

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Roberta Flôres Silva

**ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ACTINOMICETOS PROVENIENTES DE SOLO
IMPACTADO COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS FRENTE A DIFERENTES
ÓLEOS VEGETAIS**

Porto Alegre

2014

ROBERTA FLÔRES SILVA

ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ACTINOMICETOS PROVENIENTES DE SOLO
IMPACTADO COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS FRENTE A DIFERENTES ÓLEOS
VEGETAIS

Trabalho de Conclusão apresentado como requisito para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientação: Prof^a Dr^a Sueli Teresinha Van Der Sand
Coorientação: Dr^a Elisandra Minotto

Porto Alegre

2014

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa.”

Madre Tereza de Calcutá

ARTIGO CIENTÍFICO:

Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Biociências.

Atividade lipolítica de actinomicetos provenientes de solo impactado com resíduos petroquímicos frente a diferentes óleos vegetais

Roberta Flôres Silva ¹*, Elisandra Minotto ², Sueli Teresinha Van Der Sand ³

¹ **Acadêmico do curso de Ciências Biológicas.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

² **Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

³ **Docente Orientador.** Universidade federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: robertinha.fsilva@gmail.com

RESUMO

Actinomicetos são bactérias Gram positivas que exibem uma grande variedade de características morfológicas e metabólicas. O principal habitat é o solo, representando mais de 30% da comunidade. Os actinomicetos são produtores de enzimas extracelulares, que podem degradar macromoléculas complexas; além disso, podem sintetizar e excretar metabólitos como os antibióticos. A aplicação dessas enzimas extracelulares, principalmente as lipases, vem se apresentando como uma alternativa para a hidrólise de óleos e gorduras e, por isso, têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos. A principal aplicação tem sido como aditivos em detergentes, pois facilitam os processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a solubilização destas biomoléculas em água. O presente estudo teve como objetivos avaliar a atividade lipolítica de isolados de actinomicetos provenientes de solo impactado com resíduos petroquímicos frente a diferentes temperaturas de incubação e óleos vegetais; e a seleção actinomicetos produtores de lipases para posterior estudo de produção e caracterização das mesmas. Para o estudo de produção enzimática, foram utilizados 20 isolados que apresentaram crescimento significativo em ágar amido caseína ou ISP2. A hidrólise dos diferentes óleos foi observada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 350nm. A atividade lipolítica foi observada em 18 isolados, variando conforme o substrato e a temperatura. Os resultados mostraram que à medida que a temperatura aumentava, aumentava o número de isolados com atividade lipolítica para a maioria dos óleos testados deixando claro que a atividade da enzima lipase depende da temperatura de incubação e do tipo de substrato empregado.

Palavras-chave: actinomicetos; hidrólise; lipases.

ABSTRACT

Actinomycetes are Gram-positive bacteria, which exhibit a large variety of morphological and metabolic characteristics. Their main habitat is the soil, representing over 30% of the microbial population present therein. The actinomycetes are producers of extracellular enzymes that degrade complex macromolecules; furthermore, they can synthesize and excrete metabolites, such as antibiotics. Application of these extracellular enzymes, mainly lipases, has been presented as an alternative to the hydrolysis of oils and fats, and therefore have been used in a variety of biotechnological sectors. The major applications have been as additives in detergents, because they facilitate the cleaning process, hydrolyzing the lipids and favoring the solubilization of these biomolecules with water. The present study aimed to evaluate the lipolytic activity of actinomycetes isolated from soil degraded with petrochemical residues using different incubation temperatures and vegetable oils; and the actinomycetes producers of lipases for further study on the production and characterization of them. For the study of enzyme production 20 isolates were used which exhibited significant growth in starch casein agar or ISP2. The hydrolysis of different oils was observed under ultraviolet light with a wavelength of 350nm. The lipase activity was observed for 18 isolates, varying according to the substrate and temperature of the assay. The results showed that as the temperature increased, the number of isolates with lipolytic activity increased for most of the tested oils making it clear that the activity of lipase depends on the incubation temperature and the type of substrate employed.

Keywords: actinomycetes; hydrolysis; lipases.

INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente complexo, e sua estrutura é determinada por processos químicos e físicos e fortemente influenciado por fatores ambientais (Alef e Nannipieri 1995, Ding *et al.* 2004). Segundo, Dubey *et al.* (2006) ele é um repositório de diversos microrganismos, e tem sido frequentemente utilizado para isolar e explorar os microrganismos para aplicações industriais, ambientais e agrícolas. As enzimas do solo são predominantemente de origem microbiana e estão intimamente relacionadas com a abundância e/ou a atividade microbiana (Insan 2001). Ko *et al.* (2005), com o objetivo de detectar microrganismos lipolíticos a partir do solo de uma fazenda em Taiwan, observaram que a maior parte dos microrganismos produtores de enzimas lipolíticas eram actinomicetos, seguidos de outros grupos bacterianos e fungos e, que estes grupos de microrganismos, vêm apresentando uma grande importância na decomposição de óleos em matéria orgânica no solo.

Os actinomicetos pertencem a um grupo distinto de bactérias amplamente distribuídos na natureza (Semêdo *et al.* 2001). Estes microrganismos são bactérias Gram positivas, com alto conteúdo de G+C no seu DNA (Monciardini *et al.* 2002), e exibem uma grande variedade morfológica e metabólica (Ensign 1978, Nett *et al.* 2009). O seu principal habitat é o solo, representando mais de 30% da população de microrganismos presentes neste ambiente, onde desempenham um papel importante na ciclagem de compostos orgânicos (Kennedy 1999). Entre as actinobactérias, o gênero *Streptomyces* representa mais de 90% do total de actinomicetos presentes no solo (Xu *et al.* 1996).

Uma característica dos actinomicetos é a produção de enzimas extracelulares, que degradam macromoléculas complexas encontradas no solo, além de sintetizar e excretar metabólitos, como antibióticos, entre outros (Moreira & Siqueira 2006). Segundo Gupta *et al.*

(2004), a maior parte do mercado de enzimas industriais é ocupado por enzimas hidrolíticas, como proteases, amilases, amidases, esterases e lipases. A aplicação dessas enzimas, principalmente as lipases, vem se apresentando como uma alternativa atrativa para a hidrólise de óleos e gorduras, principalmente quando são consideradas algumas vantagens como obter produtos biodegradáveis, diminuir o consumo de energia e reduzir a quantidade de resíduos (Castro *et al.* 2004).

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) são uma classe de hidrolases que catalisam a hidrólise de triglicerídeos para glicerol e ácidos graxos livres, na presença de uma interface óleo-água (Treichel *et al.* 2008), demonstrando níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes aquosos e não-aquosos, ao contrário de outras enzimas (Hasan *et al.* 2006, Martins *et al.* 2008, Saxena *et al.* 1999). Sua atividade tem sido detectada em meio de cultura que contém substratos lipídicos, como por exemplo, óleo de oliva, sugerindo que a produção da enzima lipase seja induzida por estes substratos (Deive *et al.* 2003). As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (Castro *et al.* 2004). Estas enzimas são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (Treichel *et al.* 2008, Yang *et al.* 2005). Alguns gêneros de bactérias produtoras de lipase incluem *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* (Gupta *et al.* 2004, Rathi *et al.* 2002, Treichel *et al.* 2008).

As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, onde já representam cerca de 35% dentre as enzimas empregadas (Paques & Macedo 2006). Elas têm sido utilizadas em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), óleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para

tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel (Carvalho *et al.* 2005). Uma das principais aplicações industriais das lipases tem sido como aditivos em detergentes, pois facilitam os processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a solubilização destes em água (Hasan *et al.* 2006, Pandey *et al.* 1999). Enzimas detergentes já representam quase 32% do total das vendas de lipases (Lailaja & Chandrasekaran 2013).

Os detergentes que apresentam este tipo de enzima são especialmente selecionados para atender aos seguintes requisitos: baixa especificidade do substrato, ou seja, capacidade de hidrolisar gorduras de diversas composições, resistência à lavagem em condições diversas, como ampla faixa de pH (10 e 11) e ampla faixa de temperatura (30 a 60°C), e resistência aos danos causados pelas enzimas tensioativas (proteases, muito utilizadas na formulação de detergentes) (Hasan *et al.* 2006, Sharma *et al.* 2001). Vários produtos comerciais têm na sua composição lipases bacterianas, entre eles o Lumafast, com lipase de *Pseudomonas mendocina*, e o Lipomax, com lipase de *Pseudomonas alcaligenes*, ambas produzidas pela Genencor International (Gupta *et al.* 2004, Jaeger e Reetz, 1998).

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade lipolítica de isolados de actinomicetos provenientes de solo impactado com resíduos petroquímicos frente a diferentes temperaturas de incubação e óleos vegetais e selecionar actinomicetos potenciais produtores de lipases para posterior estudo de produção e caracterização.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizados nesse estudo, 29 actinomicetos isolados a partir de uma célula de *landfarming* do Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos do Polo Petroquímico do Sul (SICECORS), que desde 1986 recebe resíduos petroquímicos da companhia

Petroquímica do Sul, atual Brasken, localizada no município de Triunfo, Rio Grande do Sul. Todas as amostras são pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da UFRGS. A coleta, o isolamento e a identificação das amostras por características morfológicas, taxonômicas e moleculares foram realizadas por Duarte (2012). Todos os isolados pertencem ao gênero *Streptomyces* e estavam conservados em tubos de ensaio contendo meio inclinado ágar amido caseína (ACA) a 4°C.

Recuperação das Amostras

Os actinomicetos foram semeados em placas contendo o meio ágar amido caseína (ACA) (amido 1%, caseína 0,03%, KNO₃ 0,2%, Na Cl 0,2%, K₂HPO₄ 0,02%, MgSO₄ 0,005%, FeSO₄ 0,001%, CaCO₃ 0,002% e ágar 1,5%) através da técnica de esgotamento para verificação da pureza das colônias. Os isolados que não apresentaram crescimento em ACA foram semeadas em meio ISP2 (extrato de levedura 0,4%, extrato de malte 1%, dextrose 0,4% e ágar 2%). A incubação em ambos os meios ocorreu a uma temperatura de 28°C por no mínimo sete dias. Após o crescimento as amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) para posterior utilização em estudos de atividade enzimática.

Atividade Lipolítica

Dentre os 29 actinomicetos, 20 foram utilizados por apresentarem crescimento significativo em placas, após a recuperação dos mesmos, sendo assim escolhidos para o estudo de produção enzimática. A atividade lipolítica foi observada após o crescimento dos microrganismos em meio de Kouker & Jaeger (1987) modificado contendo peptona 0,5%, extrato de levedura 0,1%, NaCl 0,4%, ágar 1% e solução de rodamina B 0,1%. O meio de cultura foi previamente autoclavado e resfriado a uma temperatura de 60°C para a adição dos

óleos vegetais: amendoim, canola, cártamo, castanha do Pará, chia e girassol, todos da marca *Pazze*; coco, da marca *Copra*; linhaça, da marca *Giroil*; oliva, da marca *Carbonell*; semente de uva, da *Pharmacenter* – farmácia de manipulação e cosméticos). Os óleos vegetais foram esterilizados individualmente, por filtração, em um sistema de membrana de 0,22µm e posteriormente adicionados ao meio de cultura, a uma concentração de 2,5%. Os isolados foram inoculados em placas de petri na forma de picada, quatro isolados por placa e incubados durante 28 dias nas temperaturas de 28°C, 35°C e 45°C, sendo que todos os ensaios foram realizados em duplicata. A leitura das placas foi feita semanalmente e a hidrólise dos diferentes óleos foi observada sob luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 350nm. Os actinomicetos capazes de produzir a enzima apresentaram halos de cor alaranjada ao redor e/ou sobre os isolados, devido à presença de rodamina B no meio de cultura, que emite fluorescência laranja na presença de ácidos graxos resultantes da hidrólise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstram o aumento da produção de lipases quando óleos são utilizados no meio de cultura como indutores da secreção enzimática (Hiol *et al.* 1999, Sharma *et al.* 2001, Tan *et al.* 2003). Dentre os 20 isolados de actinomicetos empregados nesse estudo, 18 deles apresentaram atividade lipolítica, variando conforme o substrato e a temperatura de incubação utilizados. Dentre todos os óleos utilizados, o óleo de linhaça foi o substrato mais hidrolisado, sendo degradado por 65% dos isolados na temperatura de 35°C. Para as três temperaturas analisadas, a melhor temperatura de incubação foi observada a 45°C, pois houve um aumento no número de isolados que hidrolisaram os diferentes óleos utilizados. Então, à medida que a temperatura de incubação aumentou, também aumentou o número de isolados que hidrolisaram a maioria dos óleos utilizados (Figura 1).

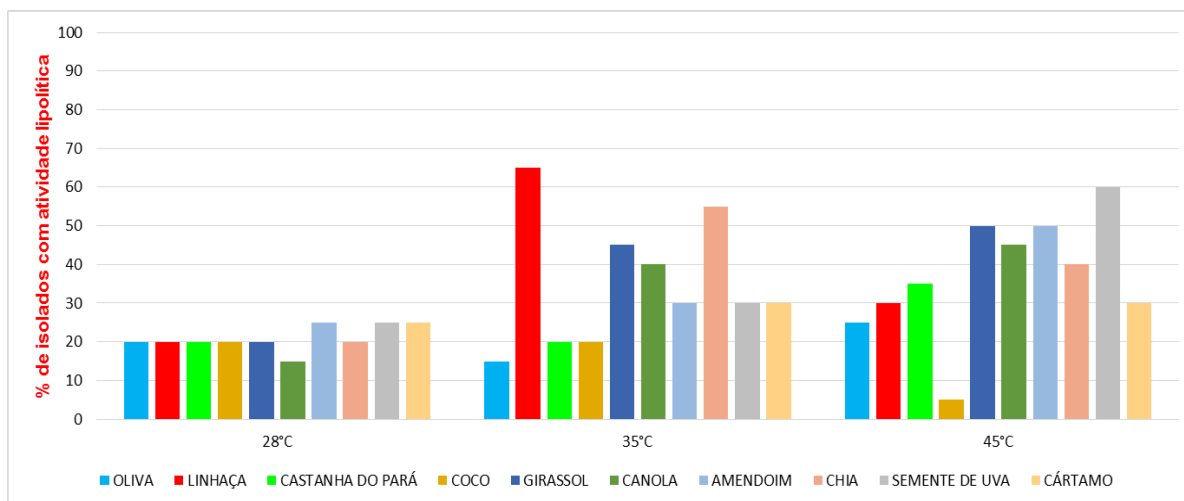
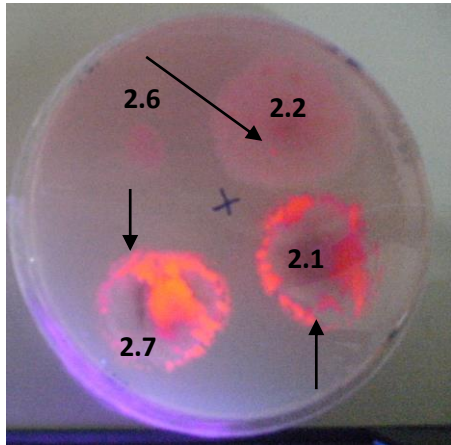


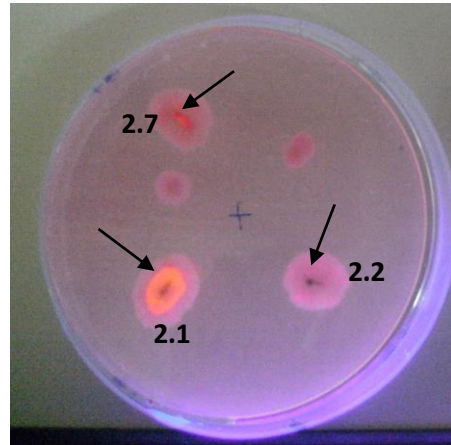
Figura 1: Porcentagem de isolados positivos para atividade lipolítica frente os diferentes substratos e temperaturas de incubação utilizado nos ensaios.

Dos substratos testados nos ensaios, o óleo de chia foi hidrolisado por 55% dos isolados à temperatura de 35°C, por 40% a 45°C e por somente 20% à temperatura de 28°C. Para o óleo de girassol a hidrólise ocorreu com 50% dos isolados à temperatura de 45°C, 45% a 35°C e 20% a uma temperatura de 28°C. Por sua vez, o substrato óleo de canola foi hidrolisado por 45% dos isolados à temperatura de 45°C, 40% a 35°C e 15% a uma temperatura de 28°C. O substrato óleo de amendoim foi hidrolisado por 50% dos isolados a 45°C, 30% a 35°C e 25% a uma temperatura de 28°C. O óleo de semente de uva, na temperatura de 45°C, foi hidrolisado por 60% dos isolados, 30% a 35°C e 25% a 28°C. O óleo de linhaça foi degradado por 65% dos isolados na temperatura de 35°C, porém, nas temperaturas de 28 e 45°C, ele foi degradado, respectivamente, por 20 e 30% dos isolados. Os óleos de castanha do Pará, coco e cártamo foram degradados por cerca de 30% dos isolados. Nas figuras 2 a 5 pode-se observar a atividade lipolítica de alguns isolados quando observados sob luz UV.



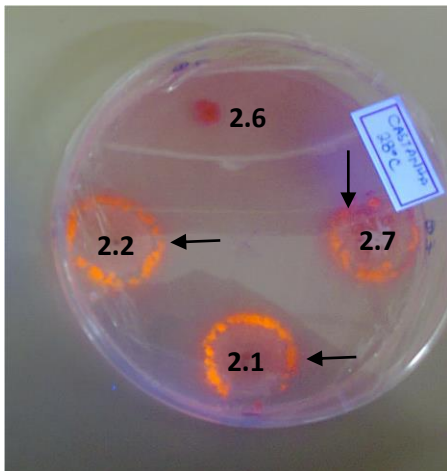
Fonte: a autora

Figura 2: Hidrólise do óleo de Oliva a 28°C. Os isolados positivos para lipase estão marcados com flechas. Tempo de incubação: 21 dias.



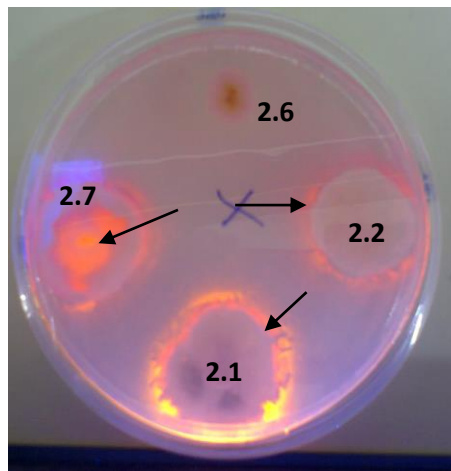
Fonte: a autora

Figura 3: Hidrólise do óleo de Linhaça a 28°C. Os isolados positivos para lipase estão marcados com flechas. Tempo de incubação: 14 dias.



Fonte: a autora

Figura 4: Hidrólise do óleo de Castanha do Pará a 28°C. Os isolados positivos para lipase estão marcados com flechas. Tempo de incubação: 28 dias.



Fonte: a autora

Figura 5: Hidrólise do óleo de Cártamo a 35°C. Os isolados positivos para lipase estão marcados com flechas. Tempo de incubação: 28 dias.

Rashid *et al.* (2001) em seus ensaios observaram que 35°C foi temperatura ótima para a atividade lipolítica de lipases isoladas de *Pseudomonas* sp. Abbas *et al.* (2002) que estudaram a lipase de *Mucor* sp. observaram que a lipase era mais ativa no intervalo de temperaturas entre 30 a 45°C, com uma atividade máxima em 35°C. No entanto, a temperatura ótima para a atividade lipolítica varia muito entre as espécies produtoras da enzima e também entre as lipases produzidas por determinado organismo. Duza & Mastan

(2014) estudando isolados de *Achromobacter xylosoxidans* (TS2MCN) e *Bacillus thuringiensis* (TS11BP) observaram que a melhor atividade lipolítica destes microrganismos ocorreu a 45°C. Resultados similares foram encontrados por Chakraborty & Raj (2008), Rahman *et al.* (2005) e Kojima *et al.* (2003) que encontraram 45°C como temperatura ótima para *Bacillus licheniformis* MTCC 6824, *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas fluorescens* HU380, respectivamente.

Em relação aos isolados do presente estudo, nenhum hidrolisou 100% dos óleos utilizados em todas as temperaturas testadas (Tabela 1). Os isolados 1.10, 2.1 e 2.7, degradaram a maioria dos óleos nas três temperaturas utilizadas (a exceção foram os óleos de coco e cártamo que não foram hidrolisados por esses isolados na temperatura de 45°C e o óleo de canola que não foi hidrolisado pelos isolados 2.1 e 2.7 na temperatura de 28°C). Os isolados 1.2, 1.5, 1.8, 1.9 e 1.19 foram os que degradaram a menor quantidade de óleos testados (apenas um óleo em uma única temperatura), enquanto que os isolados 1.1 e 1.7 não degradaram nenhum dos óleos em nenhuma das três temperaturas testadas (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade lipolítica por diferentes isolados frente aos diferentes óleos e temperaturas de incubação testadas.

Nº Isolado	Oliva			Linhaça			Castanha			Coco			Girassol			Canola			Amendoim			Chia			Sem. de Uva			Cártamo			
	28°C	35°C	45°C	28°C	35°C	45°C	28°C	35°C	45°C	28°C	35°C	45°C	28°C	35°C	45°C	28°C	35°C	45°C	28°C	35°C	45°C	28°C	35°C	45°C	28°C	35°C	45°C	28°C	35°C	45°C	
1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1.8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1.9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1.10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
1.14	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	
1.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
1.16	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	
1.17	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
1.18	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	
1.19	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1.21	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
1.22	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	
2.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
2.2	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
2.6	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
2.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+) atividade lipolítica positiva; (-) atividade lipolítica negativa

Os resultados demonstram que a atividade lipolítica depende não só da temperatura de incubação mas do tipo de substrato empregado. Treichel *et al.* (2008) observaram em seus estudos que as lipases microbianas são influenciadas pela composição do meio, bem como pelos fatores físico-químicos. Além disso, a composição dos diferentes óleos pode ter influenciado a produção da lipase, já que a maioria dos óleos testados nesse ensaio, são ricos em ácidos graxos insaturados de cadeia longa. Wang *et al.* (2008) demonstraram que a capacidade do óleo de oliva induzir a produção da lipase pode ser atribuída à sua composição, formada em mais de 70% por ácido oleico. Estes ácidos insaturados de cadeia longa como ácido oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) são conhecidos por aumentarem a produção de lipases em várias bactérias (Ghosh *et al.* 1996), ou seja, são os melhores substratos para a atividade da lipase (Nthangeni *et al.* 2001). Nesse estudo, o substrato mais degradado foi o óleo de linhaça, rico em ácido linolênico (Cupersmid, *et al.* 2012). Para Correia *et al.* (2014), as propriedades dos óleos vegetais são determinadas por sua composição em ácidos graxos, e uma das características influenciada pela composição é a estabilidade térmica, ou seja, óleos com ácidos graxos saturados são mais estáveis do que os insaturados. Isso pode explicar o fato do óleo de coco ter sido um dos óleos menos hidrolisados (cerca de 20%), já que este é rico em ácido láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0), que são ácidos graxos saturados de cadeia média (Correia *et al.* 2014).

As lipases possuem grande potencial para aplicações comerciais devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade de substrato (Cardenas *et al.* 2001, Bora *et al.* 2013). As lipases termoestáveis de origem microbiana são altamente vantajosas para aplicações biotecnológicas, uma vez que podem ser produzidas a baixo custo e apresentarem uma melhor estabilidade (Hassan *et al.* 2006). Essa estabilidade é uma das características requeridas para as enzimas com aplicação industrial, visto que muitos processos utilizam faixas extremas de temperatura (Messias *et al.* 2011). Segundo Haki & Rakshit (2003), as

lipases termoestáveis são usadas em indústrias óleo-químicas, de celulose, de produtos farmacêuticos, de cosméticos, de couro e de detergentes. A fabricação de detergentes biológicos, por exemplo, é uma tecnologia em rápido crescimento (Granti *et al.* 1992). Rathi *et al.* (2001) observaram que a lipase de *Burkholderia cepacia* era mais ativa no intervalo de 25 a 55°C, tornando-a um aditivo potencial para formulação de detergentes. Nerurkar *et al.* (2013) observaram que a lipase da bactéria marinha, *Bacillus sonorensis*, exibia uma atividade máxima em condições alcalinas mostrando-se estável ao longo de um intervalo de temperatura, desde a temperatura ambiente até 60°C, também podendo ser utilizada como aditivos em detergentes. A importância de obter-se enzimas com atividade em temperaturas mais altas é de fundamental importância para indústria devido a variabilidade de suas aplicações.

CONCLUSÕES

A maioria dos isolados apresentou atividade lipolítica e hidrolisou diversos substratos em diferentes temperaturas. O isolamento de novos microrganismos produtores de lipases e a caracterização de suas atividades lipolíticas são passos importantes para consolidar a busca de enzimas com potencial biotecnológico, podendo estes e/ou seus metabólitos serem utilizados em diferentes segmentos industriais.

PERSPECTIVA

Como perspectiva será realizada uma análise qualitativa da atividade da enzima e, por conseguinte, a seleção dos actinomicetos com melhor potencial lipolítico. Além disso, pretende-se otimizar o cultivo e a produção da lipase e proceder a sua caracterização.

AGRADECIMENTOS

A minha professora e orientadora, Dra. Sueli Van Der Sand, que tornou possível a concretização desse projeto. Muito obrigada pela amizade, confiança e, principalmente, pela paciência.

Aos meus pais pelo amor incondicional, carinho, dedicação, confiança, suporte e encorajamento durante todos os momentos da minha vida e, em especial, a minha irmã Fernanda pelo amor, suporte e compreensão. Obrigada por nunca desistir de mim.

Às amigas Bruna Mello, Cássia Souza, Jacqueline Meyer, Jeniffer Conte que me proporcionaram momentos de muitas risadas e alegrias durante a graduação e, em especial, a Thaís Martins pela amizade, ajuda e suporte nos momentos mais difíceis. Obrigada por tudo!! Jamais esquecerei cada uma de vocês.

Aos amigos Dean e Samoel por toda ajuda, amizade e apoio.

Ao meu priminho Enzo, nosso “anjinho da guarda”, por ter mudado as nossas vidas e em especial a da minha mãe. Obrigada por todo esse amor e carinho.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H., HIOL, A., DEYRIS, V. & COMEAU, L. 2002. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:968–975.

ALEF, K. & NANNIPIERI, P. (Eds.). 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Londres: Academic Press. 576 p.

BORA, L., GOHAIN, D. & DAS, R. 2013. Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88:1959–1970.

- CARDENAS, F., DE CASTRO, M. S., SANCHEZ-MONTERO, J. M., SINISTERRA, J. V., VALMASEDA, M., ELSON, S.W. & ALVAREZ, E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:145–154.
- CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. AP., MARASSI, M., SILVA, D. M., CONTESINI, F. J. & BIZACO, R. 2005. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, 28(4):614-621.
- CASTRO, H. F., MENDES, A. A., SANTOS, J. C. & AGUIAR, C. L. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27:146-156.
- CHAKRABORTY, K. & RAJ, P. R. 2008. An extra-cellular alkaline metallo-lipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, 109:727-736.
- CORREIA, I. M. S., ARAÚJO, G. S., PAULO, J. B. A. & SOUSA, E. M. B. D. 2014. Avaliação das potencialidades e características físico-químicas do óleo de Girassol (*Helianthus annuus L.*) e Coco (*Cocos nucifera L.*) produzidos no Nordeste brasileiro. *Scientia Plena*, 10(3):1-7.
- CUPERSMID, L., FRAGA, A. P. R., DE ABREU, E. S., ROSIER, I. & PEREIRA, O. 2012. Linhaça: composição química e efeitos biológicos. *E-Scientia*, 5(10):33-40.
- DEIVE, F. J., COSTAS, M. & LONGO, M. A. 2003. Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters* 25:1403–1406
- DING, C. H., DIANG, Z. Q., LI, X. T., LI, L. Q. & KUSAKABE, I. 2004. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1):7-10.
- DUARTE, M. W. 2012. *Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo: produção de metabólitos secundários por actinomicetos de solo*. 109 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- DUBEY, S. K., TRIPATHI, A. K. & UPADHYAY, S. N. 2006. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. *Bioresource Technology*, 97:2217–2224.

- DUZA, M. B. & MASTAN, S. 2014. Optimization of Lipase Production from *Bacillus thuringiensis* (TS11BP), *Achromobacter xylosoxidans* J2 (TS2MCN) –Isolated from Soil sediments near oilseed farm. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(2):66-76.
- ENSIGN, J.C. 1978. Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Annual Review Microbiology*, 32:185–219.
- GHOSH, P. K., SAXENA, T. K., GUPTA, R., YADAV, R. P. & DAVIDSON, S. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Science Progress*, 79:119–57.
- GRANT, W. D., MWATHA, W. E. & JONES, B. E. 1990. Alkaliphiles: Ecology, diversity and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 75:255–269
- GUPTA, R., GUPTA, N. & RATHI, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64:763-781.
- HAKI, G. D. & RAKSHIT, S. K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89:17–34.
- HASAN, F., SHAH, A. A. & HAMEED. A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:325-251.
- HIOL, A., JONZO, M. D., DRUET, D. & COMEAU, L. 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25:80–87.
- INSAM, H. 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma*, 100:389–402.
- JAEGER, K. E. & REETZ, T. M. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16:396–403.
- KENNEDY, A. C. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74:65-76.
- KOJIMA, Y. & SHIMIZU, S. 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(3):219–26.

- KOUKER, G. & JAEGER, K. E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:211 – 213.
- LAILAJA, V. P. & CHANDRASEKARAN, M. 2013. Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 29:1349–1360.
- MARTINS, V. G., KALIL, S. J. & COSTA, J. A. V. 2008. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova*, 31(8):1942-1947.
- MESSIAS, J. M., DA COSTA, B. Z., DE LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. 2011. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 32(2):213-234.
- MONCIARDINI P., SOSIO M., CAVALETTI L., CHIOCCHINI C. & DONADIO S. 2002. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 42:419–429.
- MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. 2006. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2nd Ed. Lavras: UFLA. 625p.
- NERURKAR, M., JOSHI, M., PARITI, S. & ADIVAREKAR, R. 2013. Application of Lipase from Marine Bacteria *Bacillus sonorensis* as an Additive in Detergent Formulation. *Journal of Surfactants and Detergents*, 16(3):435-443.
- NETT, M., IKEDA, H. & MOORE, B. S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26(11):1362-1384.
- NTHANGENI, M. B., PATTERTON, H. G., TANDER, A. V., VERGEER, W. P. & LITTHAUER, D. 2001. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:705–712
- PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., KRIEGER, N. & SOCOOL, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29:119-131.

- PAQUES, F. W. & MACEDO, G. A. 2006. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, 29(1):93-99.
- RAHMAN, R. N. Z. R. A., BAHARUM, S. N., BASRI, M. & SALLEH, A. B. 2005. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Analytical Biochemistry*, 341:267–74.
- RASHID, N., SHIMADA, Y., EZAKI, S., ATOMI, H. & IMANAKA, T. 2001. Low temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Applied and environmental microbiology*, 67:4064–4069
- RATHI, P., SAXENA, R. K. & GUPTA, R. 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37:187–192.
- RATHI, P., GOSWAMI, V. K., SAHAL, V. & GUPTA, R. 2002. Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*, 93:930-936.
- SAXENA, R. K., GHOSH, P. K., GUPTA, R., DAVIDSON, W. S., BRADDOO, S. & GULATI, R. 1999. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, 77:101-115.
- SEMÊDO, L. T. A. S., LINHARES, A. A., GOMES, R. C., MANFIO, G. P., ALVIANO, C. S., LINHARES, L. F. & COELHO, R. R. R. 2001. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. *Microbiological Research*, 155:291–299.
- SHARMA R., CHISTI Y. & BANERJEE U. C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19:627–662.
- TAN, T., ZHANG, M., WANG, B., YING, C. & DENG, L. 2003. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*, 39: 459-465.
- TREICHEL, H., OLIVEIRA, D., MAZUTTI, M. A., DI LUCCIO, M. & OLIVEIRA, J. V. 2010. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3:182–196.

WANG, D., YAN, X. & SHAN, T. 2008. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochemical Engineering Journal*, 41:30–37.

XU, L. H., LI, Q. R. & JIANG, C. L. 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Applied and environmental Microbiology*, 62(1):244-248.

YANG, X., WANG, B., CUI, F. & TAN, T. 2005. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 40(6):2095–2103.