



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO ADULTO



POTENCIAL USO DE LIPASE DE *Fusarium solani* NO ENRIQUECIMENTO DE
ÁCIDOS GRAXOS POLI – INSATURADOS
ÔMEGA-3

ALLYSSON KAYRON DE CARVALHO SILVA

SÃO LUÍS - MA

2023

ALLYSSON KAYRON DE CARVALHO SILVA

**POTENCIAL USO DE LIPASE DE *Fusarium solani* NO ENRIQUECIMENTO DE
ÁCIDOS GRAXOS POLI – INSATURADOS
ÔMEGA-3**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de concentração: Processos biológicos em saúde
Linha de pesquisa: Doenças infecciosas e endêmicas no Maranhão

Orientadora: Prof^a. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra

Coordenador: Prof. Dr. Marcelo de Souza Andrade

São Luís

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

de Carvalho Silva, Allysson Kayron.

POTENCIAL USO DE LIPASE DE *Fusarium solani* NO
ENRIQUECIMENTO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI INSATURADOS ÔMEGA-3
/ Allysson Kayron de Carvalho Silva. - 2023.

104 f.

Orientador(a): Geusa Felipa de Barros Bezerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís - Maranhão, 2023.

1. Biotecnologia. 2. DHA. 3. EPA. 4. Produção de
enzimas fúngicas. I. de Barros Bezerra, Geusa Felipa. II.
Título.

ALLYSSON KAYRON DE CARVALHO SILVA

POTENCIAL USO DE LIPASE DE *Fusarium solani* NO ENRIQUECIMENTO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI – INSATURADOS ÔMEGA-3

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Saúde do Adulto da Universidade
Federal do Maranhão para obtenção do grau de
Mestre em Saúde do Adulto.

A banca Examinadora da Defesa de mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o
candidato aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Geusa Felipa de Barros Bezerra (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^o. Dr^a Talita da Silva Espósito (Examinador)
Externo ao programa

Prof. Dr Marcelo Souza de Andrade (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dr^a Mayara Cristina Pinto da Silva (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^o Dr^a Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão

*Aos meus pais Eunice e Francisco;
As minhas irmãs Ellen e Elayne;
Aos meus queridos avós Maria Ovídia e José Lourenço (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me fortalecer em dias difíceis, pela calma que tenha colocado no meu coração e por ter me proporcionado mais uma conquista.

Aos meus familiares e principalmente aos meus pais, pelo apoio, conselhos e força diante das dificuldades e incentivo ao longo desta caminhada, amo muito vocês.

Às professoras Dra. Geusa Bezerra, Dra. Maria do Desterro e Me. Kátia Borges, pela orientação, colaboração e pelos ensinamentos durante o período deste trabalho sempre incentivando cada vez mais a minha vontade de aprender, agradeço pela infinita paciência, oportunidades, dedicação e companheirismo durante os experimentos.

À minha amiga Fernanda Lima, te agradeço por estar mais uma vez trabalhando em parceria comigo, e pelas risadas durante dias cansativos de experimentos no laboratório, você mora no meu coração.

À professora Dra. Talita Espósito, por ter cedido seu laboratório para colaborar na realização dos experimentos, agradeço também por despertar a minha paixão pela biotecnologia enzimática e por ter acreditado no meu potencial quando abriu as portas do seu laboratório no período da graduação para mim. Hoje não me vejo fazendo pesquisa sem a enzimologia, obrigado de coração.

À UFMA que me acolheu desde a minha graduação. Aos laboratórios LPI – Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia, LIAC – Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer, BIOAQUA – Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos, LABGEN - Laboratório de Genética e Biologia Molecular e LEFISIO – Laboratório de Fisiologia Experimental pelo apoio nos experimentos.

Ao PPGSAD pela bolsa concedida e pelos conhecimentos adquiridos pelo programa.

À FAPEMA e CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos meus colegas de laboratório, Ivana, Cristina, Flavio, Gabriel, Amanda, Nívea, Suzane, Eliakim, Andressa, David, Carol, Laís, Rita e Lila pela amizade, risadas e convivência ao longo destes meses no NIBA, vocês fizeram dos meus dias na UFMA mais prazerosos.

Obrigado a todos!

“Não é sobre vencer, é sobre não desistir. Se você tem um sonho, lute por ele. Existe uma disciplina para a paixão, e não é sobre quantas vezes você é rejeitado ou quantas vezes você caiu e foi derrotado, é sobre quantas vezes levantou com coragem e seguiu em frente.”

Stefani Germanotta

RESUMO

O ômega-3 é um grupo de óleos graxos poli-insaturados de cadeia longa com múltiplas ligações duplas. Os principais tipos de ácidos graxos ômega-3 incluem o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA), esses ácidos tem diversos benefícios para saúde humana. Há técnicas para enriquecimento desses ácidos, mas geram baixas concentrações EPA e DHA. Estudos mostram que a utilização da lipase para o enriquecimento de EPA e DHA através do óleo de peixe é bastante promissora devido ao baixo custo em comparação com outras técnicas já utilizadas. Por esta razão, o objetivo deste estudo foi verificar o potencial de utilização de *Fusarium solani* da coleção de fungos da Universidade Federal como fonte de produção de lipase e o uso desta enzima no enriquecimento de ácidos poli-insaturados ômega-3 EPA e DHA. Foram realizados o índice enzimático comparado a *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia* sp., *Fusarium oxysporum* e *Penicillium decumbens*, tipos de fermentação, purificação parcial, caracterização físico-química e capacidade no enriquecimento de EPA e DHA. Os resultados mostram que Lipase F2 obteve atividade lipolítica de 290 U/mL em pH 8,0 e estabilidade de 93,84 U/mL na mesma faixa de pH, apresentou resistência em temperaturas de 35 a 70°C, estabilidade da temperatura a 35°C e vários tipos de surfactantes e íons. A lipase F2, foi obtida melhorando a fermentação submersa para produção de lipase usando 5% (v/v) de óleo de coco por 3 dias de produção de lipase, a lipase F2 mostrou a capacidade de obter EPA e DHA através do óleo de peixe onde os resultados foram 22,1 mol% de DHA e 23,8 mol% de EPA, mostrando que esta enzima obtida de *Fusarium solani* possui propriedades catalíticas.

Palavras chave: Produção de enzimas fúngicas; EPA; DHA; Biotecnologia

ABSTRACT

Omega-3 is a group of long-chain polyunsaturated fatty oils with multiple double bonds. The main types of omega-3 fatty acids include eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which have several benefits for human health. Techniques exist to fortify these acids, but they result in low concentrations EPA and DHA. Studies show that the use of lipase to enrich EPA and DHA by fish oil is very promising due to its low cost compared to other techniques already used. For this reason, the aim of this study was to verify the potential use of *Fusarium solani* from the fungus collection of the Federal University as a source of lipase production and the use of this enzyme in the enrichment of omega-3 polyunsaturated acids 3 EPA and DHA. The enzymatic index was compared with *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia* sp., *Fusarium oxysporum* and *Penicillium decumbens*, the type of fermentation, partial purification, physicochemical characterization and the ability to enrich EPA and DHA. The obtained results show that Lipase F2 has a lipolytic activity of 290 U/mL at pH 8.0 and a stability of 93.84 U/mL in the same pH range, shows resistance at temperatures from 35 to 70°C, stability at temperatures up to 35°C and different types of surfactants and ions. Lipase F2 was obtained by improving submerged fermentation for lipase production using 5% (v/v) coconut oil for 3 days of lipase production, lipase F2 showed the ability to obtain EPA and DHA by fish oil, where the results were 22.1 mol% of DHA and 23.8 mol% of EPA, showing that this enzyme obtained from *Fusarium solani* has catalytic properties.

Keywords: Production of fungal enzymes; EPA; DHA; Biotechnology

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Recomendações diárias de ômega 3 conforme a idade.....17

Tabela 2 - Aplicações industriais das lipases.....20

Artigo: Potencial Uso de Lipase de *Fusarium solani* no Enriquecimento de Ácidos Graxos Poli – Insaturados Omega-3

Tabela 1 - Índices de hidrolises (IH) obtidos em meio solidificado em diferentes espécies de fungos.....38

Tabela 2 - Resultado da purificação parcial da lipase *F. solani* da fermentação submersa e semisólida.....44

Tabela 4 - Efeito de agentes surfactantes na atividade lipolítica de lipase F2 de *F. solani*.....49

Tabela 5 - Influência de íons na atividade de lipase F2 de *F. solani*.....50

Tabela 6 - Efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade de lipase F2.....51

Tabela 7 - Especificidade da lipase F2 em diferentes tamanhos de cadeia pNP.....52

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Representação das estruturas químicas dos PUFAs: EPA e DHA.....	17
Figura 2 – Estrutura tridimensional de lipase microbiana.....	20
Figura 3 - <i>Fusarium solani</i> e as diferentes estruturas de reprodução assexual: microconidia (Ba), macroconidia (Bb), clamídias (C).....	24
 Artigo: Potencial Uso de Lipase de <i>Fusarium solani</i> no Enriquecimento de Ácidos Graxos Poli – Insaturados Omega-3	
Figura 1 - Morfologia das colônias e estruturas de reprodução assexual de <i>Fusarium solani</i> obtidos em amostras de solos.....	41
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 2%, confirmando o fungo <i>fusarium solani</i> com 560pb após PCR realizada.....	41
Figura 3 – Produção de lipase em diferentes substratos por fermentação submersa (FSM).....	42
Figura 4 - Efeito de diferentes concentrações de óleo de coco na FSM.....	42
Figura 5 – Efeito de pH (A) e estabilidade (B) na atividade de lipase F2.....	46
Figura 6 - Efeito da temperatura (A) e estabilidade (B) em atividade da lipase F2...48	
Figura 7 - Efeito da concentração de <i>p</i> – NPP sobre a atividade de lipase F2.....	56
Figura 8 - Enriquecimento enzimático do teor de acilglicerol de EPA e DHA do óleo de peixe utilizando lipase F2 100 U/mL de <i>F. solani</i>	57

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

BaCl ₂	Cloreto de Bário
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
Cl ⁻	Cloreto de Calcio
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAME	Éster metílico de ácido graxo
FeCl ₃	Cloreto de Ferro (III)
FeSO ₄	Sulfato de Ferro (II)
FSM	Fermentação submersa
FSS	Fermentação semissólida
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de Potássio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MnCl ₂	Cloreto de manganês
MnSO ₄	Sulfato de manganês
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amônio
NaCl	Cloreto de Sódio
PDA	ágar Potato Dextrose
<i>p</i> -NPP	Palmitato de <i>p</i> – nitrofenil
<i>p</i> -NPA	Acetato <i>p</i> -nitrofenil
<i>p</i> -NPB	Butirato <i>p</i> -nitrofenil
<i>p</i> -NPC	<i>p</i> -nitrofenil octanoato
<i>p</i> -NPL	<i>p</i> -nitrofenil laurato
<i>p</i> -NPM	<i>p</i> -nitrofenil miristato
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitato
<i>p</i> -NPS	esterato <i>p</i> -nitrofenil
SDS	Docedil Sulfato de Sódio
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TBE	Tris/Borato/EDTA
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Ácidos graxos ômega -3.....	16
2.2 Enzimas Lipases.....	19
2.1.2 Lipases fúngicas.....	22
2.3 Gênero <i>Fusarium</i>	24
3. OBJETIVOS	27
3.2 Específicos	Erro!
Indicador não definido.	
4. Artigo: Potencial Uso de Lipase de <i>Fusarium solani</i> no Enriquecimento de Ácidos Graxos Poli – Insaturados Omega-3	
5. CONCLUSÕES	63
REFERENCIAS	64
ANEXO	73

