNING, L; TAKAHASHI, J. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. Isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 12, n. 4, p. 1-9, 2009.

PETROVIC, S.E.; SKRINJAR, M.; BECAREVIC, A.; VUJICIC, I.F.; BANKA, L. Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechno. Lett.*, v. 12, p. 299-304, 1990.

PRADO, K. L. L. Microrganismos produtores de amilase, celulase, fosfatase, lipase, protease e urease nos solos amazonicos do ramal do Brasileirinho (Manaus) e de Urucu (Coari). 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de mestrado em biotecnologia e recursos naturais, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

PRAZERES, J.N., BORTOLLOTTI, J.A.C., PASTORE, G.M. 2006. Characterization of Alkaline Lipase from *Fusarium oxysporum* and the Effect of Different Surfactants on the Enzyme Activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 505-509.

RAPP, P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*. *Enz. Microbiol Technol.*, v. 17, p. 832-838, 1995.

ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PÊRA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, n. 4, p.861-866, 2007.

ROSSELO-MORA, R; AMANN, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

SAID, S.; PIETRO, R.; *Enzimas de Interesse industrial e biotecnológico*, Ed Eventos: Rio de Janeiro, 2002.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial -processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351- 362.

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

SCHUSTER, S.et al. On the Safety of *Aspergillus niger*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Berlin, v.59, p. 426-435, 2002.

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

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

SIM, Y. C.; NAM, Y. S.; SHIN, E.; KIM, S.; CHANG, I. S.; RHEE, J. S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer. *Pharmazie*, Berlin, v. 58, n. 4, p. 252-256, abr. 2003.

SOUZA, H; OLIVEIRA, L; ANDRADE, J. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 28, p. 116-124, dez. 2008.

SOUZA, J; LIMA, A; MARTINS, E; SALEM, J. Anti-mycobacterium activity from culture filtrates obtained from the dematiaceous fungus C10. *Journal of Yeast and Fungal Research*, v. 2, n. 3, p. 28-32, 2011.

SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solidstate fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis, *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2607–2612, 2009.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Bioche.*, v. 39, p. 459-465, 2003.

TAKAHASHI, J; LUCAS, E. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; DE MARCO, J. L.; POÇAS-FONSECA, M. J.; FELIPE, M. S. S. O uso de leveduras e fungos filamentosos para a expressão heteróloga de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 55-70.

TORSVIK, V.; OVERAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, Oxford, v. 5, p. 240 - 245, 2002.

VARGAS, G. D. L. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M.G.; DI LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 83, p. 47-54, 2008.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam, v. 9, p. 113-148, 2000.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMEROGOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v.13, n. 2, p.157-167, mar. 2003.

VULFSON, E. N. Em *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*; WOOLEY, P.; PETERSEN, S. B., eds.; Cambridge University Press: Great Britain, 1994.

WANG, X.; YU, X.; XU, Y. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 94-102, 2009.

WELSH & WILLIAMS, R.E. Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil. *J.Food Sci.*, v.54, p. 1565-1568, 1989.

WHITAKER, A.; LONG, P.A. Fungal pelleting. *Process Biochemistry*, v. 8, p. 27-31, 1973.

YIN, J.; STRAIGHT, P.D.; HRVATIN, S.; DORRESTEIN, P.C.; BUMPUS, S.B.; JAO, C.; KELLEHER, N.L., KOLTER, R., WALSH, C.T., 2007. Genome-wide high-throughput mining of natural product biosynthetic gene clusters by phage display. *Chem. Biol.* 14, 303–312.

YOSHIDA, F.; MOTA, H.; ICHISHIMA, E. Effect of lipid materials on the production of lipase by *Torulopsis emobii*. *Applied Microbiology*. v. 16, p. 845-847, 1968.

YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 42 (2007), 384-391.

YU, H-W.; HAN, J.; LI, N.; QIE, X-S.; JIA, Y-M. Fermentation Performance and Characterization of Cold-Adapted Lipase Produced with *Pseudomonas* Lip35, *Agricultural Sciences in China*, v. 8, p. 956-962, 2009.

ZAREVUCKA, M.; KEJIK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DENEVORÁ. Enantioselective properties of induce lipases from *Geotrichum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 481-486, 2005.

APÊNDICE A: Identificação e codificação dos gêneros dos fungos isolados do solo Amazônico.

Nº	Amostra	Código
1	<i>Aspergillus</i>	INPA 1
2	<i>Trichoderma</i>	INPA 2
3	<i>Aspergillus</i>	INPA 3
4	<i>Fusarium</i>	INPA 4
5	<i>Trichoderma</i>	INPA 5
6	<i>Fusarium</i>	INPA 6
7	<i>Trichoderma</i>	INPA 7
8	<i>Aspergillus</i>	INPA 8
9	<i>Penicillium</i>	INPA 9
10	<i>Penicillium</i>	INPA 10
11	<i>Penicillium</i>	INPA 11
12	<i>Aspergillus</i>	INPA 12
13	<i>Trichoderma</i>	INPA 13
14	<i>Trichoderma</i>	INPA 14
15	<i>Penicillium</i>	INPA 15
16	<i>Penicillium</i>	INPA 16
17	<i>Trichoderma</i>	INPA 17
18	<i>Penicillium</i>	INPA 18
19	<i>Penicillium</i>	INPA 19
20	<i>Penicillium</i>	INPA 20
21	<i>Penicillium</i>	INPA 21
22	<i>Aspergillus</i>	INPA 22
23	<i>Aspergillus</i>	INPA 23
24	<i>Acremonium</i>	INPA 24
25	<i>Aspergillus</i>	INPA25
26	<i>Trichoderma</i>	INPA 26
27	<i>Trichoderma</i>	INPA 27
28	<i>Aspergillus</i>	INPA 28
29	<i>Aspergillus</i>	INPA 29
30	<i>Aspergillus</i>	INPA 30
31	<i>Penicillium</i>	INPA 31
32	<i>Aspergillus</i>	INPA 32
33	<i>Penicillium</i>	INPA 33
34	<i>Rhodotorula</i>	INPA 34
35	<i>Aspergillus</i>	INPA 35
36	<i>Aspergillus</i>	INPA 36
37	<i>Penicillium</i>	INPA 37
38	<i>Oidiondendron</i>	INPA 38

39	<i>Penicillium</i>	INPA 39
40	<i>Aspergillus</i>	INPA 40
41	<i>Rhodotorula</i>	INPA 41
42	<i>Aspergillus</i>	INPA 42
43	<i>Aspergillus</i>	INPA 43
44	<i>Aspergillus</i>	INPA 44
45	<i>Aspergillus</i>	INPA 45
46	<i>Trichoderma</i>	INPA 46
47	<i>Aspergillus</i>	INPA 47
48	<i>Aspergillus</i>	INPA 48
49	<i>Penicillium</i>	INPA 49
50	<i>Aspergillus</i>	INPA 50
51	<i>Aspergillus</i>	INPA 51
52	<i>Aspergillus</i>	INPA 52
53	<i>Paecilomyces</i>	INPA 53
54	<i>Penicillium</i>	INPA 54
55	<i>Trichoderma</i>	INPA 55
56	<i>Trichoderma</i>	INPA 56
57	<i>Aspergillus</i>	INPA 57
58	<i>Penicillium</i>	INPA 58
59	<i>Aspergillus</i>	INPA 59
60	<i>Aspergillus</i>	INPA 60
61	<i>Aspergillus</i>	INPA 61
62	<i>Penicillium</i>	INPA 62
63	<i>Aspergillus</i>	INPA 63
64	<i>Penicillium</i>	INPA 64
65	<i>Aspergillus</i>	INPA 65
66	<i>Aspergillus</i>	INPA 66
67	<i>Aspergillus</i>	INPA 67
68	<i>Aspergillus</i>	INPA 68
69	<i>Penicillium</i>	INPA 69
70	<i>Aspergillus</i>	INPA 70
71	<i>Aspergillus</i>	INPA 71
72	<i>Aspergillus</i>	INPA 72
73	<i>Aspergillus</i>	INPA 73
74	<i>Penicillium</i>	INPA 74
75	<i>Penicillium</i>	INPA 75
76	<i>Penicillium</i>	INPA 76
77	<i>Oidiodendron</i>	INPA 77
78	<i>Penicillium</i>	INPA 78
79	<i>Trichoderma</i>	INPA 79
80	<i>Trichoderma</i>	INPA 80

81	<i>Penicillium</i>	INPA 81
82	<i>Oidiondendron</i>	INPA 82
83	<i>Penicillium</i>	INPA 83
84	<i>Penicillium</i>	INPA 84
85	<i>Aspergillus</i>	INPA 85
86	<i>Penicillium</i>	INPA 86
87	<i>Penicillium</i>	INPA 87
88	<i>Penicillium</i>	INPA 88
89	<i>Paecilomyces</i>	INPA 89
90	<i>Aspergillus</i>	INPA 90
91	<i>Penicillium</i>	INPA 91
92	<i>Paecilomyces</i>	INPA 92
93	<i>Penicillium</i>	INPA 93
94	<i>Penicillium</i>	INPA 94
95	<i>Aspergillus</i>	INPA 95
96	<i>Penicillium</i>	INPA 96
97	<i>Aspergillus</i>	INPA 97
98	<i>Penicillium</i>	INPA 98
99	<i>Aspergillus</i>	INPA 99
100	<i>Fusarium</i>	INPA 100