



**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**

**ANDRESSA SOUSA SILVA**

**BIOPROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA LIPASE EXÓGENA EXTRAÍDA E  
PURIFICADA DE *Fusarium solani***

São Luís  
2025

ANDRESSA SOUSA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA LIPASE EXÓGENA EXTRAÍDA E  
PURIFICADA DE *Fusarium solani***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de doutora em Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amanda Mara Teles.

São Luís  
2025

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

Sousa Silva, Andressa.

Bioprospecção tecnológica da lipase exógena extraída e purificada de *Fusarium solani* / Andressa Sousa Silva. - 2025.

117 p.

Coorientador(a) 1: Amanda Mara Teles.

Orientador(a): Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2025.

1. *Fusarium Solani*. 2. Lipase Exógena. 3. Fermentação. 4. Emulsão. 5. Atividade Lipolítica. I. Mara Teles, Amanda. II. Soares Brandão Nascimento, Maria do Desterro. III. Título.



Universidade Federal do Maranhão  
Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA, 65080-805 [Telefone: \(98\)3272-8000](tel:(98)3272-8000) E-mail: [renorbio@ufma.br](mailto:renorbio@ufma.br)  
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

## FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DA TESE

**ALUNA:** Andressa Sousa Silva

**TÍTULO DO PROJETO:** “BIOPROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA LIPASE EXÓGENA EXTRAÍDA E PURIFICADA DE *Fusarium solani*”

**PROFESSORA ORIENTADORA:** Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

| BANCA EXAMINADORA                                                                   | CONCEITO | ASSINATURA |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|------------|
| Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento<br><b>UFMA – Presidente</b> | _____    | _____      |
| Profa. Dra. Ana Lúcia de Abreu Silva<br><b>UEMA</b>                                 | _____    | _____      |
| Prof. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva<br><b>UFMA</b>                            | _____    | _____      |
| Prof. Dra. Adeilton Pereira Maciel<br><b>UFMA</b>                                   | _____    | _____      |
| Prof. Dra. Raquel Maria Trindade Fernandes<br><b>UEMA</b>                           | _____    | _____      |

**DATA DA APROVAÇÃO:**

**HORÁRIO:**

**LOCAL:**

ANDRESSA SOUSA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA LIPASE EXÓGENA EXTRAÍDA E  
PURIFICADA DE *Fusarium solani***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia-Área de concentração em Biotecnologia em Saúde.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento  
UFMA - Orientadora

---

Prof. Dra. Amanda Mara Teles  
UEMA – Co-Orientadora

---

Profa. Dra. Ana Lúcia de Abreu Silva  
UEMA – 1º Examinador

---

Profa. Dr. Mayara Cristina Pinto da Silva  
UFMA - 2º Examinador

---

Prof. Dr. Adailton Pereira Maciel  
UFMA - 3º Examinador

---

Prof. Dr. Raquel Maria Trindade Fernandes  
UEMA - 4º Examinador

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amado pai Luiz Clebe Ramos da Silva (*in memoriam*) e à minha mãe Maria Lindalva Sousa Silva, pois em sua simplicidade ensinaram-me o caminho da retidão e da santidade. E por todo o apoio que em vida proporcionaram aos meus estudos e pelo grande estímulo durante todas as fases da minha vida. Estímulos estes, sem os quais, esta importante etapa da minha vida acadêmica não seria possível.

À minha avó, Maria José de Sousa, que apesar da distância geográfica sempre foi uma pessoa presente em minha vida e por ser um grande exemplo de vida.

Ao meu esposo Daniel Aguiar Marques pela paciência e auxílio, sempre mostrando companheirismo e suporte nos momentos difíceis.

À minha filha Esther Ava Silva Marques por me mostrar sua pureza e bondade, resiliência e felicidade que me impulsionam a lutar diariamente.

Aos meus amigos Daniella, Richardson, João, Diego e Sandra e à minha sogra Kátia Lima Aguiar Marques e ao meu sogro Carlos Claudiney Leite Marques pela amizade e cumplicidade nos meus desafios.

Enfim, a todas as pessoas que passaram na minha vida e me influenciaram de alguma forma, mas não foram citadas, tenham certeza de que vocês são importantes para mim, e também às pessoas que irão ler este trabalho, com o qual eu espero que sirva de alguma forma como fonte de conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de um novo nascimento, mediante a sua graça e misericórdia.

À Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), em especial a nucleadora do Maranhão sob a coordenação do Prof. Dr. Marcus Paes e a todos os professores pelas contribuições para que esse estudo fosse realizado.

À Capes e CNPQ pelos fomentos dos projetos quem contemplam este estudo.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento pelo seu papel fundamental na concepção e desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Ao Laboratório de Micologia localizado no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão na pessoa da Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra pela cepa de fungo cedida e toda a infraestrutura para obtenção dos extratos durante a realização deste trabalho e ao aluno Allysson por todo o apoio e auxílio nesse projeto.

Agradeço a Amanda Mara Teles pois sempre solícita e preparada na condução e esclarecimentos de dúvidas no processo. Pegou na minha mão como um adulto conduz uma criança em um caminho que nunca trilhou.

Agradeço a todos os professores e demais profissionais, que contribuíram na formação do meu caráter e no meu desempenho profissional.

Agradeço a Universidade Federal do Maranhão, que guiou os meus primeiros passos na minha formação enquanto farmacêutica, me acolheu como discente, e continua alavancando o meu processo formativo.

À Universidade Federal do Piauí pelo apoio na realização de testes experimentais presentes neste estudo.

Ao Laboratório de Química da UFMA onde realizei algumas análises, na pessoa da Professora Dra. Cláudia Quitino por toda infraestrutura cedida.

**“Bem-aventurado o homem que suporta a  
provação; porque, depois de aprovado,  
receberá a coroa da vida, que o Senhor  
prometeu aos que o amam”. (Tiago 1:12)**

## RESUMO

**Introdução:** As lipases que são produzidas por microrganismos têm apresentado rápido avanço no âmbito da tecnologia enzimática. Elas podem atuar em uma variedade de substratos. As lipases de origem microbiana desempenham um papel interessante na biotecnologia, pois muitas delas são estáveis em uma ampla faixa de pH, em temperaturas elevadas e em solventes orgânicos. **Objetivo:** Produzir a enzima lipase a partir do fungo *Fusarium solani* para aplicações biotecnológicas na saúde, estética indústria. **Métodos:** O fungo *Fusarium solani* foi cultivado em meio sólido para sua identificação morfológica através da análise de suas características macroscópicas e microscópicas por meio de microcultivo e também molecular, seguida da fermentação submersa e fermentação semi-sólida, a purificação dos mesmos e a atividade lipolítica dos extratos, sendo caracterizados por testes de pH, temperatura, efeitos dos surfactantes e tempo de armazenamento. Além da investigação da viabilidade celular dos extratos, determinação de atividade antioxidante, avaliação da degradação de gordura animal também foram realizados. **Resultados:** Como resultados foram obtidos a fermentação submersa utilizando azeite de oliva como substrato resultou na produção de Lipase F2 com notável atividade. A lipase F2 apresentou estabilidade em pH 8,0, mantendo atividade de uma atividade lipolítica específica de 135,89 U/mg com grau de pureza 3,63. Permaneceu ativo na faixa de temperatura de 35 a 70°C, com ótima estabilidade a 35°C, e demonstrou resistência a diversos surfactantes e íons. Os testes com células demonstraram que a viabilidade celular das células GM e Raw não houve diferença significativa quando tratada com a enzima lipase de *F. solani*. O tecido gorduroso de frango foi degradado de 10g para 0,89g em 96 hrs na presença da lipase de *F. solani* purificada. E os resultados de caracterização e produção da microemulsão incorporada com lipase de *F. solani* indicam que essa é uma formulação estável com eficácia comprovada. **Conclusão:** Dessa forma, uma emulsão com a enzima lipase de *Fusarium solani* é viável para uso na indústria, sendo favorável e seguro para uso em humanos e sem toxicidade para o mesmo.

**Palavras-chave:** *Fusarium solani*, Lipase exógena, Fermentação, emulsão, Atividade lipolítica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Lipases produced by microorganisms have shown rapid advancement in the field of enzymatic technology. They can act on a variety of substrates. Microbial-origin lipases play an interesting role in biotechnology because many of them are stable across a wide range of pH, high temperatures, and organic solvents. **Objective:** To produce the lipase enzyme from the fungus *Fusarium solani* for biotechnological applications in the health, aesthetics, and industry sectors. **Methods:** The fungus *Fusarium solani* was cultivated on solid media for morphological identification through analysis of its macroscopic and microscopic characteristics via microcultivation, followed by submerged fermentation and semi-solid fermentation. The enzyme was then purified, and the lipolytic activity of the extracts was assessed by testing pH, temperature, surfactant effects, and storage time. Additionally, the cellular viability of the extracts, antioxidant activity, and animal fat degradation were also investigated. **Results:** Submerged fermentation using olive oil as a substrate resulted in the production of Lipase F2 with notable activity. Lipase F2 exhibited stability at pH 8.0, maintaining a lipolytic activity of 135.89 U/mg with a purity degree of 3.63. It remained active within the temperature range of 35 to 70°C, with optimal stability at 35°C, and demonstrated resistance to various surfactants and ions. Tests with cells showed no significant difference in cellular viability when treated with the lipase enzyme from *F. solani*. Chicken adipose tissue was degraded from 10g to 0.89g in 96 hours in the presence of the purified *F. solani* lipase. The characterization and production results of the microemulsion incorporated with *Fusarium solani* lipase indicate that it is a stable formulation with proven efficacy. **Conclusion:** Therefore, an emulsion containing the lipase enzyme from *Fusarium solani* is viable for industrial use, being favorable and safe for human use without toxicity.

**Keywords:** *Fusarium solani*, Exogenous Lipase, Fermentation, Emulsion, Lipolytic Activity.

## LISTA DE FIGURAS

|                   |                                                                                                                                                                                                                             |           |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1.</b>  | Reação de hidrólise catalisada pela lipase.....                                                                                                                                                                             | <b>31</b> |
| <b>Figura 2.</b>  | Representação de uma molécula de lipase.....                                                                                                                                                                                | <b>32</b> |
| <b>Figura 3.</b>  | Tipos de microemulsões esquematizadas pela fase oleosa (cinza), pela fase aquosa (branca) e por um filme interfacial de tensoativo/cotensoativo. A: microemulsão O/A, B: bicontínua e C: microemulsão A/O.....              | <b>45</b> |
| <b>Figura 4.</b>  | Características Morfológicas do verso (A) e anverso (B) da colônia de <i>Fusarium solani</i> obtidas de amostras de solo.....                                                                                               | <b>58</b> |
| <b>Figura 5.</b>  | Morfologia de colônias e estruturas de reprodução assexuada de <i>Fusarium solani</i> obtidas de amostras de solo.....                                                                                                      | <b>60</b> |
| <b>Figura 6.</b>  | Imagem da eletroforese de gel de agarose de <i>F. solani</i> comparado com o primer.....                                                                                                                                    | <b>61</b> |
| <b>Figura 7.</b>  | Gel de Eletroforese SDS-PAGE. A) Linha 1: marcadores moleculares padrões; linha 2: lipase purificada de <i>Fusarium solani</i> ; linha 3: lipase comercial purificada. Revelação por nitrato de prata.....                  | <b>66</b> |
| <b>Figura 8.</b>  | Observação macroscópica dos estados físicos encontrados durante a técnica de titulação, realizada para o desenvolvimento do diagrama pseudoternário. A-Emulsão. B-formação de fases. C-formação de gel. D-Microemulsão..... | <b>67</b> |
| <b>Figura 9.</b>  | Diagrama de fase pseudoternário de óleo (miristato de isopropila), teansoativo (Tween 80/álcool iso-propílico, na proporção de 3:1) e fase aquosas.....                                                                     | <b>67</b> |
| <b>Figura 10.</b> | pH ótimo da enzima lipase extraída e purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....                                                                                                                                       | <b>72</b> |
| <b>Figura 11.</b> | Estabilidade do pH da enzima lipase extraída e purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....                                                                                                                             | <b>73</b> |
| <b>Figura 12.</b> | pH ótimo da microemulsão de lipase extraída e purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....                                                                                                                              | <b>73</b> |
| <b>Figura 13.</b> | Estabilidade do pH da microemulsão de lipase extraída e purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....                                                                                                                    | <b>74</b> |
| <b>Figura 14.</b> | pH ótimo da microemulsão de lipase comercial.....                                                                                                                                                                           | <b>74</b> |

|                   |                                                                                                                                  |            |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 15.</b> | Estabilidade do pH da microemulsão de lipase comercial.....                                                                      | <b>75</b>  |
| <b>Figura 16.</b> | Temperatura ótima da enzima lipase extraída e purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....                                   | <b>76</b>  |
| <b>Figura 17.</b> | Estabilidade da temperatura da enzima lipase extraída e purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....                         | <b>76</b>  |
| <b>Figura 18.</b> | Temperatura ótima microemulsão da enzima lipase extraída e purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....                      | <b>77</b>  |
| <b>Figura 19.</b> | Estabilidade da temperatura microemulsão da enzima lipase extraída e purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....            | <b>77</b>  |
| <b>Figura 20.</b> | Temperatura ótima microemulsão da lipase comercial.....                                                                          | <b>78</b>  |
| <b>Figura 21.</b> | Estabilidade da temperatura da lipase comercial.....                                                                             | <b>78</b>  |
| <b>Figura 22.</b> | Lipase livre de <i>F. solani</i> e lipase comercial no pH ótimo de 0 a 6 horas.....                                              | <b>79</b>  |
| <b>Figura 23.</b> | Lipase livre de <i>F. solani</i> e lipase comercial na temperatura ótima de 0 a 6 horas.....                                     | <b>79</b>  |
| <b>Figura 24.</b> | Efeitos dos surfactantes com efeito de detergentes sobre a lipase extracelular purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....  | <b>81</b>  |
| <b>Figura 25.</b> | Efeitos dos solventes sob a lipase extracelular purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....                                 | <b>82</b>  |
| <b>Figura 26.</b> | Influência dos íons sob a lipase extracelular purificada do fungo <i>Fusarium solani</i> .....                                   | <b>84</b>  |
| <b>Figura 27.</b> | Efeito da concentração de <i>p</i> – NPP sobre a atividade de lipase.....                                                        | <b>85</b>  |
| <b>Figura 28.</b> | O tempo de armazenamento foi medido em dias de acordo com a atividade lipolítica residual expressa em porcentagem.....           | <b>86</b>  |
| <b>Figura 29.</b> | Atividade enzimática da microemulsão de lipase de <i>F. solani</i> .....                                                         | <b>88</b>  |
| <b>Figura 30.</b> | Curva padrão do DPPH.....                                                                                                        | <b>89</b>  |
| <b>Figura 31.</b> | Avaliação da viabilidade celular na linhagem celular RAW 264.7.....                                                              | <b>93</b>  |
| <b>Figura 32.</b> | Ensaio da lipase de <i>F. solani</i> na degradação de gordura.....                                                               | <b>95</b>  |
| <b>Figura 33.</b> | Potencial removedor e aditivo de detergentes da lipase de <i>Fusarium solani</i> e Lipase comercial livre e na microemulsão..... | <b>101</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                   |                                                                                                                                                                           |           |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1.</b>  | Atividade lipolítica da fermentação semi-sólida.....                                                                                                                      | <b>62</b> |
| <b>Tabela 2.</b>  | Atividade lipolítica da fermentação submersa.....                                                                                                                         | <b>63</b> |
| <b>Tabela 3.</b>  | Lipase incubada com íons nas concentrações de (1mM e 10mM) em tris – HCl 50mMol pH 7,0 e incubadas por 1 hora a 37 °C.....                                                | <b>68</b> |
| <b>Tabela 4.</b>  | Atividade lipolítica das lipases de <i>F. solani</i> e comercial livre e na imobilizada na microemulsão.....                                                              | <b>69</b> |
| <b>Tabela 5.</b>  | Atividade antioxidante da lipase de <i>F. solani</i> .....                                                                                                                | <b>70</b> |
| <b>Tabela 6.</b>  | Degradação da carne pela lipase <i>F. solani</i> e comercial em diferentes períodos.....                                                                                  | <b>71</b> |
| <b>Tabela 7.</b>  | Potencial uso como aditivos em detergentes.....                                                                                                                           | <b>83</b> |
| <b>Tabela 8.</b>  | Atividade lipolítica das lipases de <i>F. solani</i> e comercial livre e na imobilizada na microemulsão.....                                                              | <b>87</b> |
| <b>Tabela 9.</b>  | Atividade antioxidante da lipase de <i>F. solani</i> .....                                                                                                                | <b>90</b> |
| <b>Tabela 10.</b> | Atividade antioxidante equivalente ao Trolox na enzima, microemulsão incorporada com a enzima e microemulsão sem a incorporação (Branco) pelo método ABTS.....            | <b>91</b> |
| <b>Tabela 11.</b> | Atividade antioxidante da concentração efetiva de 50% (EC50) da enzima, microemulsão incorporada com a enzima e microemulsão sem a incorporação (Branco) método ABTS..... | <b>91</b> |
| <b>Tabela 12.</b> | Degradação da carne pela lipase <i>F. solani</i> e comercial em diferentes períodos.....                                                                                  | <b>94</b> |
| <b>Tabela 13.</b> | Potencial uso como aditivos em detergentes.....                                                                                                                           | <b>97</b> |
| <b>Tabela 14.</b> | Potencial uso da lipase e microemulsão de <i>F. solani</i> como aditivos em sabão em pó.....                                                                              | <b>99</b> |

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| 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 laurate          |
| <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          | <i>Tris</i> (hidroximetil)aminometano |
| TBE           | Tris/Borato/EDTA                      |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                    |   |                                     |
|--------------------|---|-------------------------------------|
| %                  | - | Porcentagem                         |
| °C                 | - | Grau Celsius                        |
| =                  | - | Igual a                             |
| >                  | - | Maior que                           |
| ≤                  | - | Menor ou igual a                    |
| B                  | - | Beta                                |
| cm                 | - | Centímetro                          |
| g                  | - | Grama                               |
| g-1                | - | Grama por unidade de volume ou peso |
| H                  | - | Hora                                |
| m/z <sub>exp</sub> | - | Razão massa/carga experimental      |
| mM                 | - | Milimolar                           |
| Mm                 | - | Milímetro                           |
| mV                 | - | Milivolt                            |
| μg                 | - | Micrograma                          |
| μl                 | - | Microlitros                         |
| μM                 | - | Micromolar                          |
| μS                 | - | Microsiemens                        |
| ng                 | - | Nanograma                           |
| nm                 | - | Nanômetro                           |
| pb                 | - | Pares de base                       |

## SUMÁRIO

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                           | 11 |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                           | 13 |
| LISTA DE ABREVIações E SIGLAS .....                                                              | 14 |
| LISTA DE SÍMBOLOS.....                                                                           | 15 |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                       | 19 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                                                        | 22 |
| 2.1 Objetivo Geral .....                                                                         | 22 |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                                                  | 22 |
| <b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....                                                              | 23 |
| 3.1 Fungos .....                                                                                 | 23 |
| 3.2.2 Lipases fúngicas.....                                                                      | 31 |
| 3.3 Aplicação biotecnológica das lipases microbianas.....                                        | 32 |
| 3.3.1 Âmbito da saúde .....                                                                      | 32 |
| 3.3.2 Âmbito alimentício .....                                                                   | 34 |
| 3.3.3 Indústria têxtil .....                                                                     | 35 |
| 3.3.4 Indústria Cosméticas .....                                                                 | 36 |
| 3.3.5 Indústria de detergentes.....                                                              | 37 |
| 3.3.6 Indústria de papel.....                                                                    | 38 |
| 3.3.7 Biorremediação de águas residuais .....                                                    | 39 |
| 3.3.8 Biossensores.....                                                                          | 39 |
| 3.4 Emulsões.....                                                                                | 40 |
| 3.4.1 Macroemulsão .....                                                                         | 40 |
| 3.4.2 Nanoemulsão .....                                                                          | 41 |
| 3.4.3 Microemulsões .....                                                                        | 41 |
| <b>4. METODOLOGIA</b> .....                                                                      | 43 |
| 4.1 Identificação morfológica de <i>F. solani</i> .....                                          | 43 |
| 4.2 Identificação molecular do fungo <i>F. solani</i> .....                                      | 43 |
| 4.3 Obtenção da lipase de <i>F. solani</i> .....                                                 | 44 |
| 4.3.1 Fermentação Submersa da lipase de <i>F. solani</i> .....                                   | 44 |
| 4.3.2 Fermentação Semi-sólida da lipase <i>F. solani</i> .....                                   | 44 |
| 4.4 Purificação de lipase de <i>F. solani</i> .....                                              | 44 |
| 4.4.1 Cálculo da Determinação da Atividade Específica e do Índice de Purificação de Enzimas..... | 45 |
| 4.5 Concentração de proteína lipase <i>F. solani</i> .....                                       | 46 |
| 4.6 Determinação da atividade lipolítica de <i>F. solani</i> .....                               | 46 |
| 4.7 Análise de pureza por SDS-PAGE .....                                                         | 46 |
| 4.8 Caracterização físico-química da lipase de <i>F. solani</i> .....                            | 46 |

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.8.1 pH ótimo e estabilidade .....                                                                 | 46        |
| 4.8.2 Temperatura ótima e estabilidade .....                                                        | 47        |
| 4.8.3 Efeito do tempo de incubação .....                                                            | 47        |
| 4.8.4 Efeito de surfactantes e íons .....                                                           | 47        |
| 4.8.5 Estabilidade em solventes orgânicos .....                                                     | 47        |
| 4.8.7 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH .....         | 48        |
| 4.8.8 Determinação da atividade antioxidante total pelo método ABTS .....                           | 48        |
| 4.9 Metodologia geral de preparação de cultura .....                                                | 49        |
| 4.9.1 Avaliação da viabilidade celular por MTT .....                                                | 50        |
| 4.9.2 Análise estatística .....                                                                     | 51        |
| 4.10. Formulações Biotecnológicas.....                                                              | 51        |
| 4.10.1 Construção do Diagrama de Fases Pseudoternário.....                                          | 51        |
| 4.10.2 Preparo da microemulsão carregada com lipase extraída de <i>F. solani</i> .....              | 51        |
| 4.10.3 Caracterização da Microemulsão .....                                                         | 52        |
| 4.10.3.1 Tamanho hidrodinâmico das micropartículas e índice de polidispersividade (PDI).....        | 52        |
| 4.10.3.2 Determinação do tamanho das partículas e potencial zeta .....                              | 52        |
| 4.10.4 Controle de qualidade das microemulsões desenvolvidas .....                                  | 52        |
| 4.11 Aplicações Biotecnológicas .....                                                               | 53        |
| 4.11.1 Degradação de gordura animal da microemulsão de lipase de <i>F. solani</i> imobilizada ..... | 53        |
| 4.11.2 Potencial uso como aditivos em detergentes .....                                             | 53        |
| 4.11.3 Potencial uso como aditivo em sabão .....                                                    | 53        |
| 4.11.4 Potencial removedor de manchas .....                                                         | 54        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                              | <b>55</b> |
| 5.1 Identificação do Fungo <i>Fusarium solani</i> .....                                             | 55        |
| 5.1.1 Identificação morfológica de <i>F. solani</i> .....                                           | 55        |
| 5.1.2 Identificação molecular do <i>F. solani</i> .....                                             | 57        |
| 5.2. Isolamento da enzima lipase e Atividade lipolítica .....                                       | 58        |
| 5.2.1 Atividade lipolítica da fermentação semissólida .....                                         | 58        |
| 5.2.2 Fermentação lipolítica submersa.....                                                          | 59        |
| 5.3 Análise de pureza da enzima lipase de <i>Fusarium solani</i> .....                              | 60        |
| 5.4 Preparação da Microemulsão incorporada com enzima lipase de <i>Fusarium solani</i> .....        | 61        |
| 5.4.1 Construção do diagrama de fases pseudoternário da microemulsão.....                           | 61        |
| 5.6 Controle de qualidade das microemulsões desenvolvidas .....                                     | 64        |

|                                                                                                                             |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.9 Caracterização físico-química da lipase de <i>Fusarium solani</i> e da microemulsão de lipase de <i>F. solani</i> ..... | 66         |
| 5.9.1 pH ótimo e estabilidade .....                                                                                         | 66         |
| 5.9.2 Temperatura ótima e estabilidade .....                                                                                | 69         |
| 5.9.3 Efeito do tempo de incubação .....                                                                                    | 73         |
| 5.9.4 Influência de surfactantes e solventes .....                                                                          | 74         |
| 5.9.5 Influência de íons .....                                                                                              | 77         |
| 5.9.6 Determinação dos parâmetros cinéticos .....                                                                           | 79         |
| 5.9.7 Determinação do tempo de armazenamento .....                                                                          | 80         |
| 5.10 Atividade antioxidante da lipase de <i>Fusarium solani</i> .....                                                       | 82         |
| 5.10.1 Atividade antioxidante por DPPH .....                                                                                | 82         |
| 5.10.2 Atividade antioxidante por ABTS .....                                                                                | 84         |
| 5.11 Avaliação da viabilidade celular frente à Lipase de <i>Fusarium solani</i> .....                                       | 85         |
| 5.12 Aplicação biotecnológica da microemulsão de lipase de <i>F. solani</i> .....                                           | 86         |
| 5.12.1 Aplicação da Microemulsão de lipase de <i>F. solani</i> na degradação de gordura .....                               | 86         |
| 5.12.1 Outras aplicações .....                                                                                              | 89         |
| 5.12.2 Aplicação da Microemulsão de lipase de <i>F. solani</i> como aditivos em detergentes .....                           | 89         |
| 5.12.3 Aplicação da Microemulsão de lipase de <i>F. solani</i> como aditivos em sabão em pó .....                           | 91         |
| 5.12.4 Potencial removedor de manchas .....                                                                                 | 93         |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                   | <b>95</b>  |
| <b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                                                    | <b>96</b>  |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                                                         | <b>114</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Os lipídios são elementos-chave na química da vida. A maioria dos organismos usa a química supramolecular inerente aos fosfolipídios para formar seus compartimentos extracelulares e intracelulares. Muitas plantas e animais armazenam energia química na forma de triglicerídeos, que são pouco solúveis em água. Para o funcionamento do metabolismo destes eles produzem esterases, enzimas que podem hidrolisar ligações de ésteres solúveis em água. Esterases que podem hidrolisar triglicerídeos no limite água/óleo são denominados lipases ou, mais sistematicamente, hidrolases de triacilglicerol (Maia *et al.*, 2001).

As lipases são acil hidrolases que representam um grupo diversificado de enzimas presentes em organismos que variam de procariontes a humanos. O peso molecular de lipases está na faixa de 19-60 kDa e é caracterizado por ser uma proteína monomérica. (Chandra *et al.*, 2020).

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) estão entre as enzimas industriais mais importantes devido à sua especificidade na hidrólise, interesterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise. As lipases não específicas atuam de forma aleatória nas moléculas de acilglicerol, quebrando-as e gerando ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Já as lipases 1,3 específicas liberam ácidos graxos das posições 1 e 3, o que resulta em produtos com composições diferentes das obtidas por lipases não seletivas ou até por catalisadores químicos (Cortez *et al.*, 2016).

Essas enzimas são geralmente usadas em diferentes setores químicos, como detergentes, alimentos, bioenergia, aromas, produtos farmacêuticos e ésteres enantiopuros além de derivados de aminoácidos usados em química fina e agroquímicos (Khan *et al.*, 2017).

As lipases são amplamente encontradas em quase todos os tipos de organismos vivos, mas principalmente em animais, plantas e micróbios. A maior parte da pesquisa sobre aplicações de lipase depende de lipases comercialmente disponíveis. Mais de 50% se originam e são produzidos por microrganismos devido à sua maior robustez, variedades de atividade e rendimento. Outra vantagem proveniente de lipases obtidas a partir de microrganismos é a capacidade de funcionar sem cofatores, enquanto algumas lipases animais requerem coenzimas sob algumas condições (Dong *et al.*, 2022).

A indústria mundial do mercado de enzimas atingiu US\$ 7,0 bilhões em 2023 de US\$ 5,5 bilhões em 2018 em um complexo taxa de crescimento anual (CAGR) de 4,9% para o período 2018- 2023 (BCC Research, 2018). Este crescimento é resultado de uma demanda crescente de enzimas principalmente em mercados emergentes (por exemplo: Índia, China e Brasil) e um mercado de bioenergia em expansão (Novozymes, 2013). Entre as enzimas industriais, as enzimas lipolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas, com interesse para as indústrias de detergentes, óleos modificados e setores farmacêuticos, o que se deve às suas vantagens notáveis, como alta especificidade catalítica, formação mínima de rejeitos e sustentabilidade ambiental. (Xu *et al.*, 2024)

A produção de lipases microbianas é influenciada principalmente por fatores ambientais, como a resposta do microrganismo a um meio com poucos nutrientes, variações de temperatura e concentração de substratos. A presença de lipídios e ácidos graxos como fontes de carbono estimula a produção dessas enzimas extracelulares (Cesário *et al.*, 2021).

Muitos microrganismos são conhecidos como produtores de lipases extracelulares, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Um grande número de bactérias e fungos produtores de lipase já foi caracterizado, incluindo de *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus stearothermophilus* MC 7.9., *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.* Considerando que cepas taxonomicamente próximas podem produzir lipases de diferentes tipos, várias espécies deste grupo não são patogênicos, simples de cultivar e que secretam enzimas com propriedades estruturas distintivas de alta termoestabilidade e atividade ideal (Barbosa *et al.*, 2012).

A busca por novos microrganismos produtores de lipases é uma área promissora de pesquisa para futuras aplicações industriais, uma vez que novas enzimas com estabilidade melhorada e atividade em condições adversas, incluindo a presença de solventes e grandes variações de pH e temperatura, podem ser isoladas (Luz *et al.*, 2021).

Uma das áreas que mais cresce é a das indústrias cosméticas e com ela novas técnicas estão sendo desenvolvidas a fim de complementar e inovar a demanda na área estética. Entre elas está a técnica de mesoterapia como método de redução da gordura subcutânea para o contorno corporal. A maioria das fontes credita a Pistor

por ter desenvolvido a técnica de mesoterapia na França em 1952 (Matarasso *et al.*, 2009).

Desta forma, o uso da lipase exógena produzida por um fungo é um produto biotecnológico alternativo tanto para área da saúde como também nas mais diversas áreas da indústria alimentícia, de tecidos, em processos de biorremediação do meio ambiente e em aditivos em detergente e remoção de óleo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Produzir a enzima lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani* para aplicações biotecnológicas na saúde, na estética e na indústria

### 2.2 Objetivos Específicos

- Detectar a produção de enzima lipase do fungo *Fusarium solani* obtido da “Coleção de fungos do Maranhão” localizada no laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia básica e Aplicada (NIBA) na UFMA;
- Comparar a eficiência da enzima lipase de *Fusarium solani* com a lipase comercial;
- Realizar ensaios in vitro para verificar a atividade lipolítica da lipase extraída de *Fusarium solani*;
- Testar a enzima lipase em células Raw 264.7 e outras linhagens celulares para verificar sua atividade citotóxica e viabilidade celular;
- Criar uma emulsão à base de lipases produzidas pelo fungo *Fusarium solani*;
- Verificar a estabilidade do produto criado através de testes físico-químicos e de controle de qualidade.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Fungos

Os fungos podem ser de vários tamanhos, desde células microscópicas até organismos maiores terrestres (Sipos *et al.* 2018).

A partir dos metabólitos secundários produzidos por fungos está o primeiro antibiótico produzido de forma natural no mundo, a penicilina, o primeiro antibiótico  $\beta$ -lactâmico, isolado a partir do fungo *Penicillium spp.* Da mesma forma, alguns medicamentos imunossupressores, como o *cyclosporin*, que possibilita a realização de transplantes de órgãos, além de tratamentos contra o câncer e a redução do colesterol são alguns exemplos (Case *et al.*, 2022).

Os fungos também já são utilizados desde a década de 1990 na indústria de alimentos e bebidas, para fazer pão, queijo, cerveja, vinho e outros produtos (Dupont *et al.*, 2017).

Os fungos produzem uma diversidade de compostos bioativos, tornando-os ideais para produtos naturais. Acredita-se que cerca de 130 funções terapêuticas sejam formadas por fungos medicinais, incluindo ação imunomoduladora, antioxidante, cardiovascular, antiparasitário, antiviral, antifúngica, antibacteriana, hepatoprotetora, desintoxicante, antidiabética, bem como proteção contra o desenvolvimento de tumores e inflamação são exibidos por fungos. Além de serem produtores de algumas das moléculas bioativas como polissacarídeos, alcalóides, proteínas, gorduras, minerais, carotenóides, glicosídeos, terpenóides, folatos, tocoferóis, flavonoides, fenólicos, óleos voláteis, ácido ascórbico, lectinas, enzimas e ácidos orgânicos (Chugh *et al.*, 2022).

A biotecnologia fúngica é uma área especializada da biotecnologia que lida com o design e aplicação de biomassa fúngica, metabolismo ou genética para abordar e solucionar diversos problemas, nas mais diversas áreas, como segurança alimentar, energia renovável, na área médica e farmacêutica como também na questão de sustentabilidade ambiental. Apesar de vários estudos com fungos como decompositores, saprotróficos, e patógenos de plantas, as aplicações da biotecnologia fúngica só ganharam força significativa recentemente (Roth *et al.*, 2023).

Entre as diversas áreas na qual os fungos são utilizados como fonte de matéria-prima encontra-se a saúde. Nos últimos 50 anos, os metabólitos secundários de fungos transformaram a medicina. Uma nova fase na imunofarmacologia e em outras

drogas produzidas a partir de fungos incluem estatinas, equinocandinas e estrobilurinas, além da biotransformação fúngica de esteróides para a produção industrial de hormônios esteróides (Aly *et al.*, 2011).

Outra aplicação dos fungos é na produção de enzimas pelos fungos filamentosos. Enzimas como as proteases, dentre elas a renina, produzida pelo fungo *Mucor miehei*, são utilizadas na fabricação de queijos pela coagulação da proteína caseína do leite. Da mesma forma, as amilases que hidrolisam o amido são utilizadas pela indústria cervejeira para fornecer o açúcar para a fermentação e são produzidas pelos bolores *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (Pereira *et al.*, 2022).

Os fungos também são importantes em indústrias como as de detergentes, papelreira e têxtil que devido a produção de enzimas atuam sobre determinados substratos de forma mais sustentável. Os detergentes enzimáticos vêm sendo cada vez mais utilizados em substituição a substâncias corrosivas, como a soda cáustica, bastante importante na limpeza de gorduras. A literatura mostra que existem lipases produzidas por fungos como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* que são substitutas às substâncias cáusticas (Orlandelli *et al.*, 2012).

Alguns outros fungos presentes na indústria papelreira e têxtil são *Trichoderma viride* e *Trichoderma reesei* que são produtores de celulasas e importantes no processamento da celulose, na modificação da fibra, na produção de papel reciclado, na remoção de tinturas de peças de roupas e no melhoramento de tecidos de algodão. (Karnwal *et al.*, 2019).

### **3.1.1 *Fusarium***

Os membros do gênero *Fusarium* pertencem à família Nectriaceae, ordem Hypocreales, classe Sordariomycetes, filo Ascomycota, reino Fungi e domínio Eukaryotes. O gênero *Fusarium* foi descrito pela primeira vez em 1809 por Heinrich Friedrich Link e listado na taxonomia por Fries em 1821. Até o momento, existem 300 espécies conhecidas de *Fusarium*, mas quase metade delas não foi oficialmente descrita (Nikitin *et al.*, 2023).

As espécies mais comuns do gênero *Fusarium* incluem *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. equiseti* e *F. chlamydosporum*. Características macroscópicas e microscópicas, como cor da colônia, comprimento e forma dos macroconídios, número, forma e disposição dos microconídios e presença ou ausência de

clamidósporos são fundamentais características para a diferenciação de espécies de *Fusarium* (Larone, 1995; De Hoog *et al.*, 2000).

Métodos moleculares, como o sequenciamento do gene 28S RNAr, também são usados para identificação rápida de cepas de *Fusarium* em níveis de espécie e subespécie (Hennequin *et al.*, 1999). Além de outros que são métodos de detecção de DNAr baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR) (Lacmanova *et al.*, 2009) e detecção de padrões de bandas de proteínas por SDS-PAGE e eletroforese de isoenzima esterase (El-Kazzaz *et al.*, 2008).

Espécies de *Fusarium* são frequentemente consideradas como fungos do solo devido à sua abundância no solo. Suas diferentes espécies são consideradas alguns dos mais importantes patógenos de doenças de plantas, com algumas espécies produtoras em plantas que contaminam as sementes e entram na cadeia alimentar, afetando a saúde humana e animal e, portanto, são perigosos para produtos agrícolas, vida selvagem, gado e humanos (Arif *et al.*, 2011).

A ampla distribuição das espécies de *Fusarium* tem sido atribuída à capacidade desses fungos crescerem em uma ampla variedade de substratos e seus mecanismos são eficientes para a formação e dispersão de esporos (Okungbowa *et al.*, 2012).

Os fungos do gênero *Fusaria* também estão entre as causas mais frequentes de infecções invasivas por fungos (IMIs), perdendo apenas para o gênero *Aspergillus*. O complexo de espécies *Fusarium solani* (FSSC), contendo muitas espécies diferentes, é responsável por ~ 60% dos casos de fusariose em todo o mundo, variando de infecções localizadas na pele, unhas e olhos até IMIs disseminadas com risco de vida (James *et al.*, 2022).

### **3.1.2 *Fusarium solani***

*Fusarium solani* é um complexo de espécies que abriga diversas espécies filogenéticas distintas (O'donnel *et al.*, 2008). Tais espécies são alocadas em três clados; o clado 1 apresenta apenas duas espécies, ambas da Nova Zelândia; o clado 2 (O'donnel *et al.*, 2000) composto por oito espécies filogenéticas e pertencentes à América do Sul; e o clado 3, composto por dezoito espécies, sendo o clado mais comum e diverso.

*F. solani* inclui alguns fungos patogênicos importantes, que estão associados com doenças humanas e de animais, bem como uma variedade de espécies saprófitas e endofíticas (Summerell *et al.* 2011).

Alguns membros de *F. solani* causam severa podridão da coroa e da raiz de uma ampla variedade de plantas como ervilhas, feijões, tomates e tubérculos raízes e nos trópicos é frequentemente associado a cancos e problemas de morte das árvores (Nelson *et al.*, 1981).

*Fusarium solani* também foi isolado de olhos humanos e unhas e dos olhos e escamas de répteis e peixes (Rebell, 1981). Essa infecção é letal especialmente entre pacientes humanos imunocomprometidos, pois *F. solani* é resistente à maioria dos agentes antifúngicos disponíveis.

Além dos humanos, *F. solani* é conhecido ser patogênico para lagostas, cachorros, sanguessugas, camarões, tubarões, cobras e tartarugas mesmo que não seja considerado um fungo produtor de micotoxinas (Summerell *et al.*, 2011).

Dentre as várias aplicações do uso de *Fusarium solani*, na área ambiental está o processo de biorremediação por meio da síntese biológica de nanopartículas foi realizada utilizando filtrado de cultura extracelular de *Fusarium solani* YMM20. Dessa forma, as nanopartículas de metal variaram em tamanho de 20 a 50 nm e por nanotecnologia foi possível biorremediar Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup> com inúmeras vantagens para o meio ambiente (Mohammed & Khedr, 2021).

Entre as atividades biológicas, um estudo de Kyekyeku *et al.* (2017) relata *Fusarium solani* JK10, um fungo endofítico, habitando as raízes de *Chlorophora* regia garimpadas na floresta de Asakraka na Região Leste de Gana. Os metabólitos secundários de *F. solani* JK10 foram extraídos e explorados com isolamento de 09 compostos metabólitos secundários. As atividades antibacterianas *in vitro* dos compostos 1-9 e o extrato do produto bruto pode matar bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (DSM 799) e *Bacillus subtilis* (DSM 1088), a cepa ambiental Gram-negativa de *Escherichia coli* (DSM 1116) e a bactéria Gram-negativa do solo *Acinetobacter sp.* BD4 (DSM 586).

No seguimento industrial, a utilização do pigmento de *F. solani* BRM054066 como aditivo alimentar mostrou-se promissor, já que além de melhorar as características sensoriais de alimentos e bebidas, seus componentes podem trazer benefícios à saúde humana. A combinação dos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios conferiu-lhe uma ação protetora às propriedades dos constituintes celulares contra o estresse oxidativo e contra o dano tecidual causado por desordens inflamatórias (Menezes *et al.*, 2020).

Na agricultura foi detectado que os perfis fenólicos e flavonóides para cultivar a oliveira inoculada por *Fusarium solani* apresentaram altas concentrações de fenóis e flavonóides; o perfil fenólico incluía pirogalol, ácido gálico, catequeína, clorogênico, catecol, ácido cafeico, ácido vanílico, cafeína, ferúlico, cinâmico, reversetrol, cumarina, ácido benzóico e ácido salicílico, enquanto o perfil flavonoide incluindo kampferol, narengina, hespiridina, rutina, ácido rosmarínico, apegina, quercetina, ramnetina e acacetina (Shalapy & Kang, 2022).

Outro estudo também destaca os potenciais de *F. solani* PSC-R, incluindo sua capacidade antimicrobiana e antioxidante. Os parâmetros do processo de extração aumentaram a produtividade de metabólitos secundários de naftoquinonas e compostos fenólicos em 3,6 vezes e 1,5 vezes respectivamente. O aumento no rendimento dos metabólitos sugere que o meio otimizado é uma estratégia eficiente para aumentar a produção de metabólitos secundários na cultura em suspensão de *F. solani* PSC-R (Rathna *et al.*, 2016).

### 3.2 Enzimas

A palavra 'enzima' foi usada pela primeira vez pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne em 1878, quando ele descrevia a capacidade da levedura de produzir álcool a partir de açúcares, e é derivada das palavras gregas *en* (que significa 'dentro') e *zume* (que significa 'levedura') (Robinson, 2015).

As enzimas são proteínas catalisadoras formadas por uma longa cadeia de aminoácidos unidos por uma ligação peptídica. Estas são usadas para ativar qualquer reação ligando-se ao local específico do substrato. As enzimas são específicas em sua ação e sua atividade depende da concentração do substrato e de outras condições físicas, como temperatura e pH. As enzimas podem ser obtidas de várias fontes, como microrganismos, plantas e animais. As enzimas são classificadas com base em sua estrutura, função e natureza da reação (Uçak & Afreen, 2022).

As enzimas desempenham um papel importante na redução da energia de ativação e na aceleração de inúmeras reações biológicas que são cruciais para nutrir a vida sem causar modificações permanentes. A incapacidade das fontes vegetais e animais para satisfazer as demandas industriais de enzimas direcionou a atenção para as fontes microbianas (Guerrand, 2018).

A produção de enzimas microbianas é mais rápida, econômica, escalável e passível de manipulações genéticas. Dentre as fontes microbianas, os fungos

representam uma interessante fonte de enzimas industriais, compartilhando com mais de uma variedade de enzimas no mercado (Singh, 2019).

As enzimas fúngicas são caracterizadas por sua alta capacidade de produção, processo de purificação e de separação mais fáceis, especialmente para fungos filamentosos, e catálise eficiente com estabilidade desejada contra condições adversas. Além disso, os usos de fungos em um grande número de preparações tradicionais, como cerveja e panificação de períodos antigos, oferecem um contexto seguro e firme para suas aplicações recentes (Wang *et al.*, 2018).

As enzimas têm um papel importante nos desafios da humanidade em usar sistemas biológicos para uma ampla variedade de aplicações. Atualmente, as enzimas fúngicas são responsáveis por mais de 50% do mercado total de enzimas. Essa enorme participação de mercado é amplamente atribuída a algumas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Penicillium* que atendem aos requisitos de escala comercial para a produção de enzimas (El-Gendi *et al.*, 2022).

As enzimas também possuem função de biocatalisadores que aceleram as reações bioquímicas nos organismos vivos. Eles podem ser extraídos de células e usados para catalisar processos comercialmente importantes. Por exemplo, eles têm papéis importantes na produção de agentes edulcorantes e na modificação de antibióticos, são usados em pós de lavagem e em vários produtos de limpeza e desempenham um papel fundamental em dispositivos analíticos e ensaios que têm aplicações clínicas, forenses e ambientais (Robinson, 2015).

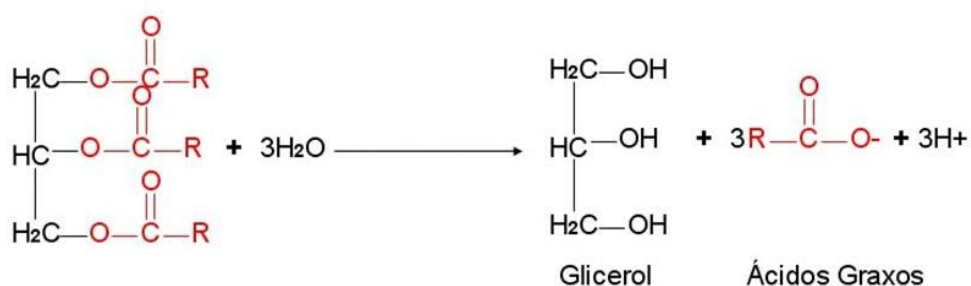
### 3.2.1 Lipases

A lipase foi descoberta pela primeira vez no suco pancreático como uma enzima por Claude Bernard em 1856, que hidrolisou gotículas de óleo insolúveis e as transformou em produtos solúveis. Posteriormente, foram observadas as produções de lipase nas bactérias *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* e *B. fluorescens* em 1901, e no cenário atual *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de bactérias *Pseudomonas fluorescens* foram detectadas para a produção de lipases em grande escala. A lipolase foi a primeira lipase recombinante comercial industrializada a partir do fungo *Thermomycesl anugiwnosus* e expressa em *Aspergillus oryzae* em 1994 (Chandra *et al.*, 2020).

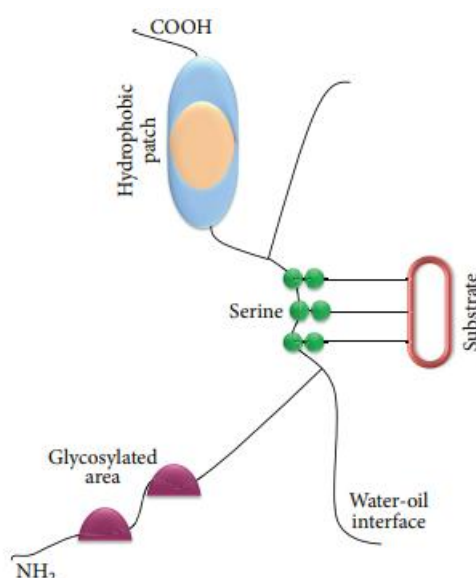
A enzima lipase pertence à família das triacilglicerol-acil hidrolases (EC 3.1.1.3). Elas podem catalisar a hidrólise e síntese de triglicerídeos de cadeia longa

em ácidos graxos, diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol conhecidos como carboxilesterases (Mehta *et. al.*, 2017).

Além da atividade de hidrólise, elas exibem atividades de interesterificação, esterificação, aminólise e alcoólise que são encontradas em uma ampla gama de indústrias. A lipase sintetiza ésteres de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa em meio não aquoso. As lipases microbianas são mais valiosas se comparadas as enzimas de plantas ou animais devido à variedade de atividades catalíticas disponíveis, produção de alto rendimento e simplicidade de manipulação genética, ausência de flutuações sazonais, fornecimento regular, estabilidade mais segura (Javed *et al.*, 2018), como ilustrado nas figuras 1 e 2.



**Figura 1.** Reação de hidrólise catalisada pela lipase  
 Fonte: Adaptado Lasoń & Ogonowski (2010)



**Figura 2.** Representação de uma molécula de lipase.  
 Fonte: Gopinath *et al.* (2013)

No mercado de enzimas, as lipases são consideradas um dos maiores grupos de enzimas comercializadas. O mercado internacional de lipase prevê vendas superiores a US\$ 797,7 milhões até 2025. O tamanho do mercado global de lipase microbiana foi de US\$ 349,8 milhões em 2019 e espera-se que mantenha uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 5,2% no período previsto de 2020 a 2025, atingindo US\$ 428,6 milhões até 2025 (Ali *et al.*, 2023).

As lipases são comumente usadas na indústria de alimentos e desempenham um papel efetivo na fabricação de uma variedade de produtos alimentícios. Da mesma forma, as lipases são amplamente utilizadas em produtos de limpeza industrial, processamento de couro, cosméticos, papel e indústrias de detergentes, enquanto outras aplicações de lipases em biossensores, produção de biodiesel, aplicações biomédicas, pesticidas e biorremediação são de grande importância (Fatima *et al.*, 2021).

Entre as novas utilizações da lipase na área médica e estética, a lipase no corpo humano é usada para quebrar as gorduras presentes nos alimentos para que possam ser absorvidas no intestino pois a deficiência de lipase leva à má absorção de gorduras e vitaminas lipossolúveis.

As lipases ajudam também na fibrose cística, doença de Alzheimer, aterosclerose, além de atuar como ferramenta de diagnóstico, a sua presença ou níveis crescentes podem indicar certa infecção ou doença. Na obesidade causa doenças metabólicas e é um grave problema de saúde em todo o mundo. Assim, a inibição da lipase digestiva para reduzir a absorção de gordura tornou-se a principal abordagem farmacológica para o tratamento da obesidade nos últimos anos (Loli *et al.*, 2015).

As lipases são usadas na indústria médica e farmacêutica. Por exemplo, as reações de interesterificação e transesterificação enantiosseletivas com a ajuda de lipases têm grande importância na indústria farmacêutica para reações seletivas de acilação e desacilação. As lipases desempenham um papel importante na modificação de monoglicerídeos para uso em emulsificantes em aplicações farmacêuticas. A lipase de *S. marcescens* foi amplamente utilizada para a hidrólise assimétrica do éster do ácido 3-fenilglicídico, que é o intermediário chave na síntese do cloridrato de diltiazem (Sharma *et al.*, 2014).

Da mesma forma, a lipase é utilizada na produção de biossensores. A determinação quantitativa de triacilglicerol é de grande importância no diagnóstico

clínico e na indústria alimentícia. O uso do dispositivo sensor de lipídeos como um biossensor é mais barato e consome menos tempo em comparação com os métodos químicos para a determinação de triacilglicerol. Na determinação quantitativa, as lipases são usadas para gerar glicerol a partir do triacilglicerol na amostra analítica e para quantificar o glicerol liberado por métodos enzimáticos ou químicos. Um exemplo é o biossensor de lipase de *Candida rugosa* que foi desenvolvido como uma sonda de DNA (Gopinath *et al.*, 2013).

### 3.2.2 Lipases fúngicas

Em comparação com plantas e animais, descobriu-se que os microrganismos produzem grande quantidade de lipases. As lipases fúngicas destacam-se como as principais fontes da enzima devido à sua capacidade de atividade catalítica, baixo custo de produção e relativa facilidade na manipulação genética. Há várias fontes de lipases, com diferentes propriedades, métodos de purificação, técnicas de imobilização e potencial industrial que tornam as lipases biocatalisadoras de primeira escolha (Mehta *et al.*, 2017).

A produção de lipase fúngica acontece principalmente por processos de fermentação em estado sólido e submerso com diferentes substratos e variação nas condições operacionais influenciadas por fatores físico-químicos e que desempenham importante papel na produção ótima de lipase (Geoffry *et al.*, 2018).

Hernández-Martín; Otero (2008) estudaram a síntese enzimática do biodiesel via alcoólise para diferentes óleos vegetais (girassol, oliva, soja e borragem) e utilizaram as lipases comerciais Novozym® 435 (*Candida antarctica*) e Lipozyme® TL IM (*Thermomyces lanuginosus*). As duas lipases converteram o lipídio para éster etílico após 48h (Novozym® 435) e 96h (Lipozyme® TL IM), com aproveitamento de 84% da reação.

Smitha *et al.*, (2014) rastreou 181 culturas de fungos por sua capacidade de secretar enzimas hidrolíticas usando ágar nutriente suplementado com tributirina como substrato e constatou que 60,2% apresentavam atividade lipolítica. Da mesma forma, entre dezoito cepas fúngicas isoladas rastreadas para atividade lipolítica exógena, cepas de *Aspergillus sp.* foram encontradas com maior atividade lipolítica.

Na indústria farmacêutica, as enzimas fúngicas oferecem várias vantagens sobre a síntese química, justificando assim a crescente procura pelas lipases. Estas vantagens incluem condições que evitam reações de isomerização, epimerização,

racemização e rearranjo e regioseletividade; e possibilita a reutilização de lipase imobilizadas; superexpressão da lipase e mutagênese da lipase para funções específicas, garantindo economia no processo de obtenção da mesma. A capacidade das lipases de resolver misturas racêmicas pela síntese de um único enantiômero é atualmente bastante explorada para produção de medicamentos pela indústria farmacêutica (Singh & Mukhopadhyay, 2011).

Em contrapartida, a atividade das enzimas lipolíticas não é bem definida pela ciência. Hellgren e Vicent (1981) consideram essas enzimas importantes para o desenvolvimento das infecções fúngicas como dermatofitoses, por causarem ruptura da superfície lipídica do extrato córneo. As lipases auxiliam os fungos a degradar ácidos graxos fungistáticos presentes na pele, colaborando como fator de virulência (Trabulsi, Althertum, 1990).

### **3.3 Aplicação biotecnológica das lipases microbianas.**

#### **3.3.1 Âmbito da saúde**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica obesidade como um dos problemas de saúde pública mais importantes do mundo. Em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos estavam acima do peso. Destes, 600 milhões já são obesos. De 1980 a 2013, tanto a obesidade quanto o sobrepeso aumentaram 27,5% entre adultos e 47,1% entre crianças. No Brasil, as taxas de obesidade crescem continuamente. Algumas pesquisas indicam que mais de 50% da população tem excesso de peso, ou seja, na faixa de sobrepeso e obesidade (Barroso *et al.*, 2017).

A obesidade e o sobrepeso são problemas de saúde que indicam acúmulo excessivo e anormal de gordura corporal e levar a efeitos adversos à saúde. A obesidade é uma doença crônica com grande prevalência e é agora considerada uma epidemia global que já possui vários tratamentos medicamentosos e não medicamentosos.

A mesoterapia é um tratamento terapêutico alternativo para tratar uma variedade de síndromes músculo-esqueléticas dolorosas como também reduções de gorduras localizadas. O termo mesoterapia vem da palavra “*mésothérapie*”, introduzida pelo médico francês Michel Pistor. Uma técnica que é minimamente invasiva, baseada em microinjeções contendo princípios ativos na camada superficial da pele correspondente à área a ser tratada. Este “microdepósito” origina uma liberação mais lenta do fármaco nos tecidos circundantes comparativamente à

administração parentérica, podendo apresentar benefícios como a utilização de uma dose inferior de princípio ativo; e um início rápido e duração de ação prolongada (Faetani *et al.*, 2021).

Uma forma de mesoterapia para redução de gordura local é baseada na estimulação da lipólise nas células de gordura, e o outro é baseado na destruição de células de gordura usando um detergente. Essa fusão preferencial de gordura, às vezes chamada de contorno corporal ou modelagem corporal. No entanto, está se juntando outras terapias, como injeções de toxina botulínica, como procedimento cosmético comum e popular. Assim, é importante para os interessados no tratamento da obesidade conhecer a mesoterapia, como funciona, seus benefícios e suas preocupações de segurança (Jayasinghe *et al.*, 2013).

Plachouri *et al.* (2019) realizaram uma revisão sistemática para examinar a eficácia e segurança da mesoterapia. Eles descobriram que a mesoterapia foi eficaz e bem tolerada. Porém, a mesoterapia no campo médico e cosmético apresenta necessidade de estudos sistemáticos maiores.

As lipases são utilizadas como ferramentas de diagnóstico mostram a indicação de várias doenças e também atuam como importantes alvos de drogas e enzimas marcadoras no organismo humano. Os níveis de lipase no sangue atuam como uma ferramenta de diagnóstico para a detecção de patologias como pancreatite aguda, além disso seus níveis são usados como marcadores no diagnóstico de doenças cardíacas (Mahfoudhi *et al.*, 2022).

A lipase é a enzima preliminar para o metabolismo da gordura e sua deficiência causa problemas de saúde perigosos. A lipase atua como um ativador de fator de necrose tumoral e auxilia no tratamento de doenças malignas tumores, (Singh e Mukhopadhyay, 2012).

A lipase é usada na síntese de lovastatina, uma droga amplamente utilizada no tratamento da redução do colesterol sérico. Da mesma forma, o fungo *Serratia marcescens* produz uma lipase que produz um ácido 3-fenil glicosídico que é um composto intermediário usado na síntese de cloridrato de diltiazem, uma droga usada como vasodilatador coronário em muitos países (Pérez *et al.*, 2019).

Semelhantemente, a lipase pode emulsionar gorduras juntamente com proteases e podem ser utilizadas no tratamento das doenças do trato digestivo em doenças gastrointestinais dispepsia e alergias cutâneas do sistema digestivo alergias (Mehta *et al.*, 2017).

Há estudos que mostram que as altas concentrações de triglicerídeos (TG) no soro sanguíneo podem estar relacionadas aos cânceres colorretais e pancreáticos ou lesões precoces de câncer. Dessa forma, a hidrólise dos TG plasmáticos, catalisada pelas lipoproteínas lipases (LPL), é reconhecida como uma alternativa para prevenir este tipo de câncer. Em humanos, o braço curto do cromossomo 8, que contém um supressor tumoral potencial, seria deletado, iniciando ou promovendo o carcinoma hepatocelular. Através da análise FISH, foi comprovado que a deficiência de LPL promove o câncer de próstata. Outros genes suscetíveis ao câncer também são deletados junto ao braço curto do cromossomo humano, sendo responsáveis pelo câncer de mama 2 (DBC2), câncer de fígado 1 (DLC1), e supressor tumoral mitocondrial 1 (MTUS1). Portanto, nestes cromossomos, a deleção do gene LPL coloca os genes relacionados ao câncer um fator de promoção da carcinogênese com efeito conjunto a outros fatores promotores de câncer (Chandra *et al.*, 2020).

### 3.3.2 Âmbito alimentício

As gorduras e óleos são componentes importantes dos alimentos. O valor nutricional e sensorial, assim como as propriedades físicas de um triglicerídeo, é fortemente influenciado por fatores como a posição dos ácidos graxos na estrutura do glicerol, o comprimento da cadeia do ácido graxo e seu grau de insaturação. As lipases são capazes de modificar as propriedades dos lipídios alterando a localização das cadeias de ácidos graxos no glicerídeo e substituindo um ou mais ácidos graxos por novos. A manteiga de cacau possui alto valor de gordura porque contém ácidos palmítico e esteárico de ponto de fusão de aproximadamente 37 °C. A fusão da manteiga de cacau na boca é utilizada para produzir uma sensação de frescor desejável em produtos como chocolate (Zorn *et al.*, 2016).

As lipases também são utilizadas *ex-situ* para produzir sabor e modificar a estrutura por meio de inter ou transesterificação, a fim de obter produtos com maior valor nutricional ou adequados para alimentação parental. As lipases também têm sido adicionadas nos alimentos para modificar o sabor pela síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e álcoois que alteram o sabor e fragrância (Mehta *et al.*, 2021).

As lipases facilitam a remoção de gordura de produtos de carne e peixe que tem uma produção de ésteres de ácidos graxos catalisada por lipase em fase sólida. As lipases são utilizadas para a produção de ésteres de ácidos graxos de açúcares,

como maltose e lactose. As lipases de *Candida rugosa* têm muitas aplicações na indústria de alimentos e sabores, assim como na produção de sorvete (Ray, 2015).

Elas são utilizadas também no processamento de vários produtos lácteos, como leite, manteiga, sorvete e queijo, aumentando a estabilidade das gorduras. Elas conferem sabores característicos ao queijo, por meio dos ácidos graxos livres produzidos pela degradação das gorduras do leite. Na panificação, as lipases de *B. subtilis* têm um papel importante o que incluem a prolongação da vida útil, a melhoria da maciez e o aumento do volume (Karaca e Guven, 2018).

As fosfolipases são utilizadas para melhorar o poder emulsificante da gema de ovo, melhorando assim não apenas o desempenho dos lipídios do ovo, mas também reduzindo a necessidade da quantidade de gema de ovo no processamento de alimentos. As propriedades emulsificantes do ovo vêm de seus lipídios. A fosfolipase hidrolisa a lecitina e a isolecitina do ovo. Assim, a gema de ovo processada é utilizada para a produção de maioneses, cremes, alimentos para bebês e molhos em grandes indústrias como Nestlé, Kraft e Unilever. (Aravindan *et al.*, 2007).

### **3.3.3 Indústria têxtil**

As indústrias têxteis são as indústrias mais antigas e utilizam uma grande quantidade de produtos químicos e por isso são as indústrias mais poluentes. Alguns desses produtos químicos são cancerígenos e têm efeitos alérgicos que afetam a saúde humana. Essas indústrias produzem resíduos como formaldeído, cloro, corantes, detergentes e metais pesados como chumbo e mercúrio, que causam problemas ambientais graves (Hooda, 2020).

Para substituir esses produtos químicos e superar esses problemas ambientais, as indústrias têxteis estão agora mudando de métodos convencionais para métodos biológicos que envolvem a aplicação de enzimas, uma vez que são estáveis, seguras e biodegradáveis; são amplamente utilizadas em substituição a esses produtos químicos tóxicos, além de ajudarem a melhorar a qualidade dos produtos fabricados (Kumar *et al.*, 2021).

O uso de lipases fúngicas tornou-se essencial nas indústrias têxteis, e essas lipases também são utilizadas para ajudar na remoção de solventes, proporcionando melhor absorção do tecido para um nivelamento elevado na coloração. Preparações comerciais também contêm a enzima lipase que é usada para afinar o denim e outros tecidos de algodão (Mehta *et al.*, 2017).

Na indústria têxtil, o poliéster é uma fibra sintética com certas vantagens distintas, como maciez, alta resistência, capacidade de lavagem, resistência à abrasão e resistência a rugas; quando a fibra de poliéster é tratada enzimaticamente por lipase, isso ajuda a melhorar sua capacidade de absorver corantes e produtos químicos catiônicos que apoiam a preservação do tecido. A lipase produzida a partir de *Aspergillus oryzae* é usada para modificar o tecido de tereftalato de polietileno (PET), aumentando sua polaridade e capacidade antiestática (Kumar e Kumar, 2020).

Em outro estudo, El Menoufy *et al.* (2022) relatou que o fungo *Aspergillus niger* NRRL-599 produziu uma lipase por meio de fermentação em estado sólido e produziu uma lipase imobilizada utilizando nanopartículas de titânio revestidas com gelatina. A lipase imobilizada é utilizada no tratamento da lã após a coloração para melhorar a cor e a resistência.

O uso de lipases fúngicas tem se tornado crucial nas indústrias têxteis, e as lipases fúngicas também são usadas para ajudar na remoção de lubrificantes de amido, proporcionando ao tecido uma melhor absorção, favorecendo um nível superior no tingimento. Preparações comerciais também contêm lipases que são usadas para a retirada do amido do jeans e de outros tecidos como algodão (Mehta *et al.*, 2017).

### 3.3.4 Indústria Cosméticas

As lipases têm desempenhado um papel significativo no setor cosmético e produtos de cuidados pessoais, como promotores de amaciamento, limpeza, aroma e cor. Este setor tem um valor de mercado considerável após a alimentação e setores farmacêuticos (Mehta *et al.*, 2017).

As lipases têm alto potencial de uso em perfumarias e cosméticos como na esterificação do glicerol produz mono e diglicerol onde são usados como surfactantes nos cosméticos e indústrias de perfumes. As lipases catalisam a transesterificação de 3,7-dimetil-4,7-octadieno-1-ol, cujo resultado é um ingrediente de fragrância muito importante na indústria de perfumaria.

Além disso, Mouad *et al.* (2016) relatou que a lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* é usada como um biocatalisador na fabricação de produtos de cuidados pessoais, como a pele cremes e óleos de banho e a *Candida antarctica* B produz uma lipase, que sintetiza uma composição anfifílica (Kumar *et al.*, 2023)

A indústria Unichem International localizada na Espanha produziu o palmitato de isopropila, miristato de isopropila e palmitato de 2-etilhexila, usados como emolientes em produtos cosméticos, como cremes para a pele e bronzeadores, além de óleos de banho, o que indica que o uso de lipases como substituto de ácidos convencionais como catalisadores podem melhorar a qualidade dos produtos cosméticos (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases são utilizadas na produção de finalizadores para cabelos e também como ingrediente de cremes antiobesidade, de uso tópico ou de administração oral (Mehta *et al.*, 2017). A vitamina A (retinol) e seus derivados têm sido usados em grandes quantidades em produtos farmacêuticos e cosméticos, como produtos para cuidados com a pele e os derivados solúveis em água do retinol são preparados com a reação catalítica da lipase imobilizada (Mahfoudhi *et al.*, 2022).

A Nippon Oil and Fats Co. Ltd. recebeu uma patente pela formulação de monoéster de glicerol de propileno na presença da enzima lipase; este éster é utilizado como emulsificante e agente de perolização nas indústrias de cosméticos e alimentos (Kim *et al.*, 1997). Em outra pesquisa, Khan e Rathod (2020) sintetizaram palmitato de n-butilo a partir da lipase de *Candida antarctica* B após imobilização covalente em esferas de poliacrilato hidrofóbicas e macroporosas em um meio livre de solvente.

### 3.3.5 Indústria de detergentes

O campo de aplicação mais comercialmente importante para lipases hidrolíticas é como aditivos em detergentes, tanto industriais quanto para lavanderia e uso doméstico (Garcia-Silvera *et al.*, 2017).

A lipase pode reduzir a carga ambiental dos produtos de detergente, pois economiza energia ao permitir que as temperaturas de lavagem sejam utilizadas mais baixas além de ajudar a manter a textura e a qualidade dos tecidos. As indústrias de detergentes são os principais consumidores de enzimas, tanto em volume quanto em valor (Verma *et al.*, 2012).

O uso de enzimas em formulações de detergentes melhora a capacidade dos detergentes, remove manchas difíceis e torna o detergente ambientalmente seguro. Atualmente, muitos produtos de detergentes para lavanderia contêm coquetéis de enzimas, incluindo proteases, amilases, celulasas e lipases (Jeon *et al.*, 2009).

As lipases possuem critérios para servir como aditivos em detergentes, incluindo estabilidade em pH alcalino, solubilidade em água, tensoativos e baixa

especificidade de substrato. A Genencor International introduziu lipases bacterianas comerciais, como a Lipomax de *Pseudomonas alcaligenes* e Lumafast de *Pseudomonas mendocina*, que foram utilizadas como enzimas detergentes desde o ano de 1995 (Rahman *et al.*, 2006).

Além disso, Xiao *et al.* (2021) também relatou que uma lipase recombinante Lip486 foi descoberta usando tecnologia de metagenômica funcional e pertence a uma nova subfamília chamada família de enzimas lipolíticas II. A Lip486 expressa grande atividade lipolítica e estabilidade, pH alcalino e estabilidade em ambientes de temperatura média-baixa; propriedades que a tornam ideal para indústria de detergentes.

### 3.3.6 Indústria de papel

Na indústria de celulose e papel é importante o descobrimento de novos métodos de cozimento em larga escala e baixo custo para maximizar o valor da lignocelulose não madeireira. Isso não só resolveria a escassez de matérias-primas, mas também reduziria a poluição ambiental e as emissões de carbono (Demuner *et al.*, 2011).

Jia *et al.* (2022) mostrou que a lipase e xilanase são enzimas usadas para pré-tratar a palha de trigo e a celulose da mesma. Os resultados mostraram que a lipase pode remover a gordura e a cera na superfície da palha de trigo, enquanto a xilanase degradou os componentes da hemicelulose, como o xiloglucano, da fibra da palha de trigo, destruindo a estrutura do complexo lignina-carboidrato, o que aumentou a remoção da lignina. Após o pré-tratamento combinado com lipase (15 U·g<sup>-1</sup>) e xilanase (15 U·g<sup>-1</sup>), o desempenho de cozimento da palha de trigo foi melhorado e o índice de tração (97,37 N·m·g<sup>-1</sup>), brilho (40,9% ISO) e rendimento (58,10%) da celulose aumentaram em 12,9%, 19,9% e 9,9%, respectivamente.

Para o papel reciclado, a lipase de destintagem pode aumentar a taxa de polpação da polpa, intensificar e aumentar a brancura, reduzir o uso de produtos químicos, diminuir o nível de poluição da água residual, prolongar a vida útil dos equipamentos, economizar energia e tempo, e reduzir o custo inerente à produção do mesmo.

Em um processo de destintagem para o óxido de etileno – óxido de propileno, a lipase de *Pseudomonas sp.* KWI-56 melhorou a brancura do papel e reduziu manchas permanentes de tinta. A abordagem de monitoramento do pitch enzimático

têm sido utilizados em um processo de fabricação de papel em grande escala como operação rotineira desde o início da década de 1990, utilizando lipases (Chandra *et al.*, 2020).

### 3.3.7 Biorremediação de águas residuais

A biorremediação de águas residuais mediada por lipases é uma técnica inovadora e bastante utilizada no gerenciamento de resíduos na biotecnologia de lipases. As lipases têm aplicações em processos aeróbicos de resíduos, onde camadas finas de gorduras são continuamente removidas da superfície de tanques aerados para manter o fornecimento de oxigênio, onde esse líquido rico em gorduras é digerido pelas lipases (Cruz *et al.*, 2020).

Da mesma forma, espécies fúngicas podem ser aplicadas para degradar derramamentos de óleo no ambiente costeiro, o que pode melhorar a restauração ecológica e também ajudar no processamento enzimático de óleo nas indústrias (Gopinath *et al.*, 1998).

Algumas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Beauveria* e *Engyodontium* são exemplos de fungos que recentemente são potenciais agentes de biorremediação no solo (Islam e Datta, 2015).

*Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger* são espécies que produzem lipases e são usadas na biorremediação de solos poluídos e na degradação de filmes de álcool polivinílico, respectivamente. As lipases de *Aspergillus uvarum* e *Aspergillus ibericus* também têm aplicações em processos de biorremediação de águas (Salgado *et al.*, 2016).

Um estudo de Basheer *et al.* (2011) isolou o fungo *Aspergillus awamori* BTMFW032 da água do mar, que foi capaz de produzir lipase e reduzir aproximadamente 92% dos conteúdos de gordura e óleo do efluente contendo óleo residual. Uma lipase isolada de *Geotrichum candidum* também tem aplicações em biorremediação e no controle da descoloração de águas residuais na produção de azeite (Kumar *et al.*, 2020).

### 3.3.8 Biossensores

Os sensores eletroquímicos são uma plataforma adequada para a construção de um biossensor ou bioensaio e podem usar lipase como parte do reconhecimento

do analito. Técnicas de voltametria, como cronoamperometria (amperometria), voltametria de pulso e potenciometria são aplicadas para esse propósito.

A lipase pode ser imobilizada na superfície de um sensor baseado em um transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET), um auto condutor é adequado para esse propósito. Um ISFET com lipase imobilizada do pâncreas suíno foi utilizado por Pojanowska e colaboradores (2001) para a medição de vários triglicerídeos. A lipase foi aprisionada em gel de alginato em esferas de vidro revestidas com queratina, e as esferas modificadas foram adsorvidas em folhas de nitrocelulose. Eles comprovaram o ensaio para triacetina, tributirina e trioleína, que foram medidos com uma sensibilidade de 0,022 pH/mmol/L (triacetina), 0,478 pH/mmol/L (tributirina) e 0,128 pH/mmol/L (trioleína).

Um método analítico fluorimétrico baseado em microplacas foi desenvolvido para medir a atividade de transesterificação da lipase. Eles realizaram o ensaio com dois substratos: 4-metilumbeliferona e metanol em tert-butanol. O produto da reação, 4-metilumbelliferona, foi medido fluorimetricamente com luz de excitação a 330 nm e emissão a 390 nm. O ensaio foi verificado com lipases dos fungos *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus* e das bactérias *Pseudomonas cepacia* e *P. fluorescens*. Os autores relataram a total aplicabilidade do ensaio na caracterização das lipases, como também um potencial para bioensaios baseados na reação fluorimétrica (Pohanka, 2019).

### 3.4 Emulsões

Emulsões são sistemas dispersos em água-óleo, termodinamicamente instáveis, que tendem a se separar sob o efeito de forças externas e/ou perturbações. Tal separação ocorre em tempos que podem diferir de várias ordens de magnitude. A previsão desses tempos de vida, bem como a adaptação da microestrutura da emulsão, são aspectos essenciais nos campos tecnológicos onde emulsões são produzidas e utilizadas (Ravera *et al.*, 2021).

#### 3.4.1 Macroemulsão

A macroemulsão é caracterizada pelo maior tamanho de gotículas dentro das emulsões. O tamanho das gotículas da macroemulsão é maior que 400 nm, o que a classifica como uma emulsão grosseira. Fisicamente, ela é descrita como um líquido

cremoso, pegajoso, mas fluido. Pode ser formada em dois tipos: água em óleo (W/O) ou óleo em água (O/W).

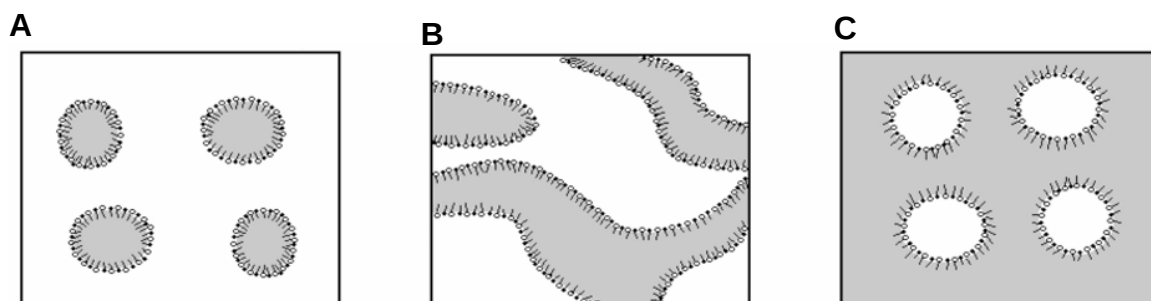
### 3.4.2 Nanoemulsão

A nanoemulsão é caracterizada por ter um tamanho médio de gotículas, variando entre 100 nm e 400 nm. Fisicamente, ela é descrita como um líquido translúcido ou transparente e fluido. Em comparação com a microemulsão, a nanoemulsão é termodinamicamente instável, pois reage com a troca de temperatura ambiente, o que pode afetar sua aparência.

Durante o aquecimento ou misturas com alta taxa de cisalhamento em processos de preparação de alimentos, a nanoemulsão pode ficar levemente turva e depois voltar a ser transparente quando esfria. Isso é diferente da microemulsão, que permanece transparente e estável em diferentes temperaturas.

### 3.4.3 Microemulsões

Uma microemulsão (ME) é um sistema estável termodinamicamente e transparente em várias direções, formado por dois líquidos que não se misturam, geralmente água e óleo, e que são estabilizados por uma camada de tensoativos na interface entre o óleo e a água. Para preparar uma ME, são combinados de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito (Mitsou *et al.*, 2018). Existem três tipos de microemulsões: microemulsão O/A, bicontínua e microemulsão A/O (figura 03).



**Figura 3.** Tipos de microemulsões esquematizadas pela fase oleosa (cinza), pela fase aquosa (branca) e por um filme interfacial de tensoativo/cotensoativo. A: microemulsão O/A, B: bicontínua e C: microemulsão A/O.

As microemulsões são reconhecidas como plataformas inovadoras para a liberação de medicamentos, permitindo uma liberação prolongada ou controlada

através de diferentes formas de administração, como pela pele, por via oral, nasal, intravenosa, oftálmica, entre outras. Usar microemulsões para liberar medicamentos é uma estratégia eficaz para aumentar a precisão no alcance de alvos específicos no corpo, melhorar os resultados do tratamento e reduzir a toxicidade. Devido às suas propriedades únicas, com áreas de diferentes polaridades, as microemulsões têm um grande potencial como veículos para a liberação de medicamentos em diversos tipos de produtos farmacêuticos. (Khushwant *et al.*, 2023).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Identificação morfológica de *F. solani*

O *Fusarium solani* utilizado neste estudo foi obtido da coleção de fungos do Maranhão localizada no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão obtido a partir de amostras da Bauxita presente na Alumar, região da Vale na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. O fungo foi isolado e cultivado em meio BDA (Potato Dextrose Agar) por 7 dias a 25°C. Para identificação morfológica, foram utilizadas técnicas de microcultura de Ridell (1950) com adaptações de protocolos existentes no Laboratório de Micologia (NIBA/DEPAT/CCBS/UFMA). A amostra obtida possui proteção de acordo com a lei de Biodiversidade e cadastro no SISGEN (Leis nº 13.123 de 20/05/2015) sob o número A10722E (BEZERRA *et al.*, 2014).

### 4.2 Identificação molecular do fungo *F. solani*

A identificação molecular de *F. solani* foi realizada de acordo com a metodologia de Valenzuela-Lopez *et al.* (2017) com adição de esférulas de vidros e adaptações para realização de lise celular da parede de quitina. Posteriormente, fez-se uma eletroforese com check gel 1% e verificou-se a qualidade do DNA seguida de uma quantificação de DNA e pureza em um espectrofotômetro nanodrop® Thermo Fisher Scientific.

Para análise molecular, foram utilizados primers da região espaçador transcrito interno (ITS) e fragmentos ITS 1 e ITS 4 (White *et al.*, 1990). As sequências de nucleotídeos utilizadas foram ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de acordo com Khan *et al.* (2018) e Kalman *et al.*, (2020).

A Reação da cadeia em polimerase (PCR) das regiões tiveram volume final de 25 µl, contendo 13,8 µl de água ultra pura; 2,5 µl de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 – 500 mM KCl, 1x), 1,5 µl de dNTPs (2.5 mM), 1,0 µl dos primers ITS1 e ITS4 (10 mMol mL<sup>-1</sup>), 2,0 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,7 µl de Taq DNA polymerase (5 U/mL<sup>-1</sup>), 2,5 µl DNA (5 ng mL<sup>-1</sup>) e seguindo as seguintes condições de termociclagem no equipamento Termociclador: 95 °C por 7 min (35 ciclos 95 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 1 min) e depois 72 °C por 7 min para extensão e finalizando em 4 °C infinito. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 2% a 90

V por 90 min em TBE 1X. Os produtos foram avaliados quanto a qualidade em transluminador.

### **4.3 Obtenção da lipase de *F. solani***

Com o objetivo de obter alta atividade lipolítica e alta concentração de proteína, foi verificado quais dos processos de fermentação para produção de lipase utilizando o *F. solani* seria a fermentação ideal.

#### **4.3.1 Fermentação Submersa da lipase de *F. solani***

Os meios líquidos foram preparados de acordo com a metodologia de Oliveira *et al.*, (2013) com o substrato azeite de oliva na concentração de 5% (V/V). Foram preparadas soluções contendo cinco fragmentos de aproximadamente 5mm<sup>2</sup> do meio de cultura contendo micélios que foram transferidas para frascos contendo 250 mL de solução tampão tris - HCl 50 mM pH 7,0, sulfato de magnésio (0,2g/L), fosfato dipotássico (0,04 g/L) e 0,01% de tween 80 (P/V) e substrato.

Os meios líquidos foram mantidos sob agitação orbital a 190 rpm a uma temperatura de 25°C por 4 dias, foram filtrados e centrifugados a 10.000 rpm a 4°C por 25 minutos e o sobrenadante foi considerado como um extrato bruto de lipase.

#### **4.3.2 Fermentação Semi-sólida da lipase *F. solani***

A fermentação semi-sólida foi preparada de acordo com a metodologia de Pastore *et al.* (2003) adaptada, foram inoculados cinco fragmentos de aproximadamente 5mm<sup>2</sup> do meio de cultura contendo micélios em frascos de 250 mL contendo meio de cultura composto de farelo de trigo, tampão tris-HCl 50 mM pH 7,0 e azeite de oliva na proporção 1:1 (P/V) mantidos a 25°C por 5 dias. Após este tempo, o extrato bruto da lipase foi extraído com a adição de tampão tris-HCl 50 mM pH 7,0 na proporção de 1:10 (P/V) no meio de cultura. Os meios de cultura foram homogeneizados em rotação orbital de 190 rpm por 30 minutos a uma temperatura de 25 °C, em seguida, o homogeneizado foi filtrado e centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C por 25 minutos e o sobrenadante foi utilizado para estudos posteriores.

### **4.4 Purificação de lipase de *F. solani***

Os extratos sobrenadantes obtidos da centrifugação das fermentações submersa e semi-sólida de lipase obtidos foram precipitados em (0-80%) de sulfato

de amônio (546,6 g/L) conforme metodologia de Oliveira *et al.* (2020) adaptada. Sulfato de amônio foi adicionado aos extratos brutos de lipase e mantidos a 4 °C por 24 horas com leve agitação, após o que foram centrifugados a 10.000 rpm por 25 minutos a 4 °C.

O precipitado foi ressuspendido em um volume na proporção ¼ do volume total do extrato centrifugado com tampão tris - HCl 50 mM pH 7.0. Em seguida, foi realizado o processo de diálise, a suspensão foi dialisada em 5 litros contra o mesmo tampão utilizado para preparação dos extratos brutos a 4 °C por 6 h, com duas trocas a cada 3 horas e a última troca foi mantido em “overnight”. Após a diálise, os precipitados foram centrifugados a 10.000 rpm por 25 minutos a 4°C e ressuspendido com o mesmo tampão e ultrafiltrados no Vivaspin® (100 kDa).

Após passar pelo Vivaspin® (100 kDa), os precipitados foram centrifugados a 10.000 rpm por 25 minutos a 4°C e foram ressuspendidos com o mesmo tampão utilizado para preparação dos extratos e armazenados a -14°C para os estudos seguintes classificados como: Lipase F1 (Fermentação semi-sólida) e lipase F2 (Fermentação submersa).

#### **4.4.1 Cálculo da Determinação da Atividade Específica e do Índice de Purificação de Enzimas**

O índice de purificação de enzimas é uma medida utilizada para avaliar a eficiência do processo de purificação de uma enzima. Esse índice indica quantas vezes a proteína de interesse foi concentrada em relação ao material inicial. O cálculo do índice de purificação, incluindo a fórmula necessária para sua determinação (Baraj, E. & Augusto-Ruiz, W., 2007).

A determinação atividade específica de uma enzima é calculada como a razão entre a atividade biológica da enzima (medida em unidades de atividade enzimática) e a quantidade total de proteína presente na amostra (geralmente medida em mg). A fórmula é:

$$\text{Atividade Específica (AE)} = \frac{\text{Quantidade Total de Proteína (mg)}}{\text{Atividade da Enzima (unidades)}}$$

O índice de purificação reflete o aumento da atividade específica da enzima após cada etapa do processo de purificação. Ele é calculado pela razão entre a

atividade específica da enzima no final da purificação (atividade final) e a atividade específica no início (atividade inicial). A fórmula para calcular o índice de purificação é:

$$\text{Índice de Purificação} = \frac{\text{Atividade Específica Inicial}}{\text{Atividade Específica Final}}$$

#### 4.5 Concentração de proteína lipase *F. solani*

A concentração de proteína foi estimada pelo método de Warburg e Christian (1941) em um espectrofotômetro em absorbâncias de 260 nm e 280 nm usando a seguinte fórmula:

$$[\text{Concentração de proteína}] \text{ mg/mL} = A_{260\text{nm}} \times 1,55 - A_{280\text{nm}} \times 0,75$$

#### 4.6 Determinação da atividade lipolítica de *F. solani*

A determinação das atividades de lipase foi realizada por meio da hidrólise do substrato cromogênico palmitato de nitrofenil (p-NPP) conforme metodologia descrita por Silva *et al.* (2005). A atividade foi avaliada adicionando 10 µL de extrato de lipase e 90 µL de emulsão p-NPP e incubada a 37 °C por 30 minutos e realizada a leitura de microplaca a 410 nm. Uma curva de calibração foi construída com concentrações de p-NPP entre 4,2 a 140,0 mmol. Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de p-NPP liberada por minuto por volume de reação (mmol/min/mL).

#### 4.7 Análise de pureza por SDS-PAGE

A lipase de *Fusarium solani* foi submetida à análise de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando gel de empilhamento e separação a 12% (v/v). A metodologia seguiu as adaptações do protocolo de Laemmli (1970), empregando lipase comercial como referência para comparar o grau de pureza. As bandas de proteína foram visualizadas através de coloração por prata, e o peso molecular das bandas foi comparado com um marcador de proteína de 12-120 kDa.

#### 4.8 Caracterização físico-química da lipase de *F. solani*

##### 4.8.1 pH ótimo e estabilidade

Diferentes faixas de pH foram testadas com variações de pH 3,0 a 9,0 de soluções tampão acetato 0,1M, tris - HCl 0,1M e tampão citrato fosfato 0,1M. Para estabilidade, a reação de cada faixa de pH foi mantida por 1 hora a 35°C, que é a temperatura ótima.

#### **4.8.2 Temperatura ótima e estabilidade**

Para determinar a temperatura ótima, a solução de lipase e p-NPP (p-nitrofenil palmitato) foi mantida por 30 minutos em temperaturas de 10 a 90 °C e para estabilidade, a enzima foi mantida por 1 hora nas mesmas faixas de temperatura.

#### **4.8.3 Efeito do tempo de incubação**

A atividade da enzima lipase pura de *F. solani*, lipase comercial e das lipases nas microemulsões foram medidas incubando a mistura reacional no pH e temperatura ótima com o objetivo de verificar a sua estabilidade a longo prazo. As atividades foram analisadas a cada 1 hora do tempo 0 a 6h seguindo a metodologia de Abdella *et al.* (2023) com adaptações.

#### **4.8.4 Efeito de surfactantes e íons**

Com o objetivo de verificar quais compostos podem causar uma possível diminuição da atividade enzimática de lipase, foi verificada a estabilidade contra diferentes surfactantes e íons utilizando a metodologia de Coradi *et al.* (2013), lipase de *F. solani* foi incubada por 1 hora em diferentes proporções 0,01%, 0,10% e 0,50% (p/v) dos seguintes surfactantes: Triton X-100, Tween-20 e Tween-80 (não iônico) e dodecil sulfato de sódio SDS (iônico). O efeito dos íons na atividade da lipase foi investigado de acordo com a metodologia de Oliveira *et al.* (2020) adaptada por pré-incubação de lipase *F. solani* em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) com 0,01 mM de Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> a 37°C por 1 hora.

#### **4.8.5 Estabilidade em solventes orgânicos**

Para determinar a estabilidade da lipase F2 de em cetona, etanol, metanol e isopropanol, a metodologia de Oliveira *et al.* (2020) adaptado, a enzima foi incubada por 1 hora a 37 °C em diferentes concentrações de solvente (25, 50, 80 e 100%, v/v).

#### **4.8.6 Tempo de armazenamento**

Com o objetivo determinar o tempo de armazenamento da Lipase de *F. solani* em temperatura de  $-34^{\circ}\text{C}$  foi verificado a atividade lipolítica desta enzima a cada 15 dias para determinar a sua atividade residual (Paula *et al.*, 2008).

#### 4.8.7 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

O efeito antirradical do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) pelos extratos foi medido por um método previamente utilizado por Shimada *et al.* (1992) adaptada por Dlamini *et al.* (2022). A lipase nas concentrações 100, 50, 25, 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  enquanto o radical DPPH foi preparado em 5% DMSO em metanol.

A molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) é classificada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron sobressalente sobre a molécula como um todo que a impede de dimerizar. Quando uma solução de DPPH é misturada a uma substância antioxidante, ela doa um átomo de hidrogênio que reduz sua forma e perde sua cor violeta.

Resumidamente, 5  $\mu\text{L}$  de amostras e 45  $\mu\text{L}$  de DMSO 5% em metanol foram misturados com 150  $\mu\text{L}$  de DPPH (400  $\mu\text{M}$ ) em uma placa de 96 poços e incubados no escuro à temperatura ambiente. Após 90 min, a absorbância dos extratos foi registrada em 517 nm. O hidroxitolueno butilado (BHT) foi usado como composto de referência. O efeito de eliminação das amostras foi determinado usando a seguinte fórmula:

$$\text{Efeito eliminador}(\%) = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

onde:  $A_c$  = Absorbância do controle negativo

$A_a$  = Absorbância da amostra

#### 4.8.8 Determinação da atividade antioxidante total pelo método ABTS

A avaliação da atividade antioxidante da lipase de *F. solani* e da microemulsão da incorporada com a lipase foi conduzida utilizando a técnicas ABTS conforme proposto por Re *et al.* (1999) com adaptações de Teles *et al.* (2021). Inicialmente, as amostras foram medidas em triplicata, com concentrações variando de 1000 a 250  $\mu\text{g/mL}$ . Para realizar as medições, 100  $\mu\text{L}$  de cada solução foram transferidos para tubos de ensaio, seguidos pela adição de 3000  $\mu\text{L}$  da solução do respectivo radical ser testado, foram homogeneizados, e mantido em ambiente escuro por 6 minutos

para a técnica ABTS. O etanol foi utilizado como controle (branco). Após o abrigo de luz as absorbâncias foram lidas a 734nm, foi possível construir a curva "concentração vs. absorbância" para cada amostra.

A curva-padrão foi preparada usando soluções de trolox (10 a 1000 µM), em triplicata. O procedimento para a leitura das curva-padrão foi o mesmo descrito para as amostras, com a exceção do volume de padrão utilizado (30 µL). Para calcular a concentração de 1000 µM de trolox correspondente à absorbância "y" obtida, substituímos o valor de "x" na equação da curva-padrão. Em seguida, nas equações das retas geradas pelas amostras, substituímos o valor de "y" pela absorbância correspondente a 1000 µM de trolox calculada. Isso permitiu determinar a diluição da amostra equivalente a 1000 µM de trolox. Os valores de "x" encontrados foram convertidos em gramas, e a atividade antioxidante foi expressa em µM trolox/g da amostra.

Foi ainda realizado a determinação do EC50 do trolox, em que inicialmente foi preparada a curva-padrão utilizando soluções de ABTS (50 a 1000 µM). A partir da equação linear obtida, substituiu-se o valor de "y" pela metade da absorbância inicial do grupo controle. Isso permitiu determinar a quantidade de ABTS correspondente, expressa em µM, conforme descrito por Rufino *et al.* (2017).

Usando as equações de reta obtidas das amostras, substituímos novamente o valor de "y" pela metade da absorbância inicial do grupo controle. Isso nos permitiu determinar o valor de "x", que representa a Concentração Efetiva (EC50). A EC50 é a concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do ABTS.

Para expressá-la em g amostra/g de ABTS, utilizou-se a equação:

$$W = \frac{EC_{50}(\frac{mg}{L})/1000}{X}$$

Onde: x é a concentração de ABTS encontrada pela equação da curva-padrão do ABTS, após transformação para gramas.

#### 4.9 Metodologia geral de preparação de cultura

As linhagens celulares, as linhagens saudáveis controle, foram adquiridas da coleção de cultura americana (ATCC). Todas as células foram cultivadas em estufa a

37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%, umidade de 80-95%, em meio de cultura recomendado pelo fabricante, suplementado com 5-10% de soro fetal bovino. Os meios indicados para as células são RPMI-1640; EMEM e DMEM. As linhagens celulares foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%, umidade 80-95%, com meio de cultura recomendado pelo fabricante. Para o experimento, o meio de cultura DMEM foi desprezado e a cultura lavada três vezes com tampão fosfato (PBS).

Após a retirada de todo o PBS, tripsina foi adicionada à cultura a fim de liberar as células da superfície plástica. Para facilitar a liberação das células, após a adição da tripsina, a cultura foi mantida a 37 °C (em estufa de CO<sub>2</sub> 5%) por 5 minutos, e em seguida, transferidas para um tubo falcon contendo meio de cultura suplementado com SFB (soro fetal bovino), a fim de inativar a ação da tripsina. As células foram centrifugadas a 1200 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 5 mL do meio sem SFB. A contagem das células foi feita com 10 µL dessa solução em câmara de Neubauer com leitura em microscópio. Para os experimentos, as células serão plaqueadas em placas de 96 poços com 20.000 células/poço (Segeritz CP & Vallier L., 2017).

#### **4.9.1 Avaliação da viabilidade celular por MTT**

Foram analisados em células derivadas de fibroblasto humano (células GM) e linhagem celular de macrófagos murinos (RAW). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina G (60 mg/L), estreptomicina (100 mg/L) a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. As células cultivadas ( $1 \times 10^4$  células/mL) foram tratadas com 0,5; 1; 5; 10; 15, 20; 40; 60 e 100 µg/mL de lipase de *F. solani* por 24, 48 e 72 h. O sobrenadante foi removido e 100 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adicionado a cada poço e incubado a 37°C.

Após isso, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 3 h ao abrigo da luz e, após a lavagem, os cristais de formazan foram solubilizados com DMSO (100 µL). Em seguida, leituras colorimétricas foram realizadas sem um espectrofotômetro de placa utilizando um comprimento de onda de 560 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem relativa à absorbância determinada no grupo controle. Foram realizados três experimentos independentes (Badisa *et al.*, 2011).

#### 4.9.2 Análise estatística

Os resultados deste estudo foram analisados por ANOVA e análise de Tukey ( $p < 0,05$ ) usando o software GraphPAD Prism® version 8.0.1. Os resultados foram relatados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) de determinações em triplicatas.

#### 4.10. Formulações Biotecnológicas

##### 4.10.1 Construção do Diagrama de Fases Pseudoternário

Para criar microemulsões, foi utilizado o método convencional de titulação conforme explicado por Tartaro *et al.* (2020). Foram combinados miristato de isopropila com Tween 80 e álcool isopropílico numa proporção de 3:1 em diferentes misturas, variando de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Cada mistura foi titulada com água e agitada magneticamente até observar mudanças ópticas, indicando a turbidez ou a separação defases, o ponto final da titulação (Figura 3).

Os experimentos foram realizados em triplicata para garantir a consistência dos resultados. Com base na composição encontrada no ponto final das amostras tituladas, foi calculada a porcentagem volumétrica dos componentes - óleo, surfactante e água. Estes valores foram então representados em um diagrama de fase ternário, utilizando o software Origin 8.0, o que permitiu identificar a área propícia para a formação de microemulsões.

Dentro da região identificada para a formação de microemulsões no diagrama de fases, foi selecionada uma formulação específica para avançar no desenvolvimento das microemulsões.

##### 4.10.2 Preparo da microemulsão carregada com lipase extraída de *F. solani*

A formulação da microemulsão consistiu em 40% de Miristato de Isopropila P.A. (componente oleoso), 50% de Tween 80/Álcool isopropílico (na proporção 3:1, atuando como surfactante/cosurfactante) e 10% de água destilada (fase aquosa). Inicialmente, a fase oleosa foi combinada com o surfactante/cosurfactante. A fase aquosa (água destilada) foi então adicionada gota a gota, enquanto era agitada magneticamente a 50rpm. Após 15 minutos nessa condição, o composto foi filtrado.

A microemulsão, contendo a enzima extraída de um fungo, foi incorporada à fase oleosa (miristato de isopropila) a uma concentração de 1500  $\mu\text{g/mL}$ . Esta mistura foi então combinada com o surfactante (Tween 80) e cosurfactante (álcool isopropílico) sob agitação constante. A adição gradual de água, gota a gota, com

agitação vigorosa a temperatura ambiente foi realizada seguindo a formulação mais eficaz até que a microemulsão transparente fosse obtida.

Após a formação da microemulsão com a enzima do fungo, o sistema foi mantido em equilíbrio sob agitação magnética suave por 15 minutos. Posteriormente, a microemulsão passou por filtração usando papel de filtro Whatman (nº 40) para purificação e isolamento dos componentes desejados.

#### **4.10.3 Caracterização da Microemulsão**

##### **4.10.3.1 Tamanho hidrodinâmico das micropartículas e índice de polidispersividade (PDI)**

Tamanho hidrodinâmico da microemulsão foi realizada utilizando-se a técnica de DLS (Dynamic Light Scattering) com o auxílio do equipamento Zetasizer (malvern zetasizer ver.7.03, mal1098091). Para a medida do tamanho gotas por DLS, as amostras foram preparadas a partir de uma diluição 1:1000 da formulação em água destilada.

Desta análise obteve-se a distribuição de tamanhos, o tamanho médio e o índice de polidispersão. A análise neste trabalho se deu de forma qualitativa, isto é, um menor PDI é indicativo de uma menor dispersão de tamanhos, logo, maior homogeneidade de material.

##### **4.10.3.2 Determinação do tamanho das partículas e potencial zeta**

As medidas de potencial zeta foram realizados também no equipamento ZetaSizer da Malvern. As suspensões da microemulsão foram diluídas a uma concentração de 1:1000 e levadas ao equipamento com o auxílio de uma cubeta, onde foi realizada a análise.

#### **4.10.4 Controle de qualidade das microemulsões desenvolvidas**

Observou-se macroscopicamente, por 30 dias, características como transparência, separação de fases e formação de precipitados. O pH foi medido em pHmetro de bancada (HANNA INSTRUMENTS, HI2221), calibrado com soluções padrões de 4,01, 7,01 e 10,01. As medidas foram determinadas através da imersão do eletrodo em 20 mL de amostra e estabilização do equipamento. O índice de refração foi obtido em refratômetro ABBE de bancada (QUIMIS, 07678, Brasil). E calibrado com água destilada. A condutividade foi avaliada utilizando um

condutivímetro microprocessado (QUIMIS, Brasil), através da imersão do sensor e termômetro em 20 mL das formulações.

#### **4.11 Aplicações Biotecnológicas**

##### **4.11.1 Degradação de gordura animal da microemulsão de lipase de *F. solani* imobilizada**

O experimento foi realizado de acordo com a metodologia de Uppada *et al.* (2017). Foram pesados e autoclavados 10 gramas de tecido adiposo (gordura) de frango. Em seguida, foram adicionados 500 microlitros (100 U/mL) da lipase de *F. solani* livre, da lipase comercial e de suas microemulsões ao tecido, que foi incubado a 37 °C. Além disso, foram realizados dois grupos de controle no qual nenhuma enzima foi adicionada e o controle da microemulsão sem enzima. A cada 24 horas, foram medidos o peso e a atividade enzimática para verificar o processo de degradação da carne.

##### **4.11.2 Potencial uso como aditivos em detergentes**

A eficiência da microemulsão com lipase de *F. solani* foi com os detergentes líquidos (Ypê, Minuano, Limpol, Oi, Brilux), seguindo o protocolo de Bacha *et al.* (2016). Os detergentes foram mantidos a uma temperatura de 90°C por 10 min para desnaturação das enzimas contidas no meio antes do ensaio ser realizado. Foi misturado com detergentes líquidos e em pó diluídos em solução tampão Tris – HCl 0,05M pH 7,0 em concentrações de 0,01, 0,1% e 1% (v/v) por 30 minutos a 37 °C. A atividade enzimática foi então avaliada através do espectrofotômetro na absorbância de 410 nm.

##### **4.11.3 Potencial uso como aditivo em sabão**

Foram testados quanto à sua eficiência com sabões líquidos (Tixan Ipê, Brilhante, Ala, Bem-te-vi e Omo), seguindo o protocolo de Alabdall et al. (2021). Os sabões foram mantidos a uma temperatura de 90 °C por 10 min para desnaturação das enzimas contidas no meio antes do ensaio ser realizado. Os sobrenadantes claros foram misturados com sabão líquidos foram diluídos em solução tampão Tris – HCl 0,05M pH 7,0 em concentrações de 0,01%, 0,1% e 1% (v/v) por 30 minutos a 37 °C.

A atividade enzimática foi então avaliada por meio do espectrofotômetro na absorbância de 410 nm.

#### 4.11.4 Potencial removedor de manchas

Um tecido de poliéster e algodão foi cortado em pedaços (3 cm × 2 cm) e cada pedaço foi manchado com duas gotas de óleo de carro, fritura de peixe e chocolate. Os pedaços de tecido foram então deixados secar e colocados em frascos de 50 ml com quatro tratamentos diferentes.

Os quatro tratamentos foram: (a) água (100 ml), (b) água com detergente a 1% (v/v) (99 ml + 1 ml), (c) água com microemulsão (99 ml + 1 ml), (d) água com microemulsão e detergente (98 ml + 1 ml + 1 ml). Cada tratamento foi realizado em duplicata, uma vez com água fria (25 °C). Todos os tratamentos foram incubados e agitados a 190 rpm por 30 minutos. Os pedaços de tecido foram então removidos, secos e examinados quanto à presença de resíduos de óleo. Para estimar a quantidade de ácidos graxos livres liberados durante cada tratamento, foi utilizado um ensaio titulométrico seguindo o procedimento de Dayanandan *et al.* (2013).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação do Fungo *Fusarium solani*

#### 5.1.1 Identificação morfológica de *F. solani*

O fungo *F. solani* foi isolado de uma amostra de solo que faz parte da coleção do fungo da Universidade Federal do Maranhão, a cepa apresentou características morfológicas típicas de *F. solani* em meio de cultura ágar batata (Figura 4).



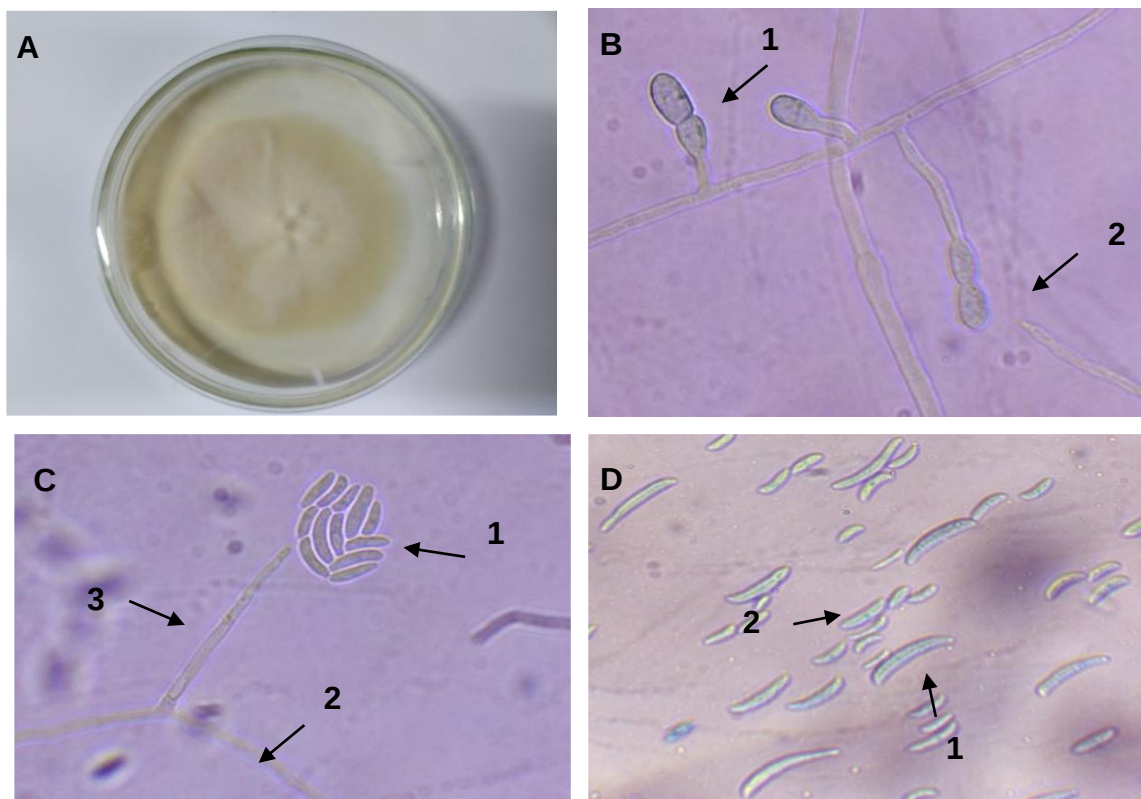
**Figura 4.** Características Morfológicas do verso (A) e anverso (B) da colônia de *Fusarium solani* obtidas de amostras de solo.

Como pode ser observado na figura 4 o *Fusarium* é branco e algodoado, algumas espécies permanecem brancas, com o passar dos dias o *F. solani* se tornar azul-esverdeada ou marrom-azulada, onde aglomerados de células conidiogênicas se desenvolvem. O reverso é geralmente claro, mas pode ser profundamente colorido (Larone *et al.*, 2018).

Enquanto as características microscópicas (Figura 5) em que podemos visualizar clamidósporos terminais (Figura 5 – A 1 e 2), hifas septadas (Figura 5 – B 2), fiálides longas e finas (Figura 5– B 3), Conidióforos (Figura C 1), macro e microconídios (Figura 5 – C 1 e 2) são colônias fusiformes e de rápido crescimento entre 4 a 7 dias.

Na identificação microscópica de *F. solani* existe a presença de hifas septadas podendo existir: conidióforos ramificados ou não ramificados com fiálides que produzem macroconídios grandes (2–6 3 14–80 mm), em forma de foice ou canoa (com três a cinco septos) e conidióforos simples longos ou curtos, contendo conídios

pequenos (2–4 3 4–8 mm), ovais, unicelulares ou bicelulares, individualmente ou em grupos (Larone *et al.*, 2018).



**Figura 5.** Morfologia de colônias e estruturas de reprodução assexuada de *Fusarium solani* obtidas de amostras de solo. A: Morfologia macroscópica da colônia; B, C e D: morfologia microscópica presente na microcultura de *F. solani* 100X.

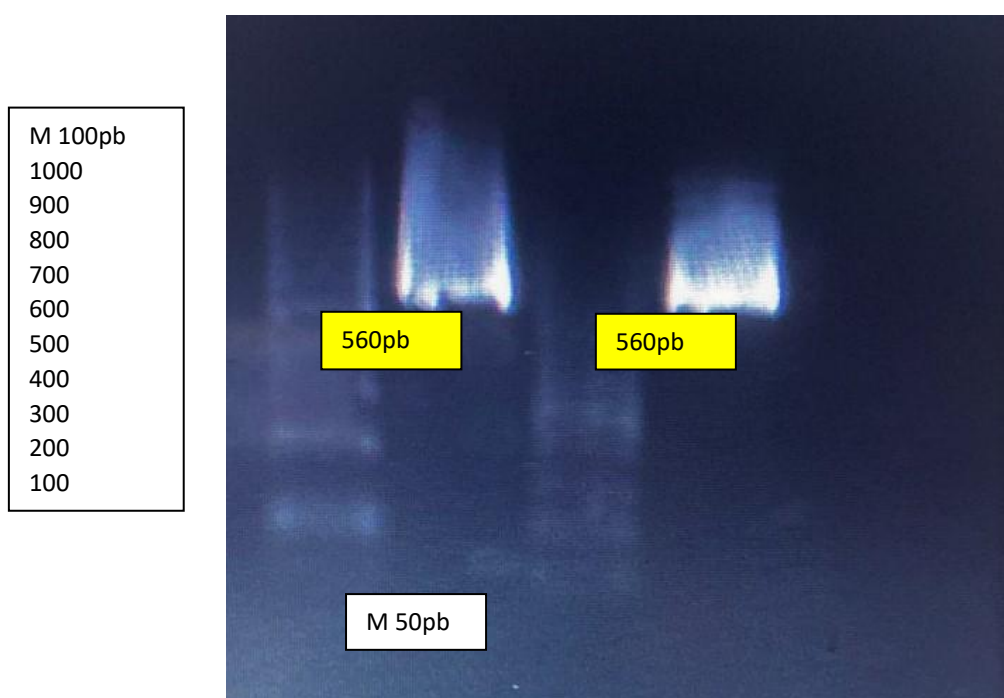
De forma semelhante, os autores Monuj Gogoi & Ali (2017) observaram entre as variações do fungo *F. solani* que o mesmo produziu dois tipos de esporos assexuados, isto é, micro e macro conídios. Os esporos em repouso, ou seja, os clamidósporos, também foram observadas em culturas com 10-15 dias de idade.

O tamanho dos micros e macro conídios variou de (3-4 x 1-2) a (9-10 x 1-3)  $\mu\text{m}$  e (26,42-32,46) X (3,24-4,74)  $\mu\text{m}$  a (17,39- 23,17) X (2,91-4,51)  $\mu\text{m}$ , respectivamente, o número de septos em micro e macro conídios são 0-1 e 2-4 respectivamente e a cor é hialino. A forma dos macroconídios é em forma de foice e alongada com extremidades rombas e os microconídios eram arredondados a ovais.

Os clamidósporos eram ovais, intercalares e terminais entre os isolados. A maioria caracteres distintos de longa monofialídica células conidiogênicas foram observadas em todos os isolados. Os conidióforos eram alongados e esparsamente ramificados.

### 5.1.2 Identificação molecular do *F. solani*

Após a PCR e eletroforese a identificação molecular foi confirmada com o padrão de 560 pb para o fungo *Fusarium solani*, assim como estudo de Kalman *et al.*, (2020), com base na sequenciação de ITS1 e ITS4 específicos para *F. solani* e na identificação morfológica confirma que este microrganismo estudado pertence ao gênero *Fusarium* da espécie *solani* (Figura 6).



**Figura 6.** Imagem da eletroforese de gel de agarose de *F. solani* comparado com o primer. Legenda: M=marcador molecular de 100pb (100 pares de bases) ou 50pb.

Os resultados da identificação molecular confirmaram a identificação morfológica dos isolados testados. Um estudo de Al-Fadhal (2019) compara a região ITS (ITS1 e ITS4) do isolado *F. solani* com aquelas previamente depositados no GenBank e revelou similaridade genética mais próxima (100%) da sequência ITS gerada foi com *F. solani* do Iraque (KY662484.1 e KY662480.1) e relações filogenéticas próximas também apareceram com alguns isolados de *F. solani* da Índia (MF800959, HQ384397.1, KM017142 e KY419545.1) reafirmando a espécie.

Em um outro estudo de Thomas *et al.* (2019) foram avaliados 5 esquemas de identificação: ITS (interno espaçador transcrito), EF1a (fator de alongamento de tradução 1 alfa), RPB1 (maior subunidade da RNA polimerase) e genes RPB2 (segunda maior subunidade da RNA polimerase) e dois bancos de dados: GenBank e

*Fusarium* MLST (MultiLocus Sequence Typing). Foram consideradas 20 ocorrências ou respostas de identificação e foi concluído que a abordagem universal para identificar um fungo com um método molecular baseia-se melhor no sequenciamento do gene ITS.

## 5.2. Isolamento da enzima lipase e Atividade lipolítica

Após os processos de obtenção da enzima lipase produzida pelo fungo *Fusarium solani* realizada por dois processos de fermentação um chamado de semissólida e submersa, foram obtidos extratos brutos que posteriormente foram purificados utilizando sulfato de amônio inicialmente e para os melhores resultados que no caso foram da fermentação submersa foi realizada uma ultrapurificação com um filtro de viva-spin®.

### 5.2.1 Atividade lipolítica da fermentação semissólida

A fim de verificar a eficácia dos métodos de extração por fermentação neste estudo foram utilizados parâmetros como a atividade lipolítica, além do rendimento e grau de purificação (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atividade lipolítica da fermentação semissólida das várias etapas de purificação incluindo o rendimento e índice de purificação.

| Etapas de purificação | Atividade total (U/mL) | Proteína Total (mg) | Atividade Específica (U/mg) | Rendimento (%) | Índice de Purificação |
|-----------------------|------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------|
| Extrato bruto         | 21226,00               | 226,5               | 93,71                       | 100,00         | 1                     |
| Lipase 0-80%          | 2653,25                | 64,25               | 41,30                       | 12,50          | 0,44                  |

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a tabela 1, na fermentação semissólida a lipase foi separada do meio aquoso com 80 % de purificação pelo sal sulfato de amônio. Em condições de elevada força iônica, decorre da adição de grandes quantidades de sal. A água passa a interagir com as duas espécies: as proteínas e os íons provenientes da dissociação do sal. Porém, a água apresenta maior tendência de solvatação de partículas menores (nesse caso, os íons). As moléculas de água, ocupadas em sua interação com os íons, deixam a estrutura proteica. Como consequência, tem-se maior interação proteína-proteína, diminuição da solubilidade em meio aquoso e, consequentemente, precipitação da proteína. A esse fenômeno de insolubilização da

proteína em decorrência de um considerável aumento da força iônica do meio denomina-se "salting-out" (Saxena *et al.*, 2003).

Este é um processo importante para separação de proteínas uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína. Neste estudo a melhor porcentagem de sulfato de amônio a fim de precipitar a enzima lipase foi 80% de sulfato de amônia. Porém quando comparada quanto ao grau de purificação no processo de fermentação semissólida não apresentou uma atividade total significativa e não aumentou seu grau de pureza, sendo assim considerado um método ineficiente de extração enzimática da lipase, quando comparado com o método de fermentação submersa (Tabela 2).

### 5.2.2 Fermentação lipolítica submersa

**Tabela 2.** Atividade lipolítica da fermentação submersa das várias etapas de purificação incluindo o rendimento e índice de purificação.

| Etapas de purificação     | Atividade total (U/mL) | Proteína total (mg) | Atividade específica (U/mg) | Rendimento (%) | Purificação |
|---------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------|-------------|
| <b>Extrato bruto</b>      | 33716,00               | 900,75              | 37,43                       | 100,00         | 1           |
| <b>Lipase (0 - 80%)</b>   | 2642,6                 | 41,8                | 63,22                       | 7,84           | 1,69        |
| <b>Vivaspin (100 kDa)</b> | 3791,4                 | 27,9                | 135,89                      | 11,25          | 3,63        |

Fonte: Autoria própria.

A fermentação submersa realizada com o fungo *Fusarium solani* mesmo que com menor rendimento quando comparada a fermentação semissólida expressa na tabela 1, apresentou uma atividade lipolítica específica maior com 135,89 U/mg. O grau de pureza diferentemente da fermentação semissólida aumentou à medida que a extração passa pelas etapas de purificação, chegando a 3,63. Após a purificação realizada mais tradicionalmente com o sulfato de amônio, foi utilizado um filtro de Vivaspin® (50-100 kDa).

As colunas de spin de membrana, como *Vivaspin*, combinam o princípio de exclusão de tamanho com centrifugação para obter concentração rápida e alta recuperação de biomoléculas alvo que neste estudo foi a enzima lipase isolada do fungo *Fusarium solani*. Um compartimento superior contendo amostra foi separado do compartimento inferior por uma membrana semipermeável entre 50-100KDa para

excluir proteínas maiores. A centrifugação foi aplicada para forçar o solvente através da membrana a deixar uma amostra mais concentrada na câmara superior.

Neste estudo por conta da baixa atividade lipolítica observada na fermentação semissólida, os testes seguintes foram realizados apenas com a enzima lipase extraída por fermentação submersa. De Oliveira *et al.* (2020) em contrapartida observou diferenças entre fermentação semissólida e submersa que poderiam dar uma visão mais profunda sobre as características cinéticas da lipase de *Fusarium sp.* Durante a produção da enzima, o método de fermentação semissólida apresentou menor rendimento, porém com menor o custo de produção, mas com comportamento cinético semelhante sendo nesse caso mais vantajoso.

A fermentação em estado sólido geralmente usa resíduos agroindustriais sólidos como farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana, entre outros. A principal vantagem de usar esses substratos é que os resíduos ricos em nutrientes podem ser facilmente reciclados como substratos, reduzindo substancialmente custos de produção de enzimas. Custo e disponibilidade são os principais fatores considerados na escolha de um resíduo como substrato ou suporte na produção de substrato, porém segundo a tabela 1 a fermentação semissólida não apresentou atividade lipolítica maior quando comparado com o extrato bruto. Dessa forma a fermentação semissólida não foi eficiente na produção da enzima lipase, proteína de interesse nesse estudo.

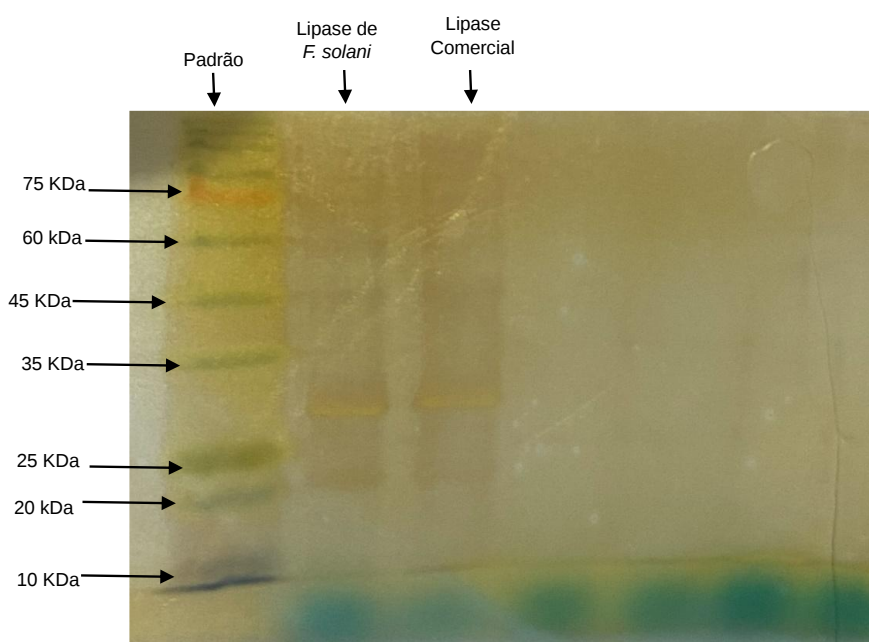
Porém, outras características como cristalinidade, área acessível, área de superfície, porosidade e tamanho de partícula são aspectos importantes a serem considerados para o processo de fermentação submersa. Nesta técnica de fermentação, os substratos são usados lenta e progressivamente, para que o mesmo substrato possa ser usado por longos períodos de fermentação, assim esta técnica faz liberação de nutrientes e substratos como enzimas incluindo a lipase (Soccol *et al.*, 2017).

A fermentação submersa é um processo no qual os microrganismos crescem em meio líquido, com alto teor de água livre. Os processos biológicos realizados apresentam vantagens notáveis em relação à instrumentação e controle (pH, O<sub>2</sub>, temperatura, concentração de água).

### **5.3 Análise de pureza da enzima lipase de *Fusarium solani***

A fim de provar a pureza da enzima lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani*, a mesma foi submetida à análise de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Figura 7) a fim de verificar o grau de pureza da lipase, o que confirmou a ausência de contaminantes, já que apenas uma banda foi observada gel entre 15kDa e 35 KDa que é conhecida pela literatura (Rosenau *et al.*, 2004).

A metodologia de Laemmli (1970) indica que o processo de purificação por precipitado de sulfato de amônio foi bem sucedido corroborando para os achados de Scheller *et al.* (2021) que destaca que esse método de purificação é uma alternativa confiável à cromatografia quando se fala de custo e eficiência, além de ser amplamente eficaz para monitorar o peso molecular e o grau de pureza, assim no gel foi possível observar que a enzima não apresentou contaminantes, tanto quanto a enzima comercial, confirmando dessa forma que o processo de purificação por precipitação de sulfato de amônia.



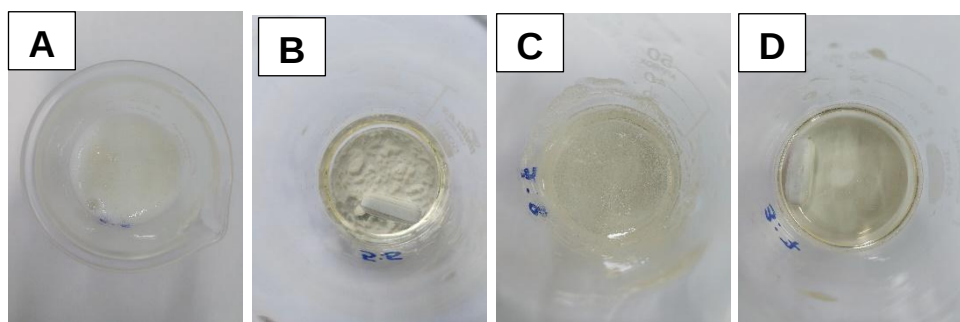
**Figura 7.** Gel de Eletroforese SDS-PAGE. A) Linha 1: marcadores moleculares padrões; linha 2: lipase purificada de *Fusarium solani*; linha 3: lipase comercial purificada. Revelação por nitrato de prata.

## 5.4 Preparação da Microemulsão incorporada com enzima lipase de *Fusarium solani*

### 5.4.1 Construção do diagrama de fases pseudoternário da microemulsão

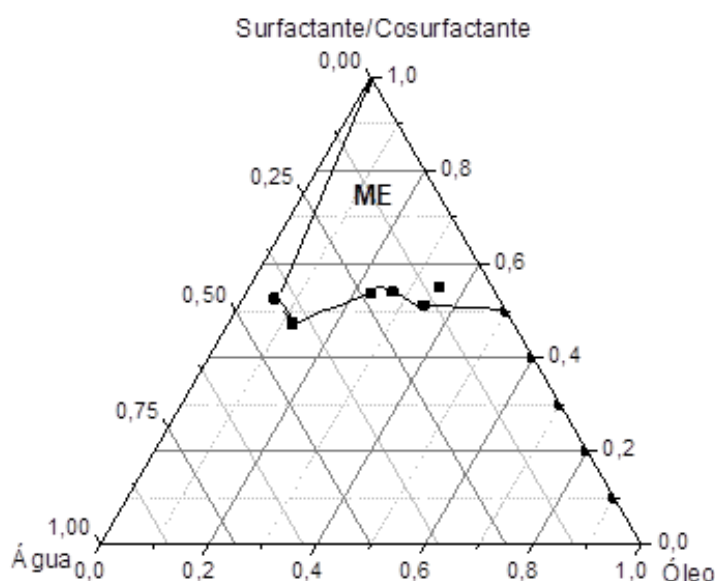
Para criar microemulsões foi misturado miristato de isopropila com Tween 80 e álcool isopropílico numa proporção de 3:1 em diferentes misturas, variando de 1:9 a 9:1. Cada mistura foi titulada com água e agitada magneticamente até observar mudanças ópticas, indicando o ponto final da titulação.

Na figura 8, pode-se observar as mudanças ópticas encontradas durante a titulação, sendo essas a formação de A) emulsão, caracterizada pela coloração leitosa; B) formação de fases, observadas pelo aspecto heterogêneo do meio; C) Formação de gel, aparência gelatinosa que surgiu gradativamente com o aumento da viscosidade da mistura; e D) microemulsão (formulação de interesse), sugerida pela transparência óptica.



**Figura 8.** Observação macroscópica dos estados físicos encontrados durante a técnica de titulação, realizada para o desenvolvimento do diagrama pseudoternário. A-Emulsão. B-formação de fases. C-formação de gel. D-Microemulsão.

Com base na composição encontrada no ponto final das amostras tituladas foi calculada a porcentagem volumétrica dos componentes - óleo, surfactante e água. Estes valores foram representados em um diagrama de fase ternário (Figura 9), utilizando o software *Origin 8.0*, o que permite identificar a área propícia para a formação de microemulsões, identificada como "ME" significa a zona de microemulsão.



**Figura 9.** Diagrama de fase pseudoternário de óleo (miristato de isopropila), teansoativo (Tween 80/álcool iso-propílico, na proporção de 3:1) e fase aquosas.

Dentro da região de microemulsão no diagrama pseudoternário, uma composição específica foi selecionada para posterior desenvolvimento e otimização das condições para a incorporar a enzima extraída do um fungo *Fusarium solani* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Composição de microemulsão carregada de lipase extraída de *Fusarium solani*.

| Formulação              | Fase Oleosa | Surfactante<br>Cosurfactante | <sup>e</sup> Água |
|-------------------------|-------------|------------------------------|-------------------|
| Microemulsão com enzima | 35%         | 55%                          | 10%               |

Fonte: Autoria própria (2023).

A microemulsão à base da enzima exógena lipolítica (lipase) extraída do fungo *Fusarium solani* foi caracterizada pela seguinte formulação: A fase oleosa (miristato de isopropila) incorpora a enzima de fungo *F. solani* na concentração de 1500 µg/mL. Esta mistura é combinada com o surfactante (Tween 80) e cosurfactante (álcool isopropílico) sob agitação constante. A adição gradual de água, gota a gota, com agitação de 50 rpm à temperatura ambiente até que a microemulsão transparente seja obtida.

#### 5.4.2 Caracterização da formulação de microemulsão da lipase de *Fusarium solani*

Neste estudo, foram investigados os parâmetros físicos essenciais para a caracterização de duas microemulsões, uma incorporada por lipase de *Fusarium solani* (ME) e sem a incorporação (MB) como pode ser observado na Tabela 4. As propriedades analisadas incluíram o tamanho médio de gotículas, o índice de polidispersividade e o potencial zeta, fornecendo insights valiosos sobre a qualidade e estabilidade dessas formulações.

**Tabela 4.** Valores de tamanho de partículas, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta das microemulsões incorporada por lipase de *Fusarium solani* (ME) e sem a incorporação (MB).

| Microemulsão    | Tamanho Gotículas (nm) | de Índice Polidispersividade | de Potencial Zeta |
|-----------------|------------------------|------------------------------|-------------------|
| <b>M ENZIMA</b> | 52,22 ± 1,50           | 0,381± 0,054                 | -10,56 ±2,01      |
| <b>MB</b>       | 38,486 ± 0,729         | 0,2963 ±0,0318               | -9,89 ± 0,73      |

Fonte: Autoria própria (2024).

Segundo Xavier-Junior *et al.* (2017), as microemulsões possuem tamanho de gotículas entre 10 a 100 nm, logo, o valor apresentado pelo Branco da Microemulsão (MB) e o da Microemulsão com Enzima (M Enzima) estão de acordo com os parâmetros indicados, sendo esses valores 38,486±0,729 nm e 52,22±1,50 nm, respectivamente.

A distribuição do tamanho das gotículas é mais homogênea em MB, isso pode ser analisado a partir dos valores do Índice de Polidispersividade, onde foram maiores para a M Enzima (0,381±0,054) do que em MB (0,2963±0,0318).

De acordo com Pompeu (2018), para que as dispersões de nanopartículas sejam consideradas estáveis, os potenciais zeta das partículas devem ser mais positivos que +30 mV ou mais negativos que -30 mV. Porém a natureza do surfactante utilizado também deve ser levada em consideração, uma vez que segundo Aulton (2016), a utilização de um agente tensoativo não iônico estabilizará a partícula contra a coagulação, através da adsorção desse polímero em sua superfície, mesmo na ausência de um potencial zeta significativo. Isso explicaria os valores de potencial zeta de MB (-9,89±0,73 mV) e M Enzima (-10,56±2,01 mV) encontrados, uma vez que foi utilizado o Tween 80, um surfactante de caráter polimérico não iônico.

## 5.6 Controle de qualidade das microemulsões desenvolvidas

As microemulsões, no decorrer dos 30 dias, não apresentaram nenhuma mudança nas suas características macroscópica, descritas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Avaliação macroscópica da microemulsões obtidas incorporada por *Fusarium solani* (ME) e sem a incorporação (MB).

| Microemulsão | Cor           | Formação de fases | Turbidez | Precipitação |
|--------------|---------------|-------------------|----------|--------------|
| MB           | Amarelo claro | ausência          | ausência | ausência     |
| ME           | Laranja claro | ausência          | ausência | ausência     |

Fonte: Autoria própria (2024).

Os resultados mostram que ambas as microemulsões, com e sem a incorporação de enzima, mantiveram suas características macroscópicas estáveis durante os 30 dias de avaliação. Isso sugere que as formulações são fisicamente estáveis e que a incorporação da enzima não afetou negativamente a estabilidade macroscópica da microemulsão. A estabilidade de cor, ausência de formação de fases, turbidez e precipitação são indicadores positivos da robustez e da qualidade das microemulsões desenvolvidas.

A análise realizada para os parâmetros pH, condutividade (expressa em  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), e índice de refração (expresso em  $\text{mg}/\text{L}$ ) monitorando no período de 15 dias está contida na tabela 6. Os dados mostram que a microemulsão base e a microemulsão incorporada não possuem acentuadas diferenças em seus valores, o que indica a durabilidade da estabilidade das formulações durante todo o período de 15 dias.

**Tabela 6.** Monitoramento quanto ao pH, condutividade e índice de refração da microemulsões obtidas incorporada pela lipase de *Fusarium solani* (ME) e sem a incorporação (MB) por 15 dias.

| Tempo Avaliado (dias) | Microemulsão | pH (25°C)       | Condutividade $\mu\text{S}/\text{cm}$ (25°C) | Índice de Refração $\text{mg}/\text{L}$ |
|-----------------------|--------------|-----------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0                     | MB           | 8,22 $\pm$ 0,07 | 7,78 $\pm$ 0,08                              | 1430,7 $\pm$ 0,3                        |
| 0                     | ME           | 8,28 $\pm$ 0,11 | 6,43 $\pm$ 0,12                              | 1441,1 $\pm$ 1,0                        |
| 2                     | MB           | 8,18 $\pm$ 0,08 | 7,22 $\pm$ 0,04                              | 1436,5 $\pm$ 0,5                        |
| 2                     | ME           | 8,20 $\pm$ 0,03 | 6,54 $\pm$ 0,04                              | 1446,1 $\pm$ 0,2                        |
| 5                     | MB           | 8,25 $\pm$ 0,04 | 7,11 $\pm$ 0,04                              | 1437,6 $\pm$ 0,7                        |
| 5                     | ME           | 8,37 $\pm$ 0,16 | 6,60 $\pm$ 0,04                              | 1444,7 $\pm$ 0,1                        |
| 10                    | MB           | 8,27 $\pm$ 0,01 | 7,17 $\pm$ 0,04                              | 1437,1 $\pm$ 0,5                        |

|    |    |           |           |            |
|----|----|-----------|-----------|------------|
| 10 | ME | 8,26±0,05 | 6,57±0,02 | 1444,6±0,6 |
| 15 | MB | 8,30±0,03 | 7,19±0,01 | 1437,9±0,7 |
| 15 | ME | 8,27±0,02 | 6,59±0,02 | 1446,3±0,5 |

Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

Fonte: Autoria própria (2024).

## 5.9 Caracterização físico-química da lipase de *Fusarium solani* e da microemulsão de lipase de *F. solani*

A produção de lipases por fungos varia de acordo com o organismo fúngico e composição do meio de crescimento e condições físicas, como fonte de nitrogênio, fonte de carbono, pH e temperatura. Entre as fontes fúngicas, fungos filamentosos assim como os do gênero *Fusarium* são reconhecidos como proeminentes produtores de lipase, e métodos incluindo extração, purificação e processamento são comparativamente simples e fáceis quando comparados a outras fontes (Rocha *et al.*, 2020).

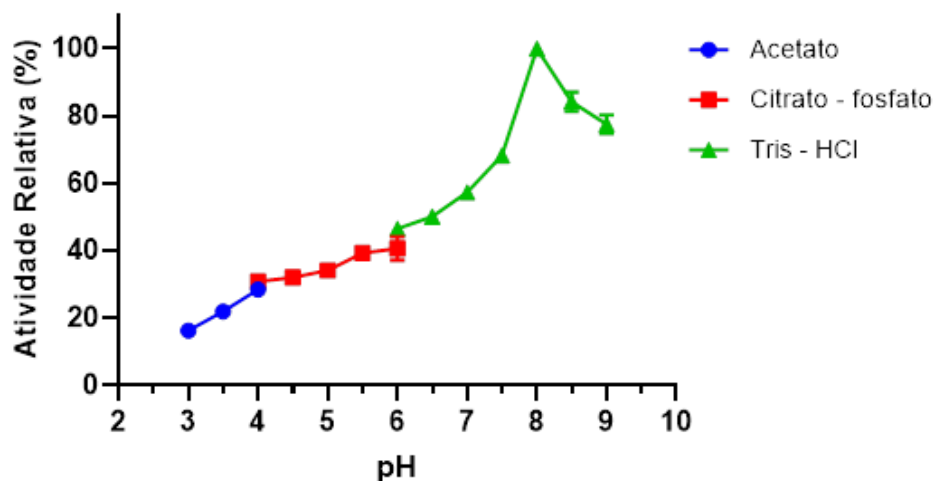
### 5.9.1 pH ótimo e estabilidade

O pH e a temperatura têm grande influência na atividade enzimática, sendo importante para definir esses parâmetros para a caracterização da enzima obtida. Segundo a figura 10 e figura 11 o pH ótimo encontra-se entre a faixa de pH de 7,0-9,0, mantendo dessa forma a máxima atividade relativa em pH 8. A microemulsão com lipase de *F. solani* (figuras 12 e 13) e a lipase comercial (figuras 14 e 15) apresentaram pH ótimo e estabilidade mais neutra, próximo de 7. Semelhantemente, no estudo de Prazeres *et al.* (2006) A lipase de *F. oxysporum*, *f. sp. lini* foi estável na faixa de pH 6,0-7,0 e teve atividade ótima em pH 7,0, enquanto está enzima mostrou-se mais estável em pH alcalino.

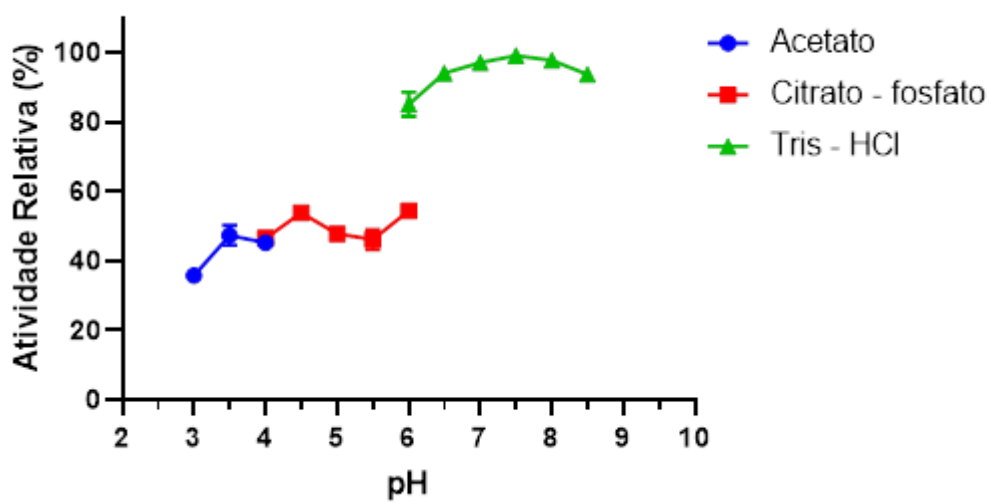
Outro estudo de Kumar *et al.* (2020) mostra a caracterização bioquímica da lipase purificada de uma bactéria psicotrófica que apresentou atividade no pH variando de 7 a 9 com uma atividade ótima em pH 8. Isso especificou que a lipase purificada é alcalina, semelhante a este estudo.

As lipases ativas em pH alcalino são de imensa importância na alimentos, laticínios e indústria de detergentes. A maioria das lipases pode atuar em uma ampla faixa de pH, embora lipases bacterianas são mais comumente alcalinas. Alcalófilos

também tem um grande impacto para uma diversidade de aplicações industriais (Soeka & Sulistiani, 2020).



**Figura 10.** pH ótimo da enzima lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani*



**Figura 11.** Estabilidade do pH da enzima lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani*

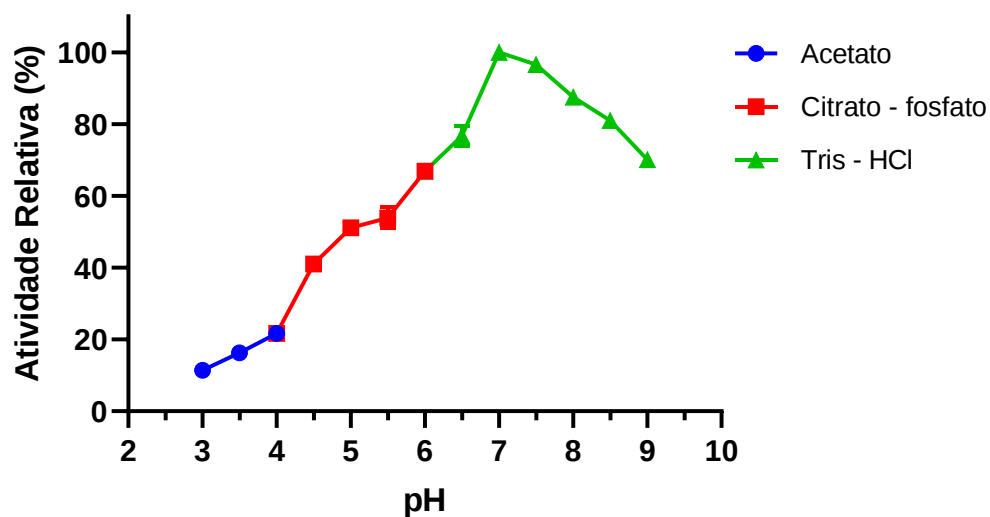


Figura 12. pH ótimo da microemulsão de lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani*

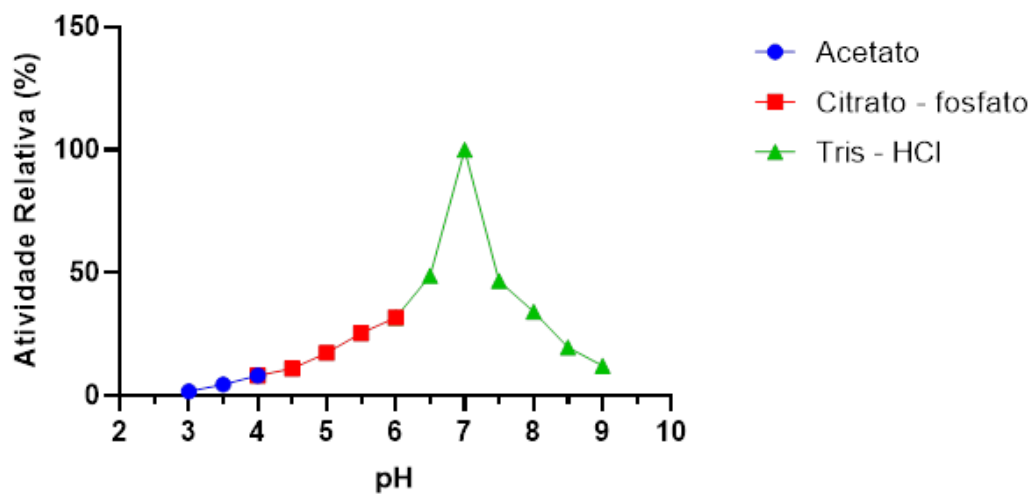


Figura 13. Estabilidade do pH da microemulsão de lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani*

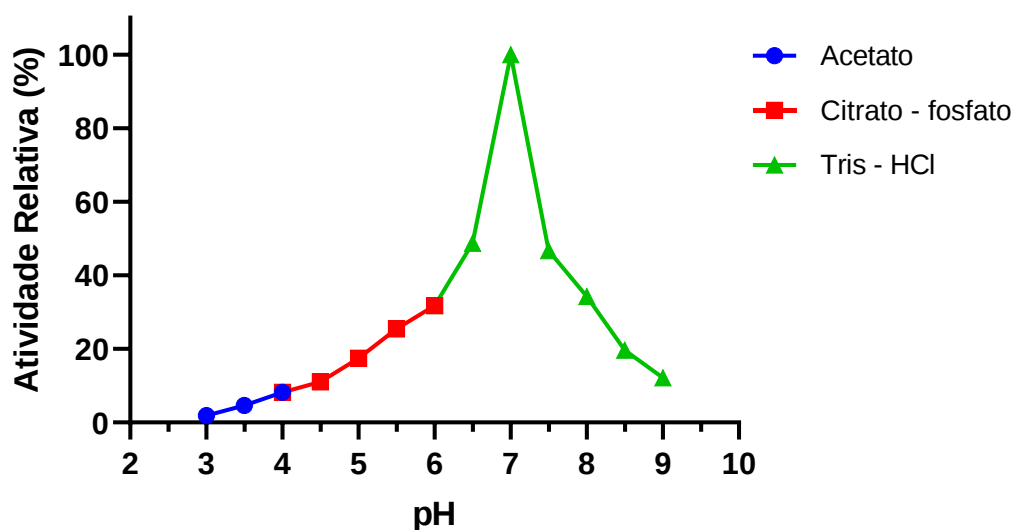


Figura 14. pH ótimo da microemulsão de lipase comercial

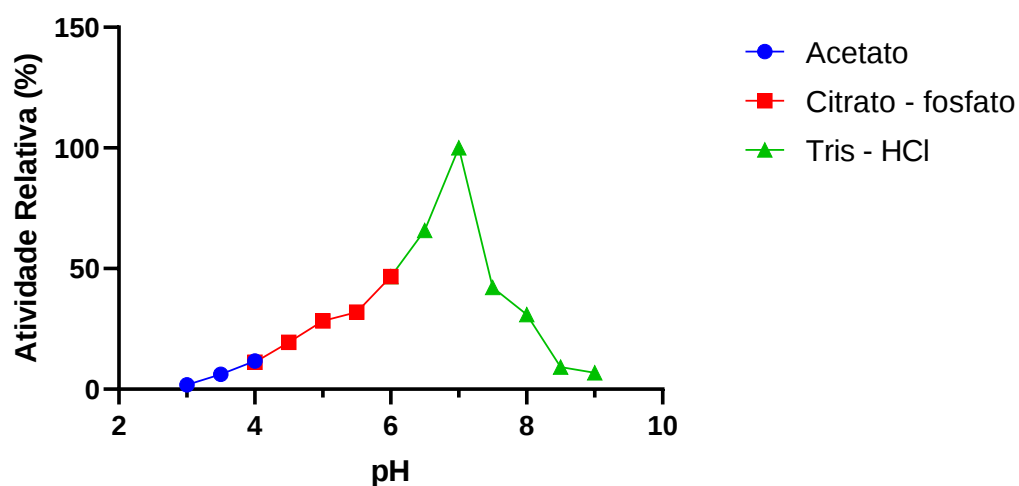


Figura 15. Estabilidade do pH da microemulsão de lipase comercial

### 5.9.2 Temperatura ótima e estabilidade

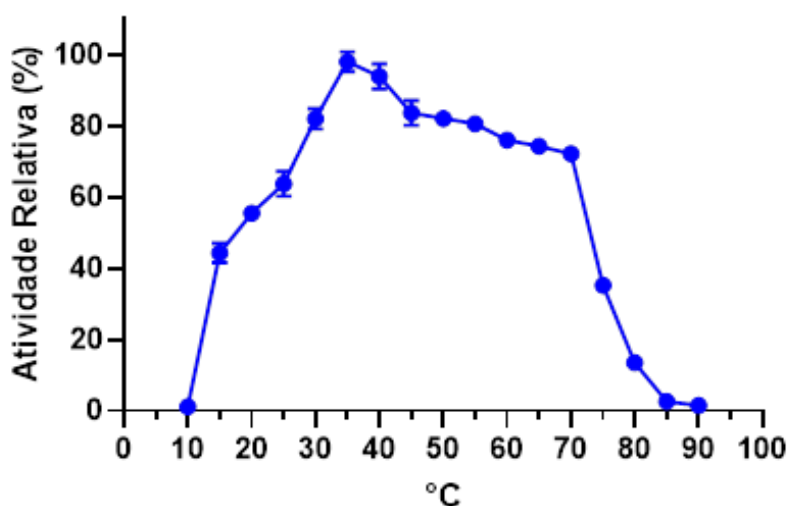
A temperatura também tem um efeito significativo na produção de lipase microbiana e pode alterar as propriedades físicas das membranas celulares, resultando na influência da secreção das enzimas extracelulares. Uma temperatura

ótima é crucial e tem um papel vital na secreção de enzimas no método do frasco agitado. Uma maior produção de biomassa da produção de lipase foi alcançada a uma temperatura de 37°C (Bharathi e Rajalakshmi, 2019).

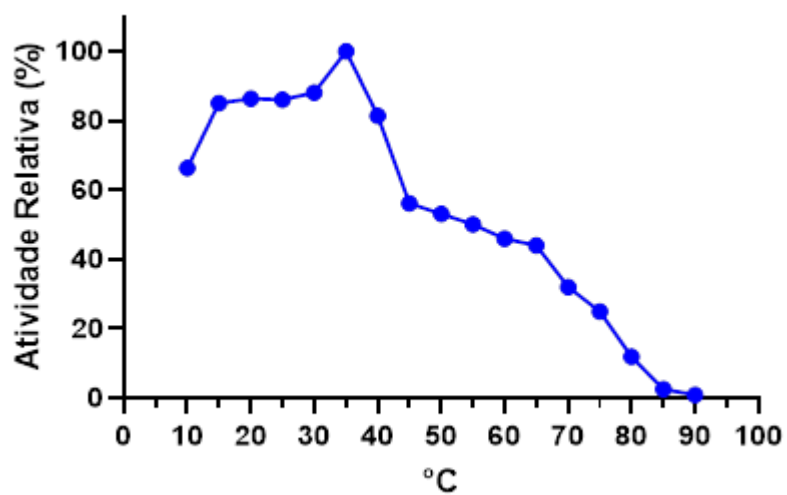
Neste estudo a lipase extraída do fungo *Fusarium solani* ótima foi de 35°C e a produção de lipase ainda se manteve estável até 73°C. A atividade lipolítica da lipase extraída de *Fusarium solani* mantém-se estável na faixa entre 15°- 45 °C, mas ainda mantendo atividade até a temperatura de 73°C (Figuras 16 e 17), corroborando com os outros autores que observaram a influência do aumento da temperatura na produção de enzimas, sendo assim um catalisador positivo nas reações para produção de lipase.

Os pesquisadores registraram que um pequeno aumento na temperatura de 38°C estimula a produção de lipase (de Souza *et al.*, 2019). Foi observado que uma temperatura mais baixa diminui a saída da enzima lipase, enquanto uma temperatura mais alta também afeta sua atividade (Kumar *et al.*, 2023).

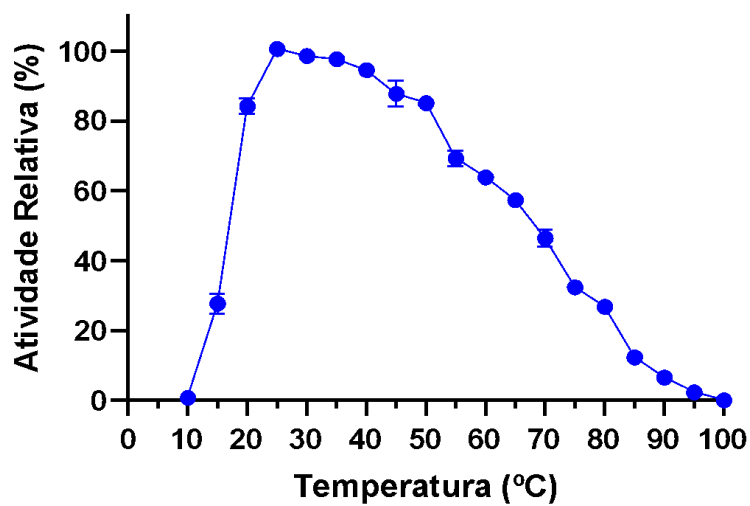
De acordo com as figuras 18 e 19, a temperatura e estabilidade da mesma na microemulsão à base da enzima lipase de *F. solani* é menor, com valor de 27°C, afetando assim a resistência da enzima a temperaturas maiores quando comparada a enzima livre e a enzima lipase comercial (Figuras 20 e 21).



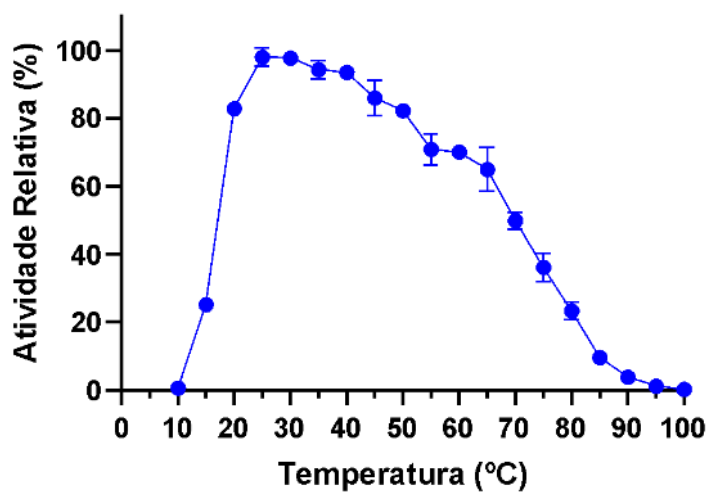
**Figura 16.** Temperatura ótima da enzima lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani*



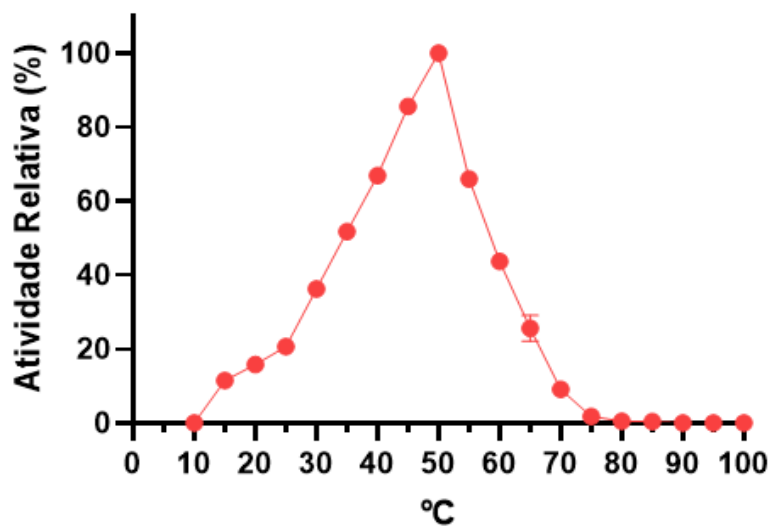
**Figura 17.** Estabilidade da temperatura da enzima lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani*



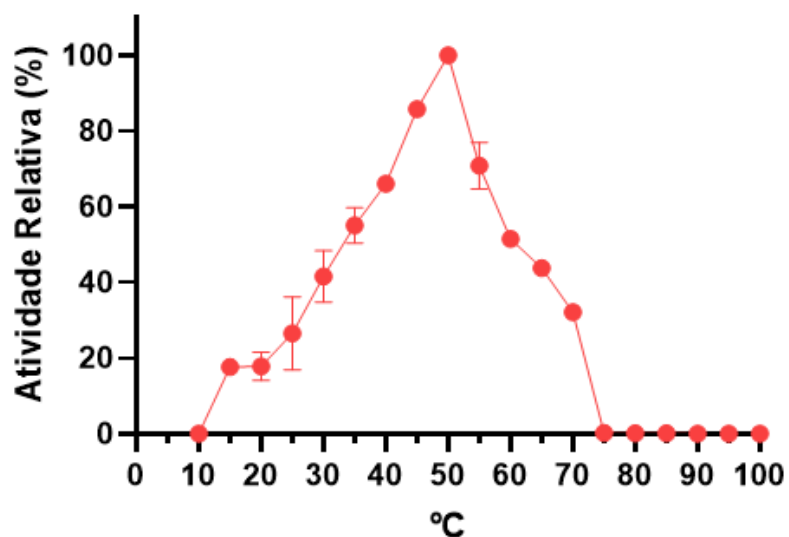
**Figura 18.** Temperatura ótima microemulsão da enzima lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani*



**Figura 19.** Estabilidade da temperatura microemulsão da enzima lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani*



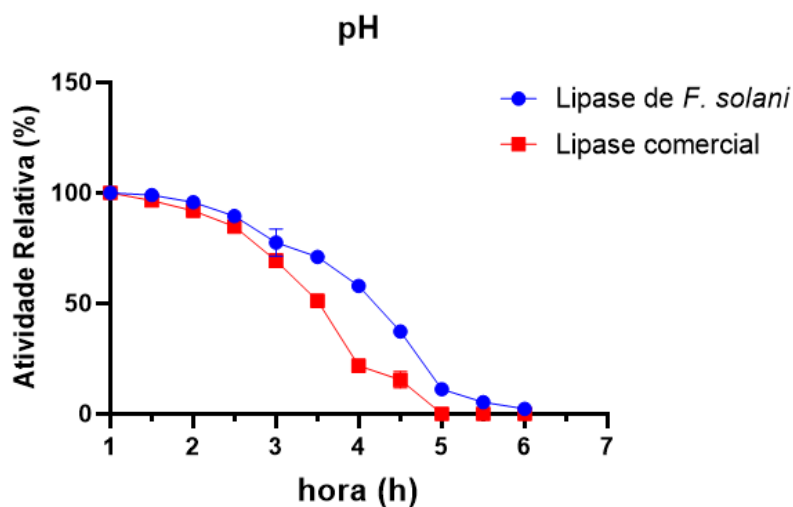
**Figura 20.** Temperatura ótima microemulsão da lipase comercial



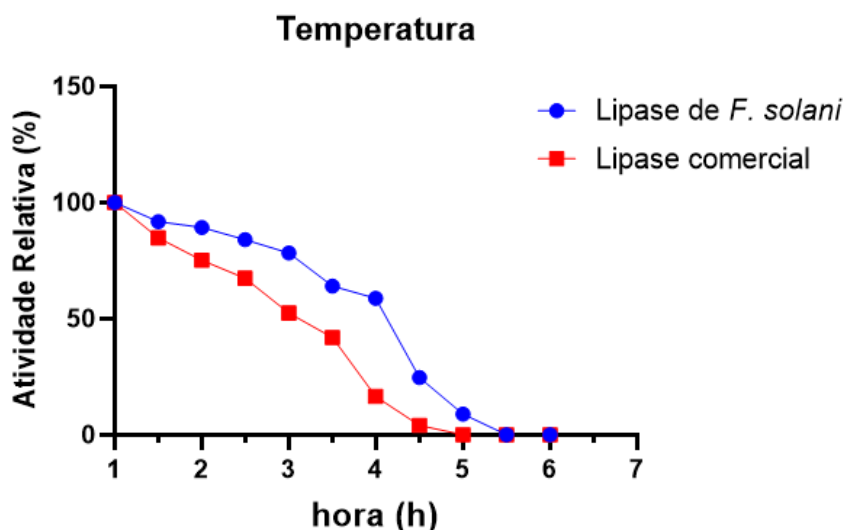
**Figura 21.** Estabilidade da temperatura da lipase comercial

### 5.9.3 Efeito do tempo de incubação

A atividade da enzima lipase pura de *F. solani*, lipase comercial foram medidas incubando a mistura reacional dos seu pH e temperatura ótimas nos tempos de 0 a 6 horas mostrou que a enzima lipase livre de *F. solani* apresentou-se mais estável no quesito pH e temperatura do que a lipase comercial, permanecendo com uma atividade enzimática lipolítica maior do que a enzima lipase comercial como ilustra as figuras 22 e 23.



**Figura 22.** Lipase livre de *F. solani* e lipase comercial no pH ótimo de 0 a 6 horas.



**Figura 23.** Lipase livre de *F. solani* e lipase comercial na temperatura ótima de 0 a 6 horas.

#### 5.9.4 Influência de surfactantes e solventes

Os detergentes foram testados quanto a atividade frente aos surfactantes em três concentrações diferentes 0,01%, 0,10% e 0,50%.

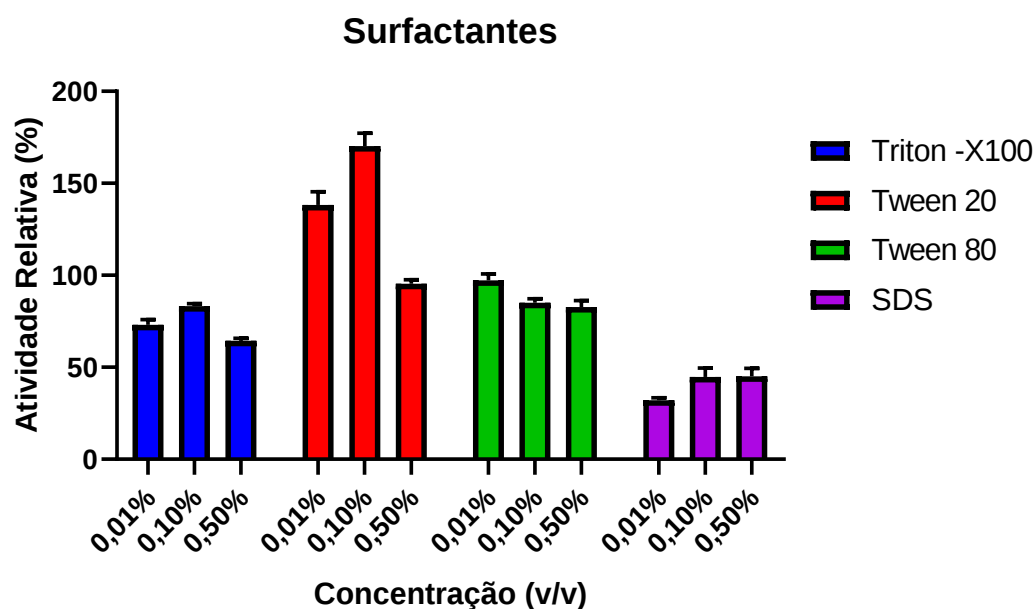
Os detergentes Tween -80, Triton X-100 e SDS diminuíram a atividade da lipase nas diferentes concentrações dos mesmos. Em contrapartida, foi observada um aumento na atividade lipolítica da enzima de *Fusarium solani* na presença de Tween-20, e SDS apresentou a menor atividade (Figura 24).

Substâncias que reduzem a atividade de uma enzima catalisadora de reação são conhecidas como inibidores. Eles agem diretamente ou influenciando indiretamente as propriedades catalíticas do sítio ativo. Os inibidores podem ser estranhos à célula ou componentes naturais disso. Neste caso, eles podem representar um elemento importante da regulação do metabolismo celular.

De acordo com o estudo de Okay *et al.* (2022), os detergentes Tween-20, Tween-80, Triton X-100 e SDS diminuíram a atividade da lipase na concentração de 0,2%. A menor atividade inibitória (17%) foi observada na presença de SDS, e Tween-80 apresentou a maior inibição (85%), semelhantemente ao presente estudo.

Segundo Sharma *et al.* (2017) surfactantes como SDS e Tween 80 diminuíram drasticamente para 10,71% e 30,73%, respectivamente a atividade lipolítica. Foi confirmado que os maiores rendimentos de lipase obtidos com esses aditivos não foram devidos ao aumento da transcrição da lipase, mas a secreção aumentada.

Kiran e Chandra (2008) relataram retenção de 90% da atividade na presença de Tween 20, Tween 80 e Triton X-100.



**Figura 24.** Efeito dos surfactantes com efeito de detergentes sobre a lipase extracelular purificada do fungo *Fusarium solani*. Legenda: A atividade relativa da enzima foi calculada em comparação com a atividade da enzima ensaiada nas condições padrão (ao controle).

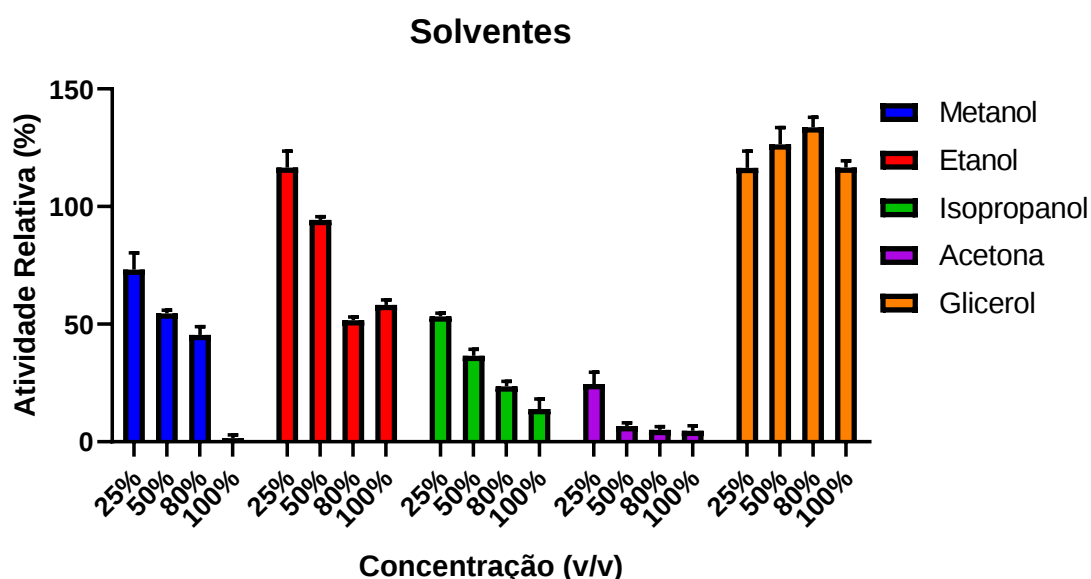
Da mesma forma, os solventes metanol, etanol, isopropanol e glicerol foram testados em 4 diferentes concentrações frente a enzima lipase purificada de *Fusarium*

*solani* e observou-se que entre todos os solventes, a acetona é o que mais inibe a atividade lipolítica chegando até 7,50% de atividade residual, seguido do isopropanol e metanol e o glicerol é o solvente que mais estimula a produção da lipase chegando a 131,47% (Figura 25).

As lipases diferem em sua sensibilidade para diferentes solventes orgânicos e são geralmente mais instáveis em substâncias polares. Embora a atividade enzimática mude na presença de água e solventes, alguns fatores justificam tal efeito, como por exemplo: solventes orgânicos podem agir como substratos e atuam como inibidores específicos. As mudanças nos solventes orgânicos também variam de acordo com as propriedades gerais dos solventes, como constante dielétrica, polaridade e hidrofobicidade. O aprimoramento da atividade da lipase por meio desses solventes tem muitas aplicações, como na fabricação de combustíveis à base de óleo, plástico e fabricação de produtos químicos, biodegradação, indústrias de papel e celulose, indústrias de laticínios e alimentos (Kamal *et al.*, 2013).

Segundo Tiwari *et al.* (2013) a lipase extraída de *Pichia anamola*, apresentou uma atividade relativa da lipase de 79,6% frente a acetona. O solvente isopropanol quando testado mostrou atividade relativa de 74,8%, o etanol de 71,8% e o glicerol de 54,7% divergindo dos resultados encontrados neste estudo.

O efeito dos solventes na atividade da lipase é mostrado também no estudo de Dab *et al.* (2023), no qual todos os solventes atuaram como inibidores, especialmente etanol, isopropanol e acetona. A lipase purificada de *Fusarium annulatum* (FAL) mostrou-se menos estável quando incubado com solventes polares. Na presença de isopropanol, metanol, n-butanol ou etanol, o FAL reteve 80%, 56%, 55% e 42% de sua atividade, respectivamente. Curiosamente semelhantemente a este estudo nenhum dos solventes inativou o lipase completamente, possivelmente devido à baixa penetração do solvente na estrutura da enzima em comparação com solventes hidratados.



**Figura 25.** Efeitos dos solventes sob a lipase extracelular purificada do fungo *Fusarium solani*.  
Legenda: a atividade relativa da enzima foi calculada em comparação com a atividade da enzima ensaiada nas condições padrão (ao controle).

### 5.9.5 Influência de íons

Considerando o controle de 100% de atividade relativa, este estudo detectou que os íons mais inibiram a atividade lipolítica foram o  $\text{Cu}^{+2}$  e o  $\text{Fe}^{+2}$ , com atividade residual de 25,98% e 26,81% respectivamente (Tabela 7). Acredita-se que a natureza inibitória dos metais de transição se deve à interação de íons com grupos carregados de cadeia lateral de amino de superfície ácida, influenciando assim a conformação e estabilidade da enzima.

No entanto,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  teve efeito inibitório moderado sobre a atividade da lipase com atividade residual de 65,17% e 83,87%. O efeito estimulador de  $\text{Mg}^{+2}$  apresentado na atividade da lipase com 110,03% nesse estudo também é relatado por vários pesquisadores e tem sido atribuído a alterações estruturais ao invés de papel catalítico (Dandavate *et al.*, 2009).

**Tabela 7.** A lipase foi incubada com íons nas concentrações de (1M e 10mM) em tris – HCl 50mMol pH 7,0 e incubadas por 1 hora a 37 °C antes de determinar a atividade residual.

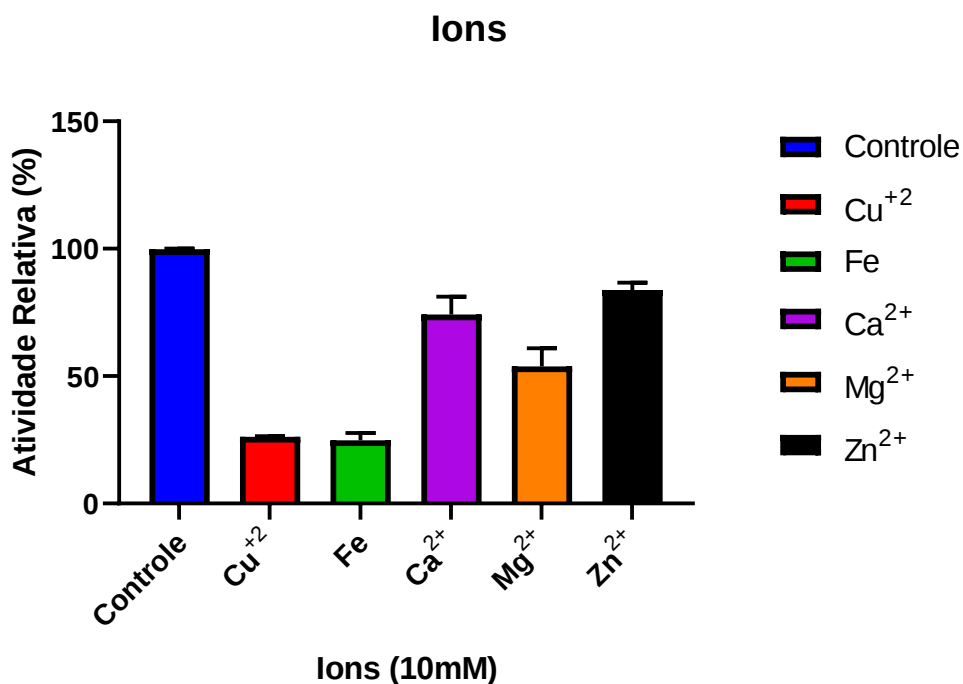
| Íons     | U/mL   |       | Atividade Relativa (%) |              |
|----------|--------|-------|------------------------|--------------|
|          | 1mM    | 10mM  | 1mM                    | 10mM         |
| Controle | 249,21 | 100   | 100                    | 100          |
| Cu       | 64,75  | 31,15 | 25,98                  | 12.50 ± 0,04 |

|           |        |        |       |               |
|-----------|--------|--------|-------|---------------|
| <b>Fe</b> | 66,81  | 29,03  | 26,81 | 11.65 ± 0,08  |
| <b>Ca</b> | 197,28 | 162,41 | 79,16 | 65.17 ± 0,03  |
| <b>Mg</b> | 141,61 | 274,20 | 56,82 | 110.03 ± 0,61 |
| <b>Zn</b> | 204,01 | 209,01 | 81,86 | 83.87 ± 0,15  |

Testes em triplicata. Os resultados são apresentados como atividade residual ± desvio padrão.  
Fonte: própria.

Em contrapartida, o estudo de Zhao *et al.* (2021) mostrou que a atividade da lipase foi significativamente melhorada na presença  $\text{Ca}^{2+}$  10 mM com atividade 1,66 vezes maior que o controle. Foi relatado que o  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel importante na estabilidade conformacional da enzima. Entre os íons metálicos também testados  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  inibiram significativamente a atividade relativa.

Vários íons metálicos são relatados como envolvidos na hidrólise de óleo catalisada por lipase, induzindo os ácidos graxos a formar seus respectivos sais metálicos na interface óleo-água e permitindo que a lipase atue livremente nas moléculas de óleo. Os efeitos dos cátions metálicos monovalentes, divalentes e trivalentes na atividade da lipase foram analisados em 10 mM (Figura 26).

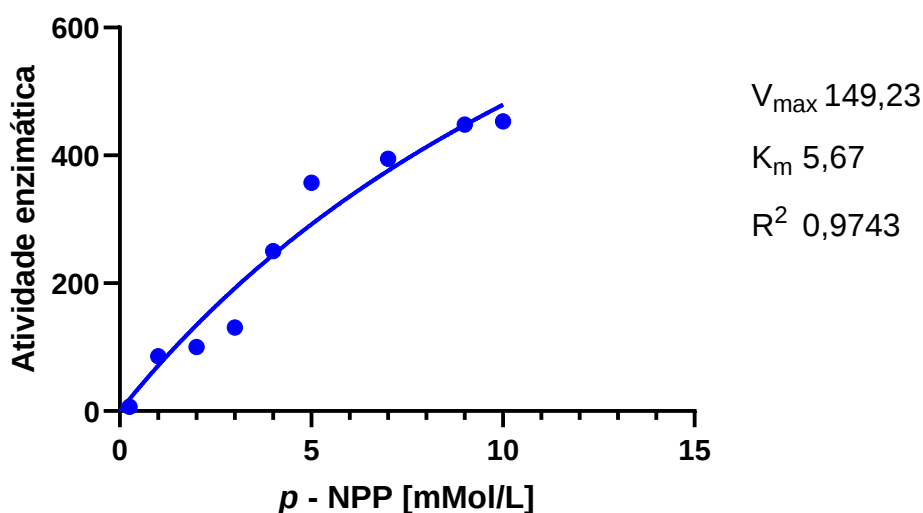


**Figura 26.** Influência dos íons sob a lipase extracelular purificada do fungo *Fusarium solani*. A atividade relativa da enzima foi calculada em comparação com a atividade da enzima ensaiada nas condições padrão (ao controle).

### 5.9.6 Determinação dos parâmetros cinéticos

O p-nitrofenol (pNP) é um composto amplamente utilizado para a determinação analítica de esterases, incluindo as lipases. A maioria das medições enzimáticas utiliza seus derivados, como ésteres, que se decompõem por hidrólise, liberando pNP quantificado por sua absorbância de 410 nm.

Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  da lipase de *Fusarium solani* foram determinados através das equações de Michaelis-Menten. O valor da constante de Michaelis - Menten ( $K_m$ ), é o indicador da afinidade da enzima pelo substrato, quanto menor o valor  $K_m$  maior afinidade entre lipase pelo seu substrato. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram determinado valor de  $K_m$  lipase foi de 5.671 mM e de  $V_{max}$  de 149.253  $\mu\text{M}/\text{min}$  em diferentes concentrações de p-NPP a 37 °C em 50 mM tris -HCl pH 8.0, o que gerou uma equação da reta com (Figura 27).



**Figura 27.** Efeito da concentração de p – NPP sobre a atividade de lipase.

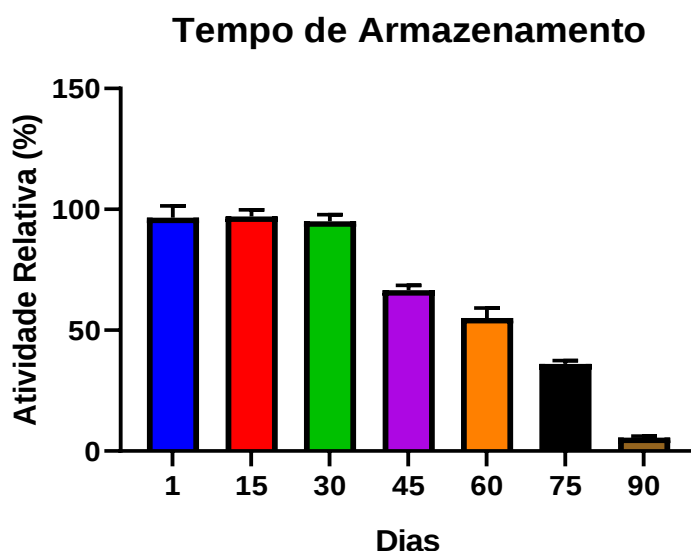
Outros autores calcularam  $V_{max}$  e  $K_m$  a partir dos gráficos recíprocos duplos para duas fontes de lipase. A lipase de *A. nidulans* teve um  $V_{max}$  maior (769,23  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) e a lipase de *A. Niger* LC 269109 (714,29  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) e um  $K_m$  maior (17,54 mg/ml) do que a lipase de *A. niger* LC 269109 (9,71 mg/ml). Em comparação com a

lipase de *A. Nidulans*, a lipase de *Fusarium solani* expressou um valor de  $K_m$  igual a 5,67, um valor mais baixo neste presente estudo. Isso indica que a lipase requer uma menor quantidade de azeite para sua saturação indicando que a lipase isolada neste estudo para *Fusarium solani* tem mais afinidade (ou é mais específica) para o azeite de oliva. A magnitude do  $K_m$  varia amplamente com a identidade da enzima e a natureza do substrato, além das condições de temperatura e do pH.

De acordo com os valores de  $V_{max}$ , no entanto, pode-se observar que se pode extrair maiores quantidades da enzima lipase de espécies do gênero *Aspergillus* do que do fungo *Fusarium solani* presente neste estudo (Mayel *et al.*, 2020).

### 5.9.7 Determinação do tempo de armazenamento

Após o primeiro dia de purificação da enzima lipase extraída do fungo *Fusarium solani* foi possível observar 95% de atividade lipolítica relativa e sob condições ideais de temperatura a sua atividade foi verificada a cada 15 dias durante o período de 90 dias. A lipase manteve sua meia vida com atividade de até 50% por 60 dias (Figura 28). Dessa forma, após esse período torna-se inviável seu uso e aplicação em formulações, pois a mesma não mantém sua efetividade.



**Figura 28.** O tempo de armazenamento foi medido em dias de acordo com a atividade lipolítica residual expressa em porcentagem. Legenda: A lipase de *Fusarium solani* foi verificada a cada 15 dias e mantida a uma temperatura de  $-34^{\circ}\text{C}$ .

As lipases, em geral, têm sido bastante utilizadas nas últimas duas décadas, para melhorar algumas características de produtos alimentícios e outros produtos

industriais. Dentro desta perspectiva, as lipases comerciais como é o caso da “Lipopan” possuem um papel de destaque dentre as enzimas lipolíticas existentes no mercado. Há vários tipos e origens de enzimas lipolíticas.

A Lipopan F BG® e Lipopan Xtra BG® são enzimas lipolíticas purificadas obtidas a partir de *Fusarium oxysporum* expressas em *Aspergillus oryzae*, que melhoraram as características de fabricação da massa e sua estabilidade (Melini *et al.*, 2018).

No caso da Lipopan Xtra (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) trata-se de uma lipase de terceira geração, mais concentrada que, alega-se, ter melhor tolerância. Com relação a Lipopan Prime®, acredita-se em comportamentos semelhantes às aquelas já consolidadas (Lipopan F e Lipopan Xtra).

Entretanto, todas essas enzimas conseguem prolongar o tempo de prateleira de produtos principalmente alimentícios por no máximo 48h como é o caso dos pães e leite, mas a lipase extraída do fungo *Fusarium solani* presente neste estudo possui uma maior estabilidade proporcionando um maior tempo de armazenamento mesmo sendo em baixas temperaturas.

Após a produção da microemulsão incorporada a enzima lipase de *Fusarium solani*, a atividade enzimática foi verificada e comparada com a lipase comercial Amano Lipase OS de *Burkholderia cepacia* da empresa Sigma-Aldrich. Os resultados mostraram que a lipase imobilizada apresentou quase 100% de eficácia quando comparada a enzima comercial de origem bacteriana (Tabela 8).

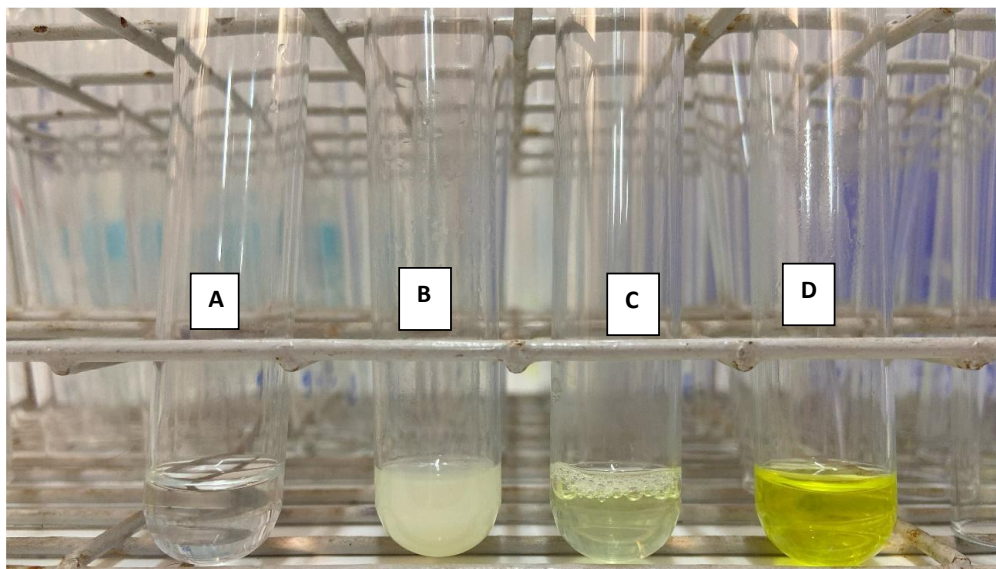
**Tabela 8.** Atividade lipolítica das lipases de *F. solani* e comercial livre e imobilizada na microemulsão

| Enzima                            | U/mL          |                            |
|-----------------------------------|---------------|----------------------------|
|                                   | Enzima livre  | Imobilizada (Microemulsão) |
| <b>Lipase de <i>F. solani</i></b> | 354,63 ± 0,04 | 483,47 ± 0,05              |
| <b>Lipase comercial</b>           | 407,41 ± 0,06 | 501,79 ± 0,04              |

Legenda: Atividade enzimáticas foram estabelecidas pelo método de Silva *et al* (2005) utilizando Palmitato de p – nitrofenil (p – NPP) como substrato.

Fonte: Autoria própria (2024)

A figura 29, ilustra as soluções sem o substrato e com a enzima, na sua forma imobilizada e não imobilizada, sendo A- Branco. B-Microemulsão sem enzima lipase.C- Enzima lipase livre. D- Microemulsão com lipase de *Fusarium solani*.

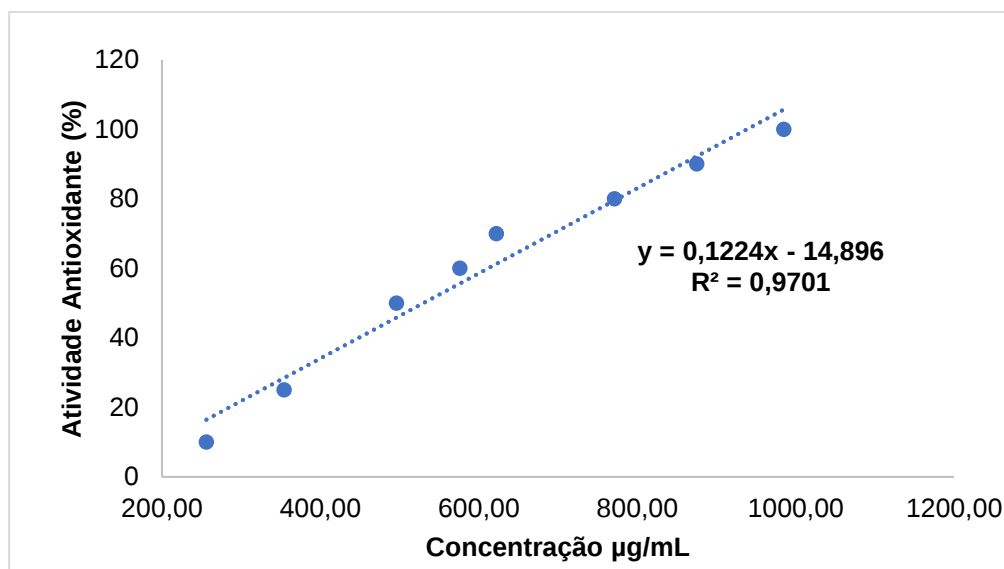


**Figura 29.** Atividade enzimática da microemulsão de lipase de *F. solani*. Legenda: Atividade enzimáticas foram estabelecidas pelo método de Silva *et al.* (2005) utilizando Palmitato de p – nitrofenil (p – NPP) como substrato. A- Branco. B-Microemulsão sem enzima lipase.C- Enzima lipase livre. D- Microemulsão com lipase de *Fusarium solani*.

## 5.10 Atividade antioxidante da lipase de *Fusarium solani*

### 5.10.1 Atividade antioxidante por dPPH

Para verificação da atividade antioxidante da lipase de *F.solani* foi construída uma curva padrão de dppH de acordo com a figura 30.



**Figura 30.** Curva padrão do DPPH

De acordo com a tabela 9, a enzima lipase de *Fusarium solani* apresentou uma quantidade pequena de amostra de 2,158 µM em equivalente de trolox por grama. A análise da capacidade antioxidante é desafiadora principalmente para substâncias de caráter lipídico e proteico, uma vez que a maioria dos métodos foram desenvolvidos para amostras hidrofílicas e os lipídios apresentam uma natureza hidrofóbica, dificultando sua homogeneização em meio aquoso. Além disso, a turbidez gerada pelas amostras oleosas pode ocasionar resultados falso positivos e não reprodutíveis (Castelo-Branco & Torres, 2011).

A análise de atividade antioxidante da lipase de *Fusarium solani* indica um valor de 2,158 µM de Trolox por grama, o que sugere uma capacidade antioxidante relativamente baixa, o que se deve ao fato de que a enzima é uma proteína com características específicas que podem influenciar a medição da atividade antioxidante. Um estudo de Zhang *et al.* (2022), por exemplo, destacou que lipases de fontes fúngicas frequentemente exibem uma atividade antioxidante reduzida quando analisadas com os métodos convencionais, justamente pela sua natureza lipofílica.

Li *et al.* (2021), identificaram que amostras com turbidez por conta das amostras oleosa são devido à presença de lipídios podem levar a erros de leitura, especialmente em ensaios de absorção óptica.

Quanto a capacidade antioxidante das lipases alguns estudos sugerem que lipases de diferentes fontes fúngicas e bacterianas apresentam capacidades antioxidantes variáveis. Por exemplo, a pesquisa de Patel *et al.* (2023) observou que

lipases de *Fusarium spp.* podem apresentar atividade antioxidante em níveis baixos a moderados, dependendo de como são extraídas e preparadas.

O valor de 2,158  $\mu\text{M}$  de Trolox pode ser considerado pequeno, mas não incomum para esse tipo de enzima. A atividade antioxidante das lipases é frequentemente modulada por fatores como pH, temperatura, e presença de cofatores ou solventes orgânicos.

**Tabela 9.** Atividade antioxidante da lipase de *F. solani*

| Teste | Atividade Antioxidante ( $\mu\text{M TE /g}$ )* |
|-------|-------------------------------------------------|
| DPPH  | 2,158 $\pm$ 0,167                               |

Valores das médias das triplicatas  $\pm$  desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). \*ET = equivalente do Trolox. Fonte: Autoria própria (2024).

### 5.10.2 Atividade antioxidante por ABTS

A atividade antioxidante por ABTS da lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani* com e sem microemulsão está contida nas tabelas 10 e 11. Os resultados indicam que a microemulsão incorporada com a enzima possui a maior atividade antioxidante, seguida pela enzima isolada, enquanto a microemulsão sem a enzima (branco) apresenta menor atividade. Além disso, a microemulsão incorporada com a enzima possui a menor concentração efetiva ( $\text{EC}_{50}$ ), sugerindo maior eficiência antioxidante.

**Tabela 10.** Atividade antioxidante equivalente ao Trolox na enzima, microemulsão incorporada com a enzima e microemulsão sem a incorporação (Branco) pelo método ABTS.

| Amostras Analisadas                   | Atividade antioxidante ( $\mu\text{M ET /g}$ )* |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Enzima                                | 355,2a $\pm$ 9,982                              |
| Microemulsão incorporada com a Enzima | 649,0b $\pm$ 10,32                              |
| Microemulsão (Branco)                 | 38,64c $\pm$ 0,108                              |

\*ET = equivalente do Trolox. Valores das médias das triplicatas  $\pm$  desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo ANOVA Tukey's multiple comparisons test. Fonte: Autoria própria (2024).

**Tabela 11.** Atividade antioxidante da concentração efetiva de 50% ( $\text{EC}_{50}$ ) da enzima, microemulsão incorporada com a enzima e microemulsão sem a incorporação (Branco) método ABTS.

| Amostras Analisadas                   | EC50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Enzima                                | 222,4a $\pm$ 2,026        |
| Microemulsão incorporada com a Enzima | 57,22b $\pm$ 0,5161       |
| Microemulsão (Branco)                 | 651,2c $\pm$ 8,171        |
| Trolox                                | 4,051d $\pm$ 0,00         |

Valores das médias das triplicatas  $\pm$  desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo ANOVA Tukey's multiple comparisons test.

Fonte: Autoria própria (2024).

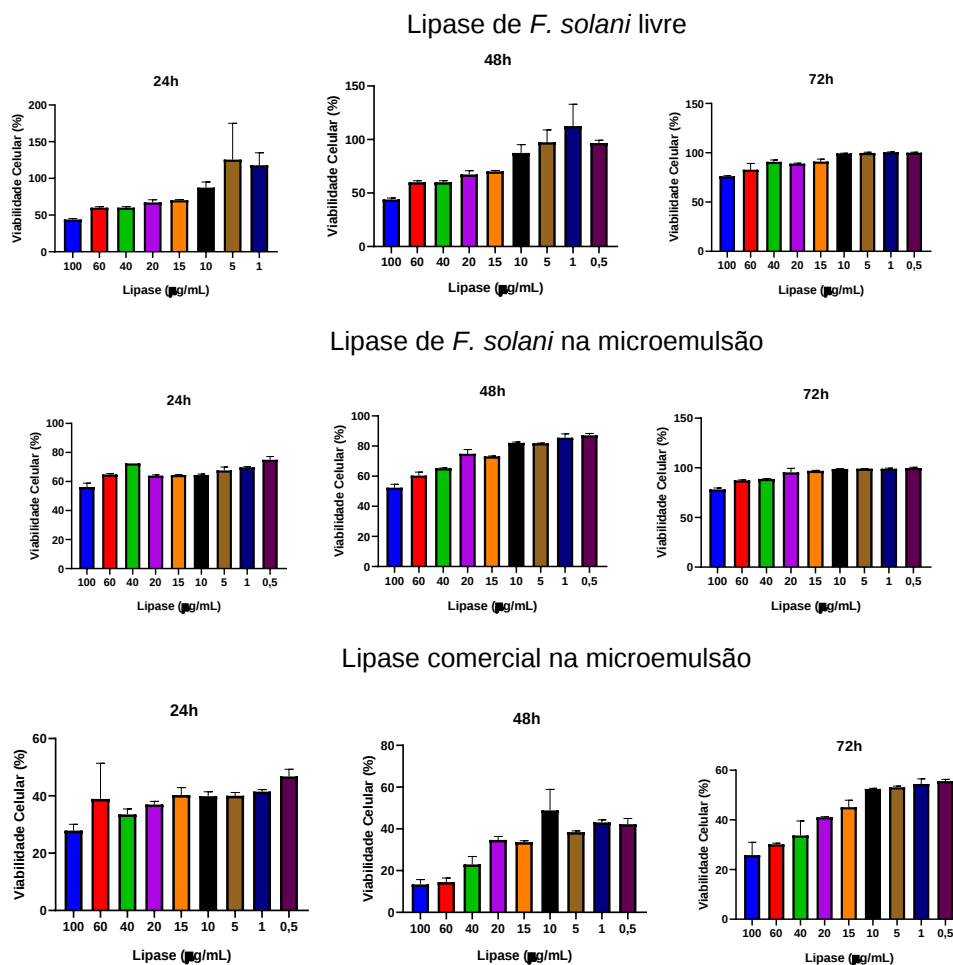
### 5.11 Avaliação da viabilidade celular frente à Lipase de *Fusarium solani*

A literatura já mostra que as lipases são enzimas reconhecidas do pâncreas com funções extensamente caracterizadas na digestão de gorduras dietéticas. No entanto, em outros locais do corpo, as lipases de linfócitos podem ter um papel na citotoxicidade mediada por linfócito T citotóxico (CTL) de células malignas.

Um estudo de Alves *et al.* (2010) testou uma lipase de linfócito T induzido por IL-4 (células T) chamada lipase pancreática relacionada proteína 2 (PLRP2). PLRP2 mediou a morte apoptótica e necrose pela liberação de ácidos graxos dos triglicerídeos em mastocistomas do tipo P815 viáveis foram reduzidas nos ensaios contendo triglicerídeos quando comparados aos ensaios sem lipídios.

Outro artigo de Hollenbach *et al.* (2021) revela que processos biocatalíticos podem produzir uma fração glicolípida da lipase. A lipase possui atividade anticancerígena como indica as curvas de crescimento responsivas à dose inibição de células NUGC-3 incubadas com fração tratada com lipase e fração não tratada por 48 h.

No presente estudo a microemulsão de lipase de *Fusarium solani*, a lipase livre e a lipase comercial foram testadas em células RAW 264.7 em diferentes concentrações e distintos intervalos de tempo e mostraram-se mais viáveis e estáveis na presença da microemulsão até as 72 hrs de teste (Figura 31). Dessa forma, a enzima imobilizada na forma de microemulsão torna-se a forma mais viável de uso e aplicação nas mais diversas áreas e indústrias, pois além de possuir uma estabilidade e durabilidade maior, não causa danos às células de murinos saudáveis que é uma triagem para posteriores estudos em células humanas.



**Figura 31.** Avaliação da viabilidade celular na linhagem celular RAW 264.7

## 5.12 Aplicação biotecnológica da microemulsão de lipase de *F. solani*

### 5.12.1 Aplicação da Microemulsão de lipase de *F. solani* na degradação de gordura

Entre as várias aplicações biotecnológicas a lipase de *F. solani* assim como as lipases microbianas, a biodegradação da gordura é uma característica das enzimas lipases. Neste estudo, a propriedade da lipólise foi estudada pela lipase de frango, esta enzima pode ser aplicada na remoção de gorduras na área médica, bem como lipólise de gorduras em água, atuando no saneamento e prevenção da poluição da água, bem como detergentes e coadjuvantes dos mesmos em superfícies.

Após o processo de imobilização e otimização de obtenção da enzima lipase do fungo da espécie *Fusarium solani*, foi comprovado através de teste experimental em tecido animal (figura 32) que a microemulsão da lipase de *F. solani* é mais eficaz

que a lipase de *F. solani* livre. lipase e a lipase livre comercial em 24 horas com atividade enzimática de 97,9 U/ml conforme tabela 12.

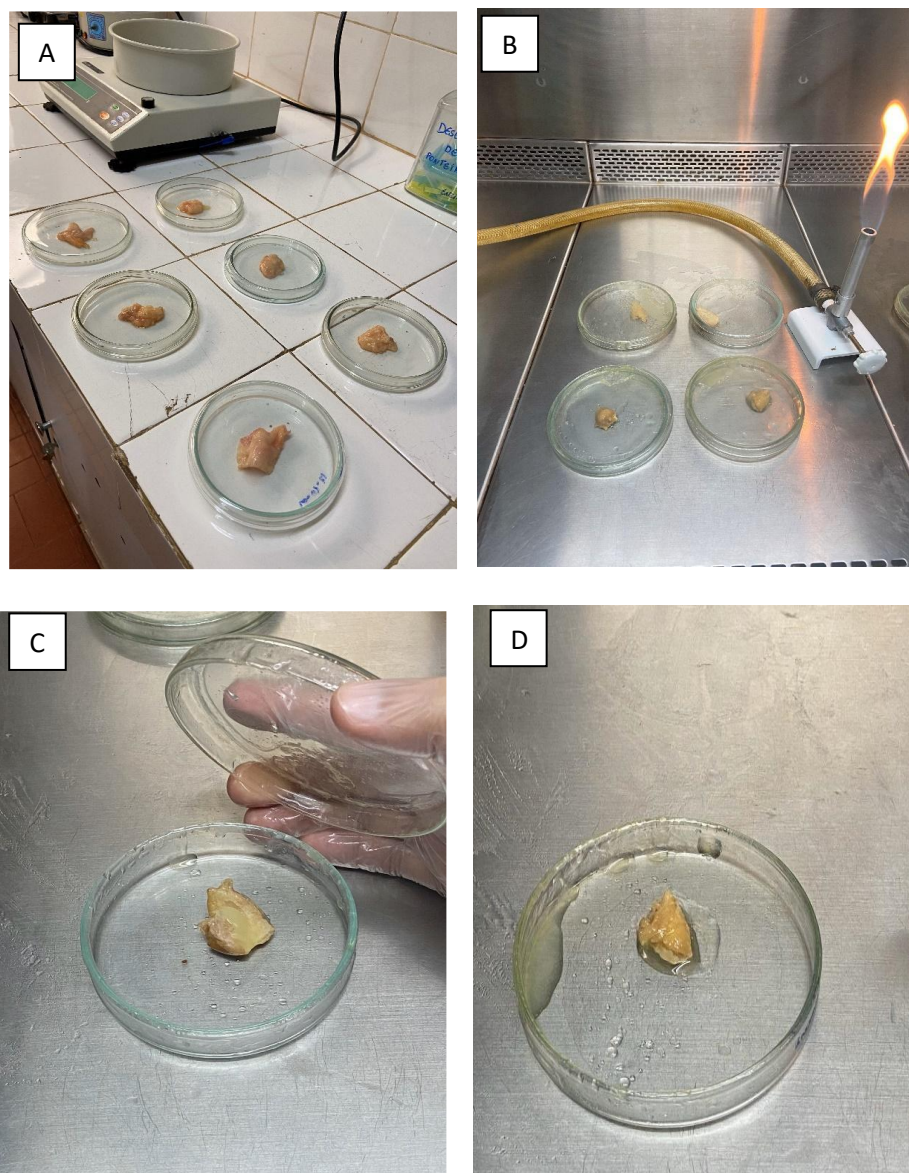
**Tabela 12.** Degradação da gordura de frango pela lipase *F. solani* e comercial em diferentes períodos.

| Ensaio                                            | 24h               |                             | 28h               |                             | 72h               |                             | 96h               |                             |
|---------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|
|                                                   | Peso (mg)         | Atividade enzimática (U/ml) | Peso (mg)         | Atividade enzimática (U/ml) | Peso (mg)         | Atividade enzimática (U/ml) | Peso (mg)         | Atividade enzimática (U/ml) |
| <b>Controle</b>                                   | 10,6<br>±<br>0,04 | -                           | 10,6<br>±<br>0,05 | -                           | 10,6<br>±<br>0,03 | -                           | 10,6<br>±<br>0,04 | -                           |
| <b>Controle da microemulsão</b>                   | 10,2<br>±<br>0,04 | -                           | 10,2<br>±<br>0,04 | -                           | 10,2<br>±<br>0,06 | -                           | 10,2<br>±<br>0,01 | -                           |
| <b>Lipase comercial livre</b>                     | 10,1<br>±<br>0,08 | 77,8 ± 0,51                 | 8,36<br>±<br>0,07 | 61,56 ± 0,11                | 6,47<br>±<br>0,01 | 11,96 ± 0,36                | 2,06<br>±<br>0,06 | 0                           |
| <b>Lipase de <i>F. solani</i> livre</b>           | 10,6<br>±<br>0,05 | 79,1 ± 0,15                 | 8,03<br>±<br>0,05 | 65,9 ± 0,37                 | 6,21<br>±<br>0,04 | 16,75 ± 0,12                | 0,89<br>±<br>0,04 | 0                           |
| <b>Microemulsão da lipase de <i>F. solani</i></b> | 10,4<br>±<br>0,02 | 97,9 ± 0,27                 | 7,83<br>±<br>0,03 | 95,3 ± 0,26                 | 3,89<br>±<br>0,05 | 74,01 ± 0,17                | 0,12<br>±<br>0,04 | 33,15 ± 0,13                |
| <b>Microemulsão da lipase comercial</b>           | 10,5<br>±<br>0,01 | 95,7 ± 0,13                 | 8,12<br>±<br>0,04 | 88,1 ± 0,17                 | 4,21<br>±<br>0,07 | 83,86 ± 0,11                | 0,56<br>±<br>0,01 | 21,86 ± 0,27                |

Legenda: (-) Não avaliado

Atividade enzimáticas foram estabelecidas pelo método de Silva *et al.* (2005) utilizando Palmitato de p – nitrofenil (p – NPP) como substrato. Os resultados são apresentados.

Fonte: Autoria própria (2024).



**Figura 32.** Ensaio da lipase de *F. solani* na degradação de gordura. Legenda: A – Pesando as gorduras; B – Gorduras após a esterilização em autoclave; C – Gordura estéril antes da adição da microemulsão da lipase de *F. solani*. D – Gordura após o tratamento de 96h com a microemulsão de *F. solani*.

Um estudo de Alabdall et al. (2021) apresentou que entre as aplicações biotecnológicas utilizadas da enzima lipase é a de degradar gordura animal. A enzima lipase pode hidrolisar triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. Essa capacidade enzimática foi adotada para degradar gorduras animais (frango e ovelha). A enzima lipase de dois isolados foi capaz de degradar mais de 90% da gordura de frango e mais de 85% da gordura de ovelha. A atividade da lipase foi elevada nos primeiros 3 dias, onde ocorreu mais da metade do processo de degradação, semelhantemente ao presente estudo.

### 5.12.1 Outras aplicações

### 5.12.2 Aplicação da Microemulsão de lipase de *F. solani* como aditivos em detergentes

O presente estudo testou a utilização da enzima de *F. solani* isolada e na microemulsão com lipase de *F. solani*. Em três diferentes concentrações e verificou-se que a microemulsão com a lipase de *F. solani* foi mais eficaz em todas as 5 marcas de detergentes testadas, sendo melhor até que a lipase comercial. E a associação que mais se destacou mostrando ser um aditivo eficaz foi na marca Ypê com atividade lipolítica (Tabela 13).

As enzimas detergentes podem ser adicionadas a todos os detergentes em pó e líquidos fabricados. Celulases, lipases, amilases, e proteases são algumas das enzimas usadas na detergência para substituir fosfatos e silicatos tóxicos e para reduzir o alto consumo de energia e torna o uso de enzimas na formulação de detergentes rentável pois mantêm a forma e a cor das roupas lavadas. (Niyonzima, 2021).

Foi possível observar que a microemulsão com lipase de *F. solani* teve o melhor desempenho, apresentando a maior atividade relativa em todas as concentrações, superando a lipase comercial. Isso é especialmente evidente nas marcas de detergente Ypê (99,01% a 100% de atividade relativa) e Minuano (97,37% a 94,44% de atividade relativa).

As lipases de *Fusarium* são bem adaptadas a condições de pH alcalino e à presença de surfactantes, que são comuns em detergentes. Além disso, a enzima incorporada na microemulsão pode aumentar a estabilidade e a atividade das enzimas, o que explicaria os resultados observados na microemulsão com lipase de *F. solani*. O estudo de Silva *et al.* (2021) destaca que as microemulsões ajudam a proteger as enzimas contra a desativação prematura e facilitam a liberação da enzima no ambiente do detergente.

**Tabela.13.** Potencial uso da lipase extraída e purificada de *F. solani* como aditivos em detergentes.

| Detergente | Concentração | Lipase de <i>F. solani</i> |                        | Microemulsão com Lipase de <i>F. solani</i> |                        | Lipase comercial |                        | Microemulsão com lipase comercial |                        |
|------------|--------------|----------------------------|------------------------|---------------------------------------------|------------------------|------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
|            |              | Atividade (U/mL)           | Atividade relativa (%) | Atividade (U/mL)                            | Atividade relativa (%) | Atividade (U/mL) | Atividade relativa (%) | Atividade (U/mL)                  | Atividade relativa (%) |
| Ypê        | Controle     | 305,8                      | 100                    | 402,12                                      | 100,00                 | 503,14           | 100                    | 565,15                            | 100,0                  |
|            | 0.01%        | 301,1                      | 98,46                  | 398,12                                      | 99,01                  | 465,1            | 92,44                  | 541,26                            | 95,8                   |
|            | 0.1%         | 296,15                     | 96,84                  | 356,15                                      | 88,57                  | 426,11           | 84,69                  | 426,1                             | 75,4                   |
|            | 1%           | 289,73                     | 94,74                  | 307,26                                      | 76,41                  | 406,16           | 80,73                  | 410,7                             | 72,7                   |
| Minuano    | 0.01%        | 285,9                      | 93,49                  | 391,53                                      | 97,37                  | 475,15           | 94,44                  | 501,1                             | 88,7                   |
|            | 0.1%         | 261,15                     | 85,40                  | 362,12                                      | 90,05                  | 462,15           | 91,85                  | 487,3                             | 86,2                   |
|            | 1%           | 204,63                     | 66,92                  | 301,3                                       | 74,93                  | 444,2            | 88,29                  | 462,9                             | 81,9                   |
| Limpol     | 0.01%        | 298,16                     | 97,50                  | 378,15                                      | 94,04                  | 469,15           | 93,24                  | 553,15                            | 97,9                   |
|            | 0.1%         | 265,14                     | 86,70                  | 342,15                                      | 85,09                  | 453,11           | 90,06                  | 521,88                            | 92,3                   |
|            | 1%           | 233,96                     | 76,51                  | 295,15                                      | 73,40                  | 422,44           | 83,96                  | 506,15                            | 89,6                   |
| Oi         | 0.01%        | 296,17                     | 96,85                  | 379,15                                      | 94,29                  | 471,23           | 93,66                  | 512,15                            | 90,6                   |
|            | 0.1%         | 236,69                     | 77,40                  | 365,14                                      | 90,80                  | 452,14           | 89,86                  | 461,15                            | 81,6                   |
|            | 1%           | 201,1                      | 65,76                  | 311,15                                      | 77,38                  | 431,22           | 85,71                  | 403,15                            | 71,3                   |
| Brilux     | 0.01%        | 291,26                     | 95,25                  | 388,17                                      | 96,53                  | 463,15           | 92,05                  | 541,9                             | 95,9                   |
|            | 0.1%         | 253,14                     | 82,78                  | 356,8                                       | 88,73                  | 436,51           | 86,76                  | 514,1                             | 91,0                   |
|            | 1%           | 222,15                     | 72,65                  | 316,15                                      | 78,62                  | 402,17           | 79,93                  | 474,19                            | 83,9                   |

Fonte: Autoria própria (2025).

As concentrações mais baixas (0.01%) da lipase de *F. solani* imobilizada na microemulsão apresentaram a maior atividade relativa nas marcas Ypê e Minuano e mais eficácia. A atividade foi reduzida conforme as concentrações aumentaram, sugerindo que a quantidade excessiva de enzima pode ter levado à inibição da atividade ou que há uma limitação na capacidade de absorção e interação com os substratos presentes no detergente.

Kumar *et al.* (2020) mostra que nas lipases de *Fusarium* pode haver inibição enzimática ou até perda de atividade quando a concentração da enzima é muito alta, por conta de agregação de moléculas da enzima ou interações indesejáveis com outros componentes do detergente.

### **5.12.3 Aplicação da Microemulsão de lipase de *F. solani* como aditivos em sabão em pó**

De acordo com a tabela 14, a microemulsão com lipase de *F. solani* foi eficaz em todas as marcas de sabão em pó, mostrando uma atividade relativa em torno de 94% a 96% nas concentrações mais baixas (0.01%). A atividade diminui à medida que a concentração da lipase aumenta, especialmente para as concentrações de 1% (com atividade abaixo de 30% em alguns casos).

A lipase de *F. solani* isolada apresentou uma atividade mais baixa, com valores em torno de 65% a 70% em comparação com a microemulsão. Isso sugere que a associação com microemulsões aumenta a estabilidade e a atividade da lipase de *F. solani*, o que facilita sua atividade lipolítica no ambiente do sabão em pó que é alcalino e com surfactantes.

A lipase comercial mostrou-se menos eficaz que a lipase de *F. solani* isolada, especialmente nas concentrações de 1% em várias marcas de sabão em pó. A microemulsão com lipase comercial apresentou resultados superiores à lipase comercial pura, mas ainda assim foram inferiores aos resultados da microemulsão com lipase de *F. solani*, especialmente na marca Tixan Ypê (atividade relativa de 96.4% a 96.95% na concentração de 0.01%).

**Tabela.14.** Potencial uso da lipase e microemulsão extraída e purificada de *F. solani* como aditivos em sabão em pó.

| Sabão em pó | Concentração | Lipase de <i>F. solani</i> |                        | Microemulsão com Lipase de <i>F. solani</i> |                        | Lipase comercial |                        | Microemulsão com lipase comercial |                        |
|-------------|--------------|----------------------------|------------------------|---------------------------------------------|------------------------|------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
|             |              | Atividade (U/mL)           | Atividade relativa (%) | Atividade (U/mL)                            | Atividade relativa (%) | Atividade (U/mL) | Atividade relativa (%) | Atividade (U/mL)                  | Atividade relativa (%) |
| Tixan Ypê   | Controle     | 311,41                     | 100                    | 412,88                                      | 100                    | 523,17           | 100                    | 548,96                            | 100                    |
|             | 0.01%        | 202,89                     | 65,2                   | 398,11                                      | 96,4                   | 507,22           | 96,95                  | 452,1                             | 82,36                  |
|             | 0.1%         | 198,1                      | 63,6                   | 357,96                                      | 86,7                   | 436              | 83,34                  | 391,5                             | 71,32                  |
|             | 1%           | 105,69                     | 33,9                   | 317,2                                       | 76,8                   | 359,1            | 68,64                  | 297                               | 54,10                  |
| Brilhante   | 0.01%        | 189,17                     | 60,7                   | 395,43                                      | 95,8                   | 498,3            | 95,25                  | 466,9                             | 85,05                  |
|             | 0.1%         | 151,22                     | 48,6                   | 341,25                                      | 82,7                   | 436,96           | 83,52                  | 279,88                            | 50,98                  |
|             | 1%           | 93,1                       | 29,9                   | 275,93                                      | 66,8                   | 343,33           | 65,62                  | 221,5                             | 40,35                  |
| Ala         | 0.01%        | 226,11                     | 72,6                   | 392,84                                      | 95,1                   | 499,02           | 95,38                  | 462,96                            | 84,33                  |
|             | 0.1%         | 198,4                      | 63,7                   | 361,17                                      | 87,5                   | 423,14           | 80,88                  | 351                               | 63,94                  |
|             | 1%           | 101,2                      | 32,5                   | 311,8                                       | 75,5                   | 323,1            | 61,76                  | 218,25                            | 39,76                  |
| Bem-te-vi   | 0.01%        | 206,7                      | 66,4                   | 396,3                                       | 96,0                   | 496,78           | 94,96                  | 482,63                            | 87,92                  |
|             | 0.1%         | 178,3                      | 57,3                   | 358,14                                      | 86,7                   | 421,1            | 80,49                  | 382,2                             | 69,62                  |
|             | 1%           | 89,25                      | 28,7                   | 299,74                                      | 72,6                   | 397,36           | 75,95                  | 228,7                             | 41,66                  |
| Omo         | 0.01%        | 222,1                      | 71,3                   | 391,45                                      | 94,8                   | 490,85           | 93,82                  | 459,9                             | 83,78                  |
|             | 0.1%         | 209,48                     | 67,3                   | 355,74                                      | 86,2                   | 369,99           | 70,72                  | 413,9                             | 75,40                  |
|             | 1%           | 167,2                      | 53,7                   | 301,22                                      | 73,0                   | 288,2            | 55,09                  | 287,5                             | 52,37                  |

Fonte: Autoria própria (2025).

Marques *et al.* (2021) cita que as lipases do gênero *Fusarium* são mais eficientes que as lipases comerciais em produtos de limpeza, devido à sua especificidade para substratos lipídicos e sua capacidade de atuar de maneira satisfatória em ambientes como o do sabão em pó.

Em termos de estabilidade, a associação da lipase com microemulsões melhora a sua eficácia em sistemas como detergentes e sabões em pó, confirmando os resultados da tabela, onde as microemulsões com lipase de *F. solani* mostraram-se mais eficazes que a lipase isolada. Um estudo de Nair *et al.* (2022) relata que a microemulsão proporciona uma maior resistência à desativação da enzima, permitindo que ela atue de forma mais eficaz durante o ciclo de lavagem.

Segundo Zhang *et al.* (2020), microemulsões lipídicas podem proteger as enzimas contra a degradação e melhorar a sua atividade em condições de alta alcalinidade e presença de surfactantes. Essa abordagem é suportada pelos resultados apresentados na tabela, que mostram um desempenho significativamente melhor da microemulsão com lipase de *F. solani* em comparação com a lipase comercial.

#### **5.12.4 Potencial removedor de manchas**

A figura 33, representa a comparação entre vários grupos de tratamento para remoção de mancha de uma fibra, a qual todos os grupos apresentaram um bom desempenho, porém o grupo que removeu as manchas do tecido quase que totalmente foi o quarto grupo composto por água, detergente e microemulsão.

| ENSAIO                           | Microemulsão com Lipase de <i>F. solani</i>                                       |                                                                                   | Microemulsão com lipase comercial                                                   |                                                                                     |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|                                  | Antes                                                                             | Depois                                                                            | Antes                                                                               | Depois                                                                              |
| Água                             |  |  |  |  |
| Água + Detergente                |  |  |  |  |
| Água + Microemulsão              |  |  |  |  |
| Água + Detergente + Microemulsão |  |  |  |  |

**Figura 33.** Potencial removedor e aditivo de detergentes da lipase de *Fusarium solani* e Lipase comercial livre e na microemulsão.

Uma das classes de enzimas geralmente usadas em sabões e detergentes é a das lipases. A lipase é capaz de remover manchas gordurosas como gorduras, manteiga, óleo e sebo humano, além de manchas difíceis em tecido (Komal *et al.*, 2021).

Silva (2022) testou o uso de lipases e lacases na remoção de manchas em tecidos de algodão, evidenciando a eficácia dessas enzimas na degradação de substâncias oleosas e fenólicas presentes em manchas comuns como de óleo e vinho.

O fungo *Fusarium solani* produz várias enzimas extracelulares, como amilase, lipase, celulase, protease e lacase. No entanto, este é o primeiro estudo que testa as lipases extraídas deste fungo como removedoras de manchas em tecidos de algodão ou como desengordurante. A maioria dos estudos são com enzimas produzidas por outros microrganismos.

## 6. CONCLUSÃO

A fim de produzir a enzima lipase extraída e purificada do fungo *Fusarium solani* para aplicações biotecnológicas na saúde, na estética e na indústria, através deste estudo foi possível isolar o fungo *Fusarium solani* obtido da “Coleção de fungos do Maranhão” localizada no laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia básica e Aplicada (NIBA) na UFMA e logo em seguida identificar o melhor método de extração da enzima lipase que foi por meio de fermentação submersa.

Logo após extraída, a lipase passou por várias etapas de purificação e ultrapurificação até o isolamento de uma enzima livre. Vários parâmetros físico-químicos foram avaliados e comparados com a lipase comercial, incluindo a atividade lipolítica dos mesmos.

Foram analisadas, atividade antioxidante da enzima em estudo, a viabilidade celular, o que viabilizou a construção de um produto biotecnológico a base da lipase de *Fusarium solani* e através de um diagrama pseudoternário foi possível encontrar as melhores proporções para a formulação de uma microemulsão.

O produto obtido passou por vários testes de controle de qualidade e é um produto viável para o uso industrial. No que se refere a sua aplicação biotecnológica, foi verificado que esse produto possui uma ação de degradação de gordura animal, além de ser um potencial aditivo em produtos desengordurantes como sabão em pó e detergente e tem a capacidade de remover manchas persistentes.

Dessa forma, a lipase consegue estimular a degradação aquosa de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos. As enzimas lipases microbianas como a lipase fúngica de *Fusarium solani* tem um potencial na aplicação industrial devido à sua capacidade de manter sua atividade lipolítica sob temperaturas extremas, pH e solventes orgânicos e condições químicas. Sendo assim, este estudo faz menção a lipase fúngica de *F. solani* como uma fonte enzimática com atividade catalítica, baixo custo de produção e aplicabilidade biotecnológica.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABDELBASSET, W. K. *et al.* A low-fat diet combined with moderate-intensity aerobic exercise is more effective than a low-fat diet or aerobic exercise alone on dyslipidemia and depression status in obese patients: a randomized controlled trial. ***Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets***, v. 21, n. 12, p. 2289–2295, 2021. DOI: 10.2174/1871530321666210406161226.

ABDELLA, B. *et al.* Produção, purificação e caracterização de lipase ativa a frio do psicrotrófico *Pseudomonas* sp. A6. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 54, p. 1623–1633, 2023. DOI: 10.1007/s42770-023-01079-y.

ALABDALALL, A. H. *et al.* Application and characterization of crude fungal lipases used to degrade fat and oil wastes. ***Scientific Reports***, v. 11, p. 19670, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-98870-0.

AL-FADHAL, F. A.; AL-ABEDY, A. N.; ALKHAFIJE, D. A. Isolation and molecular identification of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their control feasibility by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. ***Egyptian Journal of Biological Pest Control***, v. 29, p. 47, 2019. DOI: 10.1186/s41938-019-0169-x.

ALI, S.; KHAN, S. A.; HAMAYUN, M.; LEE, I. J. The recent advances in the utility of microbial lipases: a review. ***Microorganisms***, v. 11, n. 2, p. 510, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11020510. PMID: 36838475; PMCID: PMC9959473.

ALVES, B. N. *et al.* Lipid-dependent cytotoxicity by the lipase PLRP2 and by PLRP2-positive cytotoxic T lymphocytes (CTLs). ***Cell Biochemistry and Function***, v. 27, n. 5, p. 296–308, 2009. DOI: 10.1002/cbf.1573.

ALVES, C. E.; DAL' MAGRO, G. P.; VIACAVA, K. R.; DEWES, H. Food acquisition in the geography of Brazilian obesity. ***Frontiers in Public Health***, v. 8, 2020. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00037.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 3–19, 2011. DOI: 10.1007/s13225-011-0116-y.

ARIF, M. *et al.* PCR-based identification and characterization of *Fusarium* sp. associated with mango malformation. **Biotechnology Research International**, 2011. DOI: 10.4061/2011/141649.

BARAJ, E.; AUGUSTO-RUIZ, W. Extração e purificação de enzimas. Vetur - **Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 9, p. 57–88, 2007. Disponível em: <https://periodicos.furg.br/vetur/article/view/438>. Acesso em: 19 mar. 2025.

BARROSO, T. A. *et al.* Association of central obesity with the incidence of cardiovascular diseases and risk factors. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, 2017. DOI: 10.5935/2359-4802.20170073.

BEZERRA, G. F. D. B. *et al.* Diversity and dynamics of airborne fungi in São Luís, State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 69–73, 2014. DOI: 10.1590/0037-8682-0229-2013.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: an overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, 101368, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101368.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, p. 288–298, 2019. DOI: 10.1038/s41574-019-0176-8.

BOUTARI, C.; MANTZOROS, C. S. A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. **Metabolism: Clinical and Experimental**, 2022. DOI: 10.1016/j.metabol.2022.155217.

CARVALHO, P. O. *et al.* Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, p. 75–80, 2003.

CASE, N. T. **et al.** The future of fungi: threats and opportunities. **G3: Genes|Genomes|Genetics**, v. 12, n. 11, jkac224, 2022. DOI: 10.1093/g3journal/jkac224.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, v. 24, p. 173–187, 2011.

CESÁRIO, L. M. *et al.* Optimization of lipase production using fungal isolates from oily residues. **BMC Biotechnology**, v. 21, n. 1, 2021.

CHAN, R. S.; WOO, J. Prevention of overweight and obesity: how effective is the current public health approach. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 765–783, 2010. DOI: 10.3390/ijerph7030765. PMID: 20617002; PMCID: PMC2872299.

CHANDRA, P.; ENESPA; SINGH, R.; ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 169, 2020. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8. PMID: 32847584; PMCID: PMC7449042.

CHUGH, R. M. *et al.* Fungal mushrooms: a natural compound with therapeutic applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 925387, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.925387.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, 2016.

DANDAVATE, V. *et al.* Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from Burkholderia multivorans V2 and its application for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3374–3381, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.01.

DE OLIVEIRA, B. H.; CORADI, G. V.; DE OLIVA-NETO, P.; DO NASCIMENTO, V. M. G. Biocatalytic benefits of immobilized *Fusarium* sp. (GFC) lipase from solid state fermentation on free lipase from submerged fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112235, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112235.

DE SOUZA, C. E. C.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. Characterization and application of *Yarrowia lipolytica* lipase obtained by solid-state fermentation in the synthesis of different esters used in the food industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, p. 933–959, 2019. DOI: 10.1007/s12010-019-03047-5.

DEMUNER, B. J.; PEREIRA JUNIOR, N.; ANTUNES, A. M. S. Technology prospecting on enzymes for the pulp and paper industry. **Journal of Technology Management & Innovation**, Santiago, v. 6, n. 3, p. 148–158, 2011. DOI: 10.4067/S0718-27242011000300011.

DEPOMMIER, C. *et al.* Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. **Nature Medicine**, v. 25, n. 7, p. 1096–1103, 2019. DOI: 10.1038/s41591-019-0495-2.

DONG, Z.; OLOFSSON, K.; LINARES-PASTÉN, J. A.; NORDBERG KARLSSON, E. Investigation of structural features of two related lipases and the impact on fatty acid specificity in vegetable fats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 7072, 2022. DOI: 10.3390/ijms23137072.

DOOLITTLE, M. H.; PÉTERFY, M. Mechanisms of lipase maturation. **Clinical Lipidology**, v. 5, n. 1, p. 71–85, 2010. DOI: 10.2217/clp.09.8. PMID: 20543905; PMCID: PMC2883275.

DUPONT, J. *et al.* Fungi as a source of food. **Microbiology Spectrum**, v. 5, p. 5.3.09, 2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0030-2016.

ELEAZU, C.; OMAR, N.; LIM, O. Z.; YEOH, B. S.; NIK HUSSAIN, N. H.; MOHAMED, M. Obesity and comorbidity: could simultaneous targeting of esRAGE

and sRAGE be the panacea?. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fphys.2019.00787.

EL-GENDI, H.; SALEH, A. K.; BADIERAH, R.; REDWAN, E. M.; EL-MARADNY, Y. A.; EL-FAKHARANY, E. M. A comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, and their role in mankind's challenges. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 8, n. 1, p. 23, 2021. DOI: 10.3390/jof8010023. PMID: 35049963.

EL-KAZAZ, M. K.; EL-FADLY, G. B.; HASSAN, M. A. A.; EL-KOT, G. A. N. Identification of some *Fusarium* spp. using molecular biology techniques. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v. 36, n. 1–2, p. 57–69, 2008.

ESTIVALETI, J. M.; GUZMAN-HABINGER, J.; LOBOS, J. *et al.* Time trends and projected obesity epidemic in Brazilian adults between 2006 and 2030. **Scientific Reports**, v. 12, p. 12699, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-16934-5.

FAETANI, L.; GHIZZONI, D.; AMMENDOLIA, A.; COSTANTINO, C. Safety and efficacy of mesotherapy in musculoskeletal disorders: a systematic review of randomized controlled trials with meta-analysis. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 53, n. 4, p. jrm00182, 2021. DOI: 10.2340/16501977-2817.

FATIMA, S.; FARYAD, A.; ATAA, A.; JOYIA, F. A.; PARVAIZ, A. Microbial lipase production: a deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, p. 445–458, 2021. DOI: 10.1002/bab.2019.

FENG, D.; LIU, T. F.; SU, J.; BOSCH, M.; WEI, Z.; WAN, W.; LIAN, X. Stable metal-organic frameworks containing single-molecule traps for enzyme encapsulation. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2015.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241–253, 2018. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.03.009.

GOPINATH, S. C.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 154549, 2013. DOI: 10.1155/2013/154549. PMID: 23865040.

GUERRAND, D. Economics of food and feed enzymes: status and perspectives. In: NUNES, C. S.; KUMAR, V. (Org.). *Enzymes in human and animal nutrition: principles and perspectives*. London: **Academic Press**, 2018. p. 487–514.

GUO, J. *et al.* A review on polysaccharide-based delivery systems for edible bioactives: pH responsive, controlled release, and emerging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 291, p. 139178, 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.139178. Acesso em: 18 mar. 2025.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 277–286, 2008.

HOLLENBACH, R.; OCHSENREITHER, K.; SYLDATK, C. Parameters influencing lipase-catalyzed glycolipid synthesis by (trans-)esterification reaction. In: HAUSMANN, R.; HENKEL, M. (Org.). *Biosurfactants for the biobased economy*. Cham: Springer, 2021. (**Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 181). DOI: 10.1007/10\_2021\_173.

WADDELL, I. S.; ORFILA, C. Dietary fiber in the prevention of obesity and obesity-related chronic diseases: from epidemiological evidence to potential molecular mechanisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2022.2061909.

JAMES, J. E. *et al.* Morphology, phenotype, and molecular identification of clinical and environmental *Fusarium solani* species complex isolates from Malaysia. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 845, 2022. DOI: 10.3390/jof8080845.

JAVED, S. *et al.* Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23–34, 2018.

JAYASINGHE, S.; GUILLOT, T.; BISSOON, L.; GREENWAY, F. Mesotherapy for local fat reduction. **Obesity Reviews**, v. 14, n. 10, p. 780–791, 2013. DOI: 10.1111/obr.12049.

JIA, Q. *et al.* Effects of lipase and xylanase pretreatment on the structure and pulping properties of wheat straw. **Polymers**, v. 14, p. 5129, 2022. DOI: 10.3390/polym14235129.

KIRAN, K. K.; CHANDRA, T. S. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. strain TSCVKK. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 1023–1031, 2008. DOI: 10.1007/s00253-007-1250-z.

KALMAN, B. *et al.* Isolation and identification of *Fusarium* spp., the causal agents of onion (*Allium cepa*) basal rot in northeastern Israel. **Biology**, v. 9, n. 4, p. 69, 2020.

KAMAL, M. Z. *et al.* Lipase in aqueous-polar organic solvents: activity, structure, and stability. **Protein Science**, v. 22, n. 7, p. 904–915, 2013. DOI: 10.1002/pro.2271.

KARNWAL, A. *et al.* Fungal enzymes for the textile industry. In: **Nonparametric Statistics**. p. 459–482, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-10480-1\_14.

KHAN, F. I. *et al.* The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, 2017. DOI: 10.3389/fbioe.2017.00016.

KHAN, N. *et al.* Endophytic *Fusarium solani*: a rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 970–976, 2018. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.08.016.

KHUSHWANT, Y. S. *et al.* Microemulsions for enhancing drug delivery of hydrophilic drugs: exploring various routes of administration. **Medicine in Drug Discovery**, v. 20, 2023. DOI: 10.1016/j.medidd.2023.100162.

KOMAL, V. J.; WAGHMODE, S. Lipase enzyme based green chemistry detergents for cleaning industry. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5775429>. Acesso em: 07 abr. 2025.

KUMAR, A. *et al.* Industrial applications of fungal lipases: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1142536.

KUMAR, A. *et al.* A broad temperature active lipase purified from a psychrotrophic bacterium of Sikkim Himalaya with potential application in detergent formulation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00642.

KYEKYEKU, J. O. *et al.* Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Fusarium solani* JK10. **Fitoterapia**, v. 119, p. 108–114, 2017. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.04.007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LASON, E.; OGONOWSKI, J. Lipase – characterization, applications and methods of immobilization. **Chemik**, v. 64, n. 2, p. 97–102, 2010.

LEE, G. *et al.* Effects of an exercise program combining aerobic and resistance training on protein expressions of neurotrophic factors in obese rats injected with beta-amyloid. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 13, p. 7921, 2022. DOI: 10.3390/ijerph19137921.

LI, M. *et al.* Impacto da turbidez em ensaios antioxidantes de lipídios: uma revisão. **Food Chemistry**, v. 315, p. 126–135, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126383.

LIU, X. *et al.* MiR-203 is an anti-obese microRNA by targeting apical sodium-dependent bile acid transporter. **iScience**, v. 25, n. 8, p. 104708, 2022. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104708.

LOLI, H. L.; SUNIL, N. K.; NITIN, S. K.; GUPTA, R. Lipases in medicine: an overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2015. DOI: 10.2174/1389557515666150709122722.

LOPEZ-YUS, M. *et al.* Identification of novel targets in adipose tissue involved in non-alcoholic fatty liver disease progression. **Faseb Journal**, v. 36, e22429, 2022.

LUZ, B. D. DA S.; SARROUH, B.; BICAS, J. L.; LOFRANO, R. C. Z. Lipase production by microorganisms isolated from the Serra de Ouro Branco State Park. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 1, e20190672, 2021. DOI: 10.1590/0001-3765202120190672.

MAEDA, N. *et al.* Effects of DNA polymerase inhibitory and antitumor activities of lipase-hydrolyzed glycolipid fractions from spinach. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 2, p. 121–128, 2005. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2004.08.005.

MAIA, M. M. *et al.* Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 23–27, 2001. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00079-1.

MALA, J. G.; TAKEUCHI, S. Understanding structural features of microbial lipases – an overview. **Analytical Chemistry Insights**, v. 3, p. 9–19, 2008. DOI: 10.4137/aci.s551.

MARINHO, T. S.; BORGES, C. C.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Intermittent fasting benefits on alpha- and beta-cell arrangement in diet-induced

obese mice pancreatic islet. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 34, 107497, 2020.

MARQUES, L. S. *et al.* Microemulsões enzimáticas: aplicações e vantagens na indústria de detergentes. **International Journal of Biochemistry**, v. 58, n. 6, p. 423–433, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiochem.2022.04.007.

MATARASSO, A.; PFEIFER, T. M. Mesotherapy and injection lipolysis. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 36, n. 2, p. 181–192, 2009. DOI: 10.1016/j.cps.2008.11.002.

MAYEL, M. H. *et al.* Comparative studies on the kinetic properties of lipases purified from *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* LC 269109. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 6, n. 2, art. 10, 2020.

MEHTA, A. *et al.* Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, 2017.

MEHTA, A. The lipases and their applications with emphasis on food industry. In: **Microbial Biotechnology in Food and Health**. [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 143–164. DOI: 10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2.

MELINI, V.; MELINI, F. Strategies to extend bread and GF bread shelf-life: From sourdough to antimicrobial active packaging and nanotechnology. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 9, 2018.

MENEZES, B. S. *et al.* Pigment production by *Fusarium solani* BRM054066 and determination of antioxidant and anti-inflammatory properties. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 117, 2020. DOI: 10.1186/s13568-020-01054-y.

MITSOU, E. *et al.* Formulation and structural study of a biocompatible water-in-oil microemulsion as an appropriate enzyme carrier: The model case of horseradish peroxidase. **Langmuir**, 2018. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b03124.

MOHAMMED, Y. M. M.; KHEDR, Y. I. Applications of *Fusarium solani* YMM20 in bioremediation of heavy metals via enhancing extracellular green synthesis of

nanoparticles. **Water Environment Research**, v. 93, n. 9, p. 1600–1607, 2021. DOI: 10.1002/wer.1542.

MONUJ, G.; SARMAH, D. K.; ALI, S. Cultural and morphological variations of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causing root rot of patchouli in Assam. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 11, p. 1889–1901, 2017. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.611.225.

MUSA, M. A.; BADISA, V. L.; LATINWO, L. M.; WARYOBA, C.; UGOCHUKWU, N. In vitro cytotoxicity of benzopyranone derivatives with basic side chain against human lung cell lines. **Anticancer Research**, v. 30, n. 11, p. 4613–4617, 2011.

NAIR, S. *et al.* Potencial de lipases microemulsionadas na degradação de lipídios em detergentes e sabões em pó. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 124, p. 71–79, 2022. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2022.05.002.

NELSON, P. E.; HORST, R. K.; WOLTZ, S. S. *Fusarium* diseases of ornamental plants. In: NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J. (Ed.). *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. University Park, PA: **The Pennsylvania State University Press**, 1981. p. 121–128.

NIKITIN, D. A. *et al.* Diversity, ecological characteristics and identification of some problematic phytopathogenic *Fusarium* in soil: A review. **Diversity**, v. 15, n. 1, p. 49, 2023. DOI: 10.3390/d15010049.

NIYONZIMA, F. N. Detergent-compatible fungal cellulases. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 1, p. 25–40, 2021. DOI: 10.1007/s12223-020-00838-w.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca* – *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, v. 92, p. 919–938, 2000.

O'DONNELL, K. *et al.* Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2477–2490, 2008.

OKAY, S.; ADEM, Ş.; KURT-KIZILDOĞAN, A. Characterization of highly stable extracellular lipase from the extremely halophilic archaeon Halolamina sp.

**Bioscience Journal**, v. 38, p. e38039, 2022. DOI: 10.14393/BJ-v38n0a2022-53865.

OKUNGBOWA, F. I.; SHITTU, H. O. Fusarium wilts: An overview. **Environmental Research Journal**, v. 6, n. 2, p. 83–102, 2012.

OLIVEIRA, B. H. *et al.* Comparison of lipase production on crambe oil and meal by Fusarium sp. (Gibberella fujikuroi complex). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 12, p. 1413–1425, 2013. DOI: 10.1002/ejlt.201300087.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97–109, set./dez. 2012. ISSN 1980-0002.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 4, p. 10–36, 2015.

PANTALONE, K. M. *et al.* Prevalence and recognition of obesity and its associated comorbidities: cross-sectional analysis of electronic health record data from a large US integrated health system. **BMJ Open**, v. 7, n. 11, e017583, 2017. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-017583.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. dos S. R. da; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de Rhizopus sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 135–140, 2003. DOI: 10.1590/s0101-20612003000200006.

PATEL, R. *et al.* Atividade antioxidante das lipases de Fusarium spp.: uma comparação entre diferentes fontes fúngicas. **International Journal of Antioxidants Research**, v. 12, n. 1, p. 45–59, 2023. DOI: 10.1016/j.ijar.2022.12.001.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F. de; BRUNO, L. M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35–40, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000100007.

PEREIRA, T. N. *et al.* Regulatory measures for the protection of adequate and healthy diet in Brazil: a 20-year analysis. Medidas regulatórias de proteção da alimentação adequada e saudável no Brasil: uma análise de 20 anos. **Cadernos de Saúde Pública**, 2022. DOI: 10.1590/0102-311X00153120.

PIJANOWSKA, D. G. *et al.* The pH-detection of triglycerides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 78, p. 263–266, 2001.

PLACHOURI, K. M.; GEORGIU, S. Mesotherapy: safety profile and management of complications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, p. 1601–1605, 2019.

POHANKA, M. Biosensors and bioassays based on lipases: principles and applications, a review. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 616, 2019. DOI: 10.3390/molecules24030616. PMID: 30744203; PMCID: PMC6384989.

POWELL-WILEY, T. M. *et al.* Obesity and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 143, p. e984–e1010, 2021.

PRAZERES, J. N. dos; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, 2006. DOI: 10.1590/s1517-83822006000400019.

PREESHILA, B. *et al.* Combined GLP-1, Oxyntomodulin, and Peptide YY improves body weight and glycemia in obesity and prediabetes/type 2 diabetes: a randomized, single-blinded, placebo-controlled study. **Diabetes Care**, v. 42, n. 8, p. 1446–1453, 2019. DOI: 10.2337/dc19-0449.

QUEISSADA, D. D.; SILVA, J. A. Enzyme immobilization in organic and inorganic supports: advantages and disadvantages. **Holos**, v. 20, n. 2, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.14295/holos.v20i2.12378>.

RATHNA, J. *et al.* Production of naphthoquinones and phenolics by a novel isolate *Fusarium solani* PSC-R of Palk Bay and their industrial applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 289–298, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.04.0.

RAVERA, F. *et al.* Emulsification and emulsion stability: the role of the interfacial properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 102344, 2021.

REBELL, G. *Fusarium* infections in human and veterinary medicine. In: NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J. (ed.). *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. University Park: **Pennsylvania State University Press**, 1981. p. 210–220.

REBELLO, C. J.; KIRWAN, J. P.; GREENWAY, F. L. Obesity, the most common comorbidity in SARS-CoV-2: is leptin the link? **International Journal of Obesity**, v. 44, p. 1810–1817, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41366-020-0640-5>.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265–270, 1950. DOI: <https://doi.org/10.2307/3755439>.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 2015. DOI: 10.1042/bse0590001. PMID: 26504249; PMCID: PMC4692135.

ROCHA, K. S. *et al.* Lipases of endophytic fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria* sp.: application in the synthesis of solketal derived monoacylglycerols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 142, p. 109664, 2020. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2020.109664.

ROSENAU, F.; TOMMASSEN, J.; JAEGER, K. E. Lipase-specific foldases. **Chembiochem**, v. 5, n. 2, p. 152–161, 2004.

ROTH, M. G.; WESTRICK, N. M.; BALDWIN, T. T. Fungal biotechnology: from yesterday to tomorrow. *Frontiers in Fungal Biology*, v. 4, p. 1135263, 2023. DOI: 10.3389/ffunb.2023.1135263.

SAXENA, R. *et al.* Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 1, p. 1–18, 2003. DOI: 10.1016/s0167-7012(02)00161-6.

SEGERITZ, C. P.; VALLIER, L. Cell culture: growing cells as model systems in vitro. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 2017. p. 151–172. DOI: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.

SERRANO-LOTINA, R. *et al.* Zeta potential as a tool for functional materials development. **Catalysis Today**, v. 423, 2023. DOI: 10.1016/j.cattod.2022.08.004.

SHALAPY, N. M.; KANG, W. *Fusarium oxysporum* & *Fusarium solani*: identification, characterization, and differentiation of the fungal phenolic profiles by HPLC and the fungal lipid profiles by GC-MS. **Journal of Food Quality**, 2022. p. 1–12. DOI: 10.1155/2022/4141480.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 625258, 2014. DOI: 10.1155/2014/625258.

SHARMA, P. *et al.* Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 369–377, 2017. DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.06.007.

SILVA, L. E. S. *et al.* Temporal trend of overweight and obesity prevalence among Brazilian adults, according to sociodemographic characteristics, 2006–2019.

**Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, n. 1, p. e2020294, 2021. DOI: 10.1590/s1679-49742021000100008.

SILVA, M. A. *et al.* Uso de lipases de *Fusarium* em detergentes: estudo da estabilidade e eficácia em sistemas com surfactantes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 1, p. 99–107, 2021. DOI: 10.1590/s0104-6632202100010013.

SILVA, W. O. B. *et al.* Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 321–326, 2005. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.005.

SINGH, R.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial enzymes—an overview. In: SINGH, R. S. *et al.* (ed.). **Advances in Enzyme Technology**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 1–40.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486–520, 2011. DOI: 10.1007/s12010-011-9444-3.

SIPOS, G.; ANDERSON, J. B.; NAGY, L. G. *Armillaria*. **Current Biology**, v. 28, n. 7, p. R297–R298, 2018.

SOCCOL, C. R. *et al.* Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017. DOI: 10.1016/j.biori.2017.01.002.

SOEKA, Y. S.; SULISTIANI. *Bacillus subtilis* C2 producing lipase isolated from bulk shrimp paste in Samarinda East Kalimantan. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 572, p. 012007, 2020. DOI: 10.1088/1755-1315/572/1/012007.

STASI, A. *et al.* Obesity-related chronic kidney disease: principal mechanisms and new approaches in nutritional management. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 925619, 2022.

SUMMERELL, B. A. *et al.* Fusarium species associated with plants in Australia. **Fungal Diversity**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2010. DOI: 10.1007/s13225-010-0075-8.

TANG, W. *et al.* Aberrant cholesterol metabolic signaling impairs antitumor immunosurveillance through natural killer T cell dysfunction in obese liver. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 19, p. 834–847, 2022.

THOMAS, B. *et al.* Molecular identification of Fusarium species complexes: which gene and which database to choose in clinical practice? **Journal de Mycologie Médicale**, 2019. DOI: 10.1016/j.mycmed.2019.01.003.

TIWARI, P.; UPADHYAY, M. K. Characterization of a thermotolerant lipase from *Pichia anamola*. **European Journal of Experimental Biology**, v. 2, n. 3, p. 464–467, 2012.

TRABULSI, L. R. (Ed.); ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

UÇAK, İ.; AFREEN, M. Chapter 13 – **Enzymes**. In: **Nutraceutical and Functional Food Components**. 2. ed. Academic Press, 2022. p. 537–571. DOI: 10.1016/B978-0-323-85052-0.00006-4.

VALENZUELA-LÓPEZ, N. *et al.* Coelomycetous fungi in the clinical setting: morphological convergence and cryptic diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 552–567, 2017. DOI: 10.1128/JCM.02221-16.

WANG, H. *et al.* Textile waste valorization using submerged filamentous fungal fermentation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 118, p. 143–151, 2018. DOI: 10.1016/j.psep.2018.06.038.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolation and crystalization of the fermentation enzyme enolase. **Biochemische Zeitschrift**, v. 310, p. 384–421, 1941.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. *et al.* (ed.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WORLD OBESITY FEDERATION. **World Obesity Atlas 2022**. London: WOF, 2022. Disponível em: <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2022>. Acesso em: 7 jun. 2022.

XU, K. *et al.* Engineering thermostability of industrial enzymes for enhanced application performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 291, p. 139067, 2024.

YANG, M.; LIU, S.; ZHANG, C. The related metabolic diseases and treatments of obesity. **Healthcare**, v. 10, p. 1616, 2022. DOI: 10.3390/healthcare10091616.

ZANG, W. *et al.* Propriedades e estabilidade de lipases de *Fusarium solani* em microemulsões e suas aplicações industriais. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, p. 104–115, 2020. DOI: 10.1007/s11947-020-02599-1.

ZHAO, J. *et al.* Production, purification and biochemical characterisation of a novel lipase from a newly identified lipolytic bacterium *Staphylococcus caprae* NCU S6. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 248–256, 2021. DOI: 10.1080/14756366.2020.1861607.

## ANEXOS

## Anexo 1



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A10722E**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A10722E**  
 Usuário: **MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDÃO NASCIMENTO**  
 CPF/CNPJ: **044.929.003-49**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Fusarium solani**

**Fonte do CTA**

**CTA de origem não identificável**

Título da Atividade: **Bioprospecção tecnológica da Lipase exógena produzida a partir de Fusarium solani**

**Equipe**

|                                                |             |
|------------------------------------------------|-------------|
| <b>MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDÃO NASCIM</b> | <b>UFMA</b> |
| <b>Andressa Sousa Silva</b>                    | <b>UFMA</b> |
| <b>Amanda Mara Teles</b>                       | <b>UEMA</b> |
| <b>Allysson Kayron de Carvalho Silva</b>       | <b>UFMA</b> |

## Anexo 2



04/04/2024 10:51 870240029230  
29409162317418244

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 006582 4

---

Dados do Depositante (71)

## Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga.

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: ageufma.cprp@ufma.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 04/04/2024 às 10:51, Petição 870240029230

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LIPASE EXÓGENA PRODUZIDA A PARTIR DO FUNGO FUSARIUM SOLANI, SOLUÇÃO ENZIMÁTICA E FORMULAÇÕES OBTIDAS

**Resumo:** A presente invenção trata-se de uma composição de microemulsão utilizando a enzima exógena lipase purificada produzida pelo fungo *Fusarium solani*, com alta atividade e estabilidade, como princípio ativo. Este composto pode ser utilizado em diversas aplicações biotecnológicas e industriais, tais como: intradermoterapia, creme enzimático para redução de medidas e celulite, detergentes enzimáticos hospitalares, desnatador de leite e redutor de gordura de alimentos. Isso a torna uma alternativa para a produção de lipase.

**Figura a publicar:** 22

**Anexo 3**

## Artigo para publicação



ISSN 1696-8352  
revista@observatoriolatinoamericano.com

**DECLARAÇÃO**

OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA, ISSN 1696-8352, declara para os devidos fins, que o artigo intitulado Application and characterization of Fusarium solani lipase microemulsion used to degrade fatty de autoria de Andressa Sousa Silva, Allysson Kayron de Carvalho Silva, Amanda Mara Teles, Geusa Felipa de Barros Bezerra, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, foi publicado no v.22, n.10, de 2024.

A revista é on-line, e os artigos podem ser encontrados ao acessar o link:

<https://ojs.observatoriolatinoamericano.com/ojs/index.php/olel/issue/view/44>

DOI: <https://doi.org/10.55905/oelv22n10-168>

Por ser a expressão da verdade, firmamos a presente declaração.

Curitiba, outubro 18, 2024.

