



Padronização do uso de corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas

Victor Fortuna Alves Maciel¹
Thályta Fraga Pacheco²
Sílvia Belém Gonçalves³

Introdução

As lipases (glicerol-ester-hidrolases) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (SHARMA et al., 2001).

A funcionalidade desse grupo enzimático está relacionada à quebra de triglicerídeos insolúveis para a geração de ácidos graxos livres. A função secundária das lipases é a catálise de reações de esterificação e transesterificação. Em razão da ampla versatilidade de ação desse grupo enzimático, sua utilização industrial e tecnológica tem crescido significativamente, sendo empregado, por exemplo, na fabricação de detergentes e aditivos alimentares, e tendo aplicações potenciais no processamento de couros, indústria farmacêutica, química fina, oleoquímica e tratamento de resíduos industriais.

Lipases podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. As lipases microbianas são as mais estudadas e utilizadas industrialmente por serem mais estáveis, produzidas com menor custo e alta velocidade de síntese (FARIA, 2010).

O enorme potencial biotecnológico dessas enzimas inclui fatos relacionados a : a) possuir alta estabilidade em solventes orgânicos; b) não requerer a presença de co-fatores; c) possuir uma larga seletividade pelo substrato e, por isso, d) exibir uma alta enantiosseletividade, e) ser estável em altas temperaturas e amplas faixas de pH. (CASTRO et al., 2004).

Existem diversos métodos, quantitativos e qualitativos, para avaliação da produção de enzimas com atividades lipolíticas. Dentre os testes quantitativos conhecidos, o mais aplicado é o da titulometria, que se baseia na hidrólise de um triglicerídeo pelas enzimas contidas na amostra,

¹ Estudante de Biologia, UnB, Estagiário da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, e-mail: fortuna1344@gmail.com.

² Engenheira Química, Mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, e-mail: thalyta.pacheco@embrapa.br.

³ Engenheira Química, Doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, e-mail: silvia.belem@embrapa.br.

sendo a quantidade de ácidos graxos liberados determinada por titulação, ou seja, pelo confronto com outra espécie química, de concentração e natureza conhecidas (FREIRE, 1996). A quantificação dos ácidos graxos livres pode ser realizada, também, por métodos colorimétricos, turbidimétricos ou fluorimétricos (OLIVEIRA, 2000).

Dentre os métodos qualitativos atuais, faz-se a avaliação da atividade lipolítica por meio da irradiação por luz ultravioleta de meios de cultura contendo o corante rodamina B. Essa irradiação induz a fluorescência do composto formado entre os ácidos graxos livres no meio e o corante adicionado. A atividade é avaliada pela presença de halo fluorescente ao redor do ponto central de crescimento.

Apesar de este método qualitativo de avaliação da atividade lipolítica ser um mecanismo já bem descrito na literatura científica, não se encontrou uma metodologia padronizada para este procedimento. Diversas publicações tratam do assunto, porém ou não informam em que quantidade o meio de cultura (meio ágar) é suplementado com rodamina B ou existem divergências quanto à concentração de corante utilizada.

Segundo Fernandes (2007 citado por YOSHIOKA et al, 2009), utiliza-se meio ágar suplementado com corante rodamina B (2% m/v) e óleo de oliva (2%). A produção de lipases em placa de Petri pode ser confirmada pela presença de halos alaranjados, fluorescentes à luz UV, após 48 horas de incubação em estufa a 28°C.

Em contraponto, tem-se a metodologia descrita primeiramente por Kouker e Jaejer (1987), o qual utiliza uma concentração de 0,001% m/v do corante em meio ágar, sendo a atividade enzimática avaliada pelo mesmo método de contraste à luz UV, evidenciada pela formação de halo fluorescente quando as placas são irradiadas a 350 nm. Santos et al. (2003), Alberton (2009) e Lock (2007) também utilizaram a mesma metodologia.

Metodologia

Com o objetivo de se avaliar a eficiência das concentrações de rodamina B apresentadas e de se determinar a concentração ideal deste corante que possibilite a visualização dos halos utilizando a luz

UV da câmara de fluxo laminar, foram testadas, sob as mesmas condições de análise, as concentrações citadas e outras intermediárias de rodamina B.

Utilizando-se informações provenientes das metodologias acima descritas, os meios de cultura foram preparados com 15 g/L de ágar, 2% de óleo de oliva e concentração variável do corante. Foram testadas as concentrações de 0,001%; 0,007%; 0,6%; 1,5% e 2% de rodamina B. Após preparo, os meios foram homogeneizados com misturador.

Para o teste das metodologias apresentadas foram inoculados estirpes de 5 micro-organismos, sendo um deles, *Penicillium expansum*, conhecido produtor de lipases e quatro outras espécies sem atividade lipolítica descrita. O cultivo fúngico ocorreu em estufa bacteriológica a 30°C por 48 horas, sem aeração forçada.

Resultados e Discussão

Nas placas com a menor concentração do corante (0,001%) não foi possível visualizar a formação de halos fluorescentes com nenhum dos micro-organismos avaliados, nem nas amostras inoculadas com *Penicillium expansum*. Conclui-se, então, que nessas condições, o método não tem sensibilidade suficiente para acusar atividade lipolítica quando se usa a lâmpada UV da câmara de fluxo laminar.

A Figura 1(A) mostra imagens das placas com 0,001% de corante, inoculadas com *Penicillium expansum*. Não é possível visualizar a formação de halos utilizando a câmara de fluxo laminar.

Não foi possível avaliar a formação de halos quando se utilizou a maior concentração de rodamina B no meio (2%), pois, nesta concentração, o meio sequer se solidifica. O mesmo ocorre para as concentrações de 1,5% e 0,6% de corante.

O método híbrido, desenvolvido pela equipe da Agroenergia, com a concentração de 0,007% m/v, apresentou formação de halo fluorescente ao redor do ponto central de crescimento para a estirpe conhecida pela produção de lipases. Esse halo pôde ser facilmente visualizado na câmara de fluxo laminar.

Dentre as demais estirpes avaliadas, o fungo isolado da torta de pinhão-manso, CNPAE 44/09, também apresentou atividade lipolítica.

Na Figura 1(B) pode-se observar a formação de halos fluorescentes quando se utiliza 0,007% de corante no meio de cultura e *Penicillium expansum* como inóculo. A Figura 2 mostra a imagem das duas placas preparadas com concentrações diferentes de corante, onde pode-se observar a formação do halo na placa contendo 0,007% do corante.

Conclusões

Pode-se concluir que, utilizando uma concentração de corante rodamina B (0,007%), a metodologia de análise é funcional para detecção de estirpes com atividade lipolítica.

Além disso, o método requer apenas uma câmara de fluxo laminar, podendo ser facilmente reproduzido, sem necessidade de equipamento mais sofisticado. As demais concentrações de corante testadas, inclusive as reportadas pela literatura, não apresentaram essa funcionalidade.

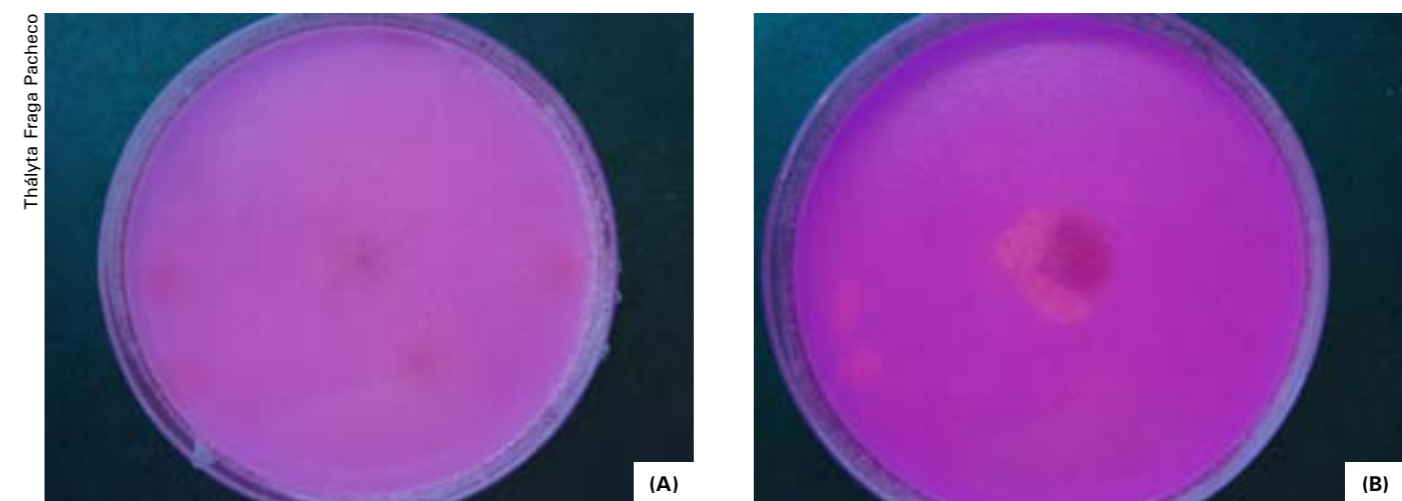


Figura 1. (A) Placas contendo 0,001% de corante, inoculadas com *Penicillium expansum*, (B) Placa contendo de 0,007% de corante, inoculada com *Penicillium expansum*.

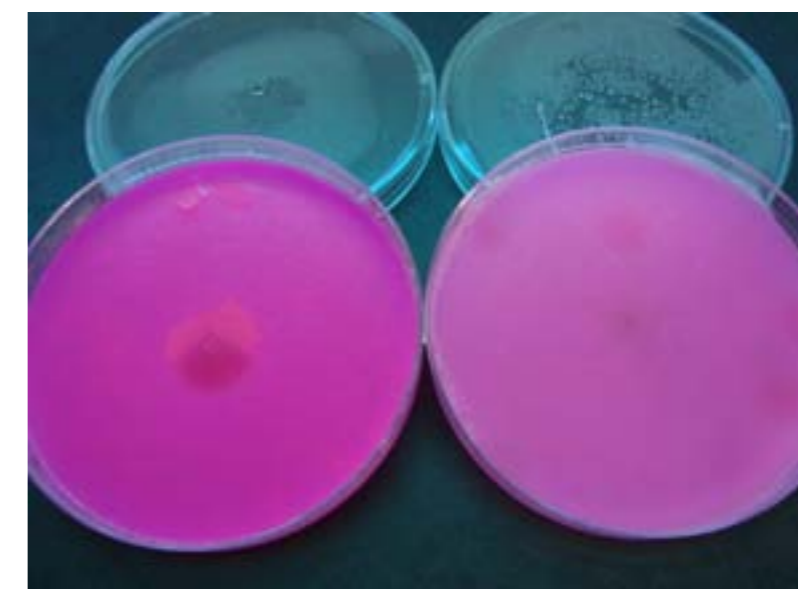


Figura 2. Imagem das placas contendo concentrações diferentes de rodamina B. A placa da esquerda concentração de 0,007% e a da direita 0,001%.

Referências Bibliográficas

ALBERTON, D. **Produção de Lipases por Fermentação no Estado Sólido Visando à Aplicação no Tratamento de Efluente de Laticínios**. 2009. 170 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n.1, p.146-156, 2004.

FARIA, L. A. **Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido**. 2010. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FREIRE, D. M. G. **Seleção de microorganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. 1996 174 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2001. 131 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KOUKER, G. L.; JAEJER, K. E. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, Nova Orleans, v. 53, p. 211-213, 1987.

LOCK, L. L. **Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* B181**. 2007. 125 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

OLIVEIRA, D. T. M. **Lipase extracelular de fungo filamentosso: isolamento e caracterização parciais**. 2000. 152 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS, M. M.; AMAZONAS M. A. L. A.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Seleção de Macrofungos Produtores de Lipases e Proteases. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

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

YOSHIOKA, C. C.; MEIRA, J. E.; ESPÓSITO, E. Estudo de um Consórcio Microbiano no Tratamento de Efluentes Frigoríficos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2009, Mogi das Cruzes, SP. [**Anais...**] Mogi das Cruzes: Universidade de Mogi das Cruzes, 2009.

Comunicado Técnico, 05

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroenergia
Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB s/n,
Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4246
Fax: (61) 3448-1589
E-mail: sac.cnpae@embrapa.br
www.cnpae.embrapa.br

1ª edição 2010

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Secretária-Executiva: Rachel Leal da Silva.
Membros: Betânia Ferraz Quirino, Daniela Garcia Collares, Esdras Sundfeld.

Expediente

Supervisão editorial: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Revisão de texto: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Editoração eletrônica: Maria Goreti Braga dos Santos.
Normalização bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado.