

## Introdução: Contexto e Motivação

O VIM, Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (INMETRO, 2005a), define metrologia como sendo a “ciência da medição, a qual abrange todos os aspectos teóricos e práticos relativos às medições, qualquer que seja a incerteza, em quaisquer campos da ciência ou da tecnologia.” Pode-se dizer, então, que a metrologia baseia-se em princípios práticos que podem ser aplicados para qualquer tipo de medição, não sendo restrita a medições com pequenas incertezas, nem à aplicações específicas (Moscati, 2005).

O campo das ciências biológicas vem merecendo atenção dos metrologistas e, por isto, uma área que está sendo desenvolvida dentro da metrologia é a biometrologia, onde medições biológicas estão envolvidas. Dentre as diversas aplicações da biometrologia destacam-se os diagnósticos clínicos, a medicina forense, o uso de alimentos geneticamente modificados e regulamentações comerciais.

As atividades em biometrologia são bastante recentes. Em 1999, a comunidade metrológica internacional, considerando a crescente importância da biotecnologia, a necessidade de se realizar medições exatas rastreáveis ao SI e a carência de infra-estrutura adequada para garantir esta rastreabilidade, adotou, através da 21ª Conferência Geral de Pesos e Medidas (CGPM), uma resolução em biometrologia, recomendando aos laboratórios nacionais que (a) considerassem programas de desenvolvimentos relacionados a medições de grandezas importantes em biotecnologia, e (b) colaborassem com a comunidade científica internacional e com outras organizações internacionais interessadas em estabelecer uma adequada infra-estrutura para garantir a rastreabilidade ao SI das medições em biotecnologia (Partis e col., 2002).

Posteriormente, um grupo de trabalho em biometrologia foi estabelecido pelo Comitê Consultivo para Quantidade de Matéria (CCQM), reunindo-se pela primeira vez em 2000, com o objetivo de discutir dois aspectos importantes e considerados prioritários: (a) o desenvolvimento de métodos e procedimentos para a provisão de padrões e materiais de referência biológicos e (b) a aplicação da biometrologia nas medições de DNA e proteínas (Partis e col., 2002). Entretanto,

a infra-estrutura para a biometrologia ainda é insuficiente e assim como nas medições químicas, conceitos e procedimentos para a introdução dos princípios metrológicos nesta nova área precisam ser difundidos. O estabelecimento de uma infra-estrutura de medição que facilite a rastreabilidade através do fornecimento de métodos e padrões primários, e a confiabilidade metrológica dos processos biotecnológicos, aumentaria a qualidade e a comparação internacional das medidas chaves em biometrologia.

Entre as inúmeras moléculas que se tornaram alvo da biometrologia pode-se mencionar as proteínas, como lipases por exemplo, que serão objeto de estudo neste trabalho. Tais enzimas podem ser encontradas em animais, plantas e microrganismos como bactérias, fungos e leveduras. O interesse na produção de lipases microbianas tem aumentado nas últimas décadas, devido ao seu alto potencial em aplicações industriais, como aditivos em alimentos (modificação de sabor), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de água (decomposição e remoção de substâncias oleosas), cosméticos (remoção de lipídios), fins farmacêuticos (digestão de óleos e gorduras), couro (remoção de lipídeos da pele de animais) e fins biomédicos (análise de triglicerídeos no sangue, etc). Campos promissores para a aplicação de lipases incluem a biodegradação de plásticos, tais como polihidroxialcanoatos (PHA) e policaprolactona (PCL), e a resolução de misturas racêmicas para produzir compostos opticamente puros. Estas enzimas atuam como catalisadores em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, e são capazes de manter suas estruturas e atividades em solventes orgânicos. Finalmente, as lipases possuem inúmeras vantagens em relação aos catalisadores químicos, como por exemplo especificidade pelo substrato, condições brandas de temperatura e pressão requeridas nas reações em que atuam e maior estabilidade (Burket e col., 2004).

As leveduras têm sido reportadas como boas produtoras de lipases, apresentando algumas vantagens em sua utilização. Estes microrganismos, na sua maioria, não são patogênicos e muitas cepas são reconhecidas como seguras (*GRAS Status – generally recognized as safe*), apresentam menor tempo de geração que os fungos filamentosos e o cultivo pode ser controlado através de técnicas simples (Perreira-Meirelles e col., 1997). Leveduras não-convencionais, como por exemplo *Yarrowia lipolytica*, encontradas em diversos ambientes, vêm

sendo empregadas. Seu metabolismo e suas características não peculiares despertaram o interesse de cientistas no mundo inteiro, seja pelo seu interesse científico (para estudos de dimorfismo), seja porque podem ser utilizadas em diversas aplicações tais como obtenção de produtos de interesse econômico (ácido cítrico, enzimas, proteínas heterólogas etc.), meio ambiente (tratamento de efluentes, etc.), entre outras (Alonso e col., 2005).

Por ser um processo associado ao crescimento, a produção de lipases por microrganismos depende de inúmeras variáveis de processo, como temperatura, pH, concentração da fonte de carbono e de nitrogênio, inóculo entre outras. O método clássico de estudo de um processo que envolve a análise de uma variável por vez pode ser efetivo em algumas situações, mas demanda muito tempo e falha ao considerarmos o efeito combinado dos diferentes fatores envolvidos. Nos processos onde há interação relevante entre as variáveis e a influência de cada uma é importante, é essencial estabelecer um método que considere estas interações, e otimize as condições experimentais para obtenção de melhores resultados. Modelos empíricos e análises estatísticas são extremamente importantes para elucidar mecanismos básicos em situações complexas como estas, fornecendo assim melhores entendimento e controle sobre o processo (Elibol e Ozer, 2002).

Apesar de muitos trabalhos relatarem a produção de lipases, trabalhos de planejamento experimental que permitem a avaliação das diferentes variáveis e a otimização do processo produtivo ainda são poucos. A avaliação metrológica com a estimativa da incerteza de medição da atividade lipásica nunca são mencionados. Portanto, dentro do contexto apresentado, este trabalho tem como objetivos a otimização da produção de lipases por células de *Y. lipolytica* através do planejamento experimental e a avaliação metrológica do processo. A confiabilidade metrológica das medições será garantida através da calibração e/ou verificação de todos os equipamentos que afetem os resultados, estabelecendo-se a rastreabilidade, sempre que possível, às unidades de medida do Sistema Internacional de Unidades (SI). Os efeitos de três variáveis com vistas a produção de lipases serão analisados: a concentração de carbono, a concentração de nitrogênio e a concentração inicial de células (inóculo). Sugere-se a que a lipase produzida seja utilizada como material de referência certificado, após estudos

posteriores de purificação e estabilidade da enzima, sendo uma alternativa viável quanto comparada com aquelas disponíveis comercialmente.