

2

Conceitos Teóricos e Revisão Bibliográfica

2.1

Conceitos metrológicos

A seguir serão apresentados os conceitos metrológicos utilizados durante este trabalho, segundo o VIM (INMETRO, 2005a) e o Guia para Expressão da Incerteza de Medição (GUM) (INMETRO, 2003a).

- Medição (VIM 2.1)

Conjunto de operações que tem por objetivo determinar um valor de uma grandeza.

- Método de medição (VIM 2.4)

Seqüência lógica de operações, descritas genericamente, usadas na execução das medições.

- Mensurando (VIM 2.6)

Objeto da medição. Grandeza específica submetida à medição.

- Resultado de uma medição (VIM 3.1)

Valor atribuído a um mensurando obtido por medição.

- Exatidão de medição (VIM 3.5)

Grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro do mensurando.

- Repetitividade (VIM 3.6)

Grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições de medição.

- Reprodutibilidade (VIM 3.7)

Grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando efetuadas sob condições variadas de medição (operadores, equipamentos e laboratórios).

- Desvio Padrão Experimental (VIM 3.8)

Para uma série de “n” medições de um mesmo mensurando, a grandeza “s”, que caracteriza a dispersão dos resultados, é dada pela fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 2.1})$$

Onde i representa o resultado da “iésima” medição e $\bar{x}$ representa a média aritmética dos “n” resultados considerados.

A Equação 2.2 é uma estimativa do desvio padrão da distribuição de $\bar{x}$ e é denominada desvio padrão experimental da média; por conveniência é por vezes considerado como incerteza padrão do Tipo A.

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 2.2})$$

- Incerteza de medição (VIM 3.9)

Parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentalmente atribuídos a um mensurando^{1, 2, 3}.

NOTAS:

1. O parâmetro pode ser, por exemplo, um desvio padrão (ou um múltiplo dele), ou a metade de um intervalo correspondente a um nível da confiança estabelecido.
2. A incerteza de medição compreende, em geral, muitos componentes. Alguns destes componentes podem ser estimados com base na distribuição estatística dos resultados das séries de medições e podem ser caracterizados por desvios padrão experimentais. Os outros componentes, que também são caracterizados por desvios padrão, são avaliados por meio de distribuição de probabilidades assumidas, baseadas na experiência ou em outras informações.
3. Entende-se que o resultado da medição é a melhor estimativa do valor do mensurando, e que todos os componentes da incerteza, incluindo aqueles resultantes dos efeitos sistemáticos, como os componentes associados com correções e padrões de referência, contribuem para a dispersão.

- Incerteza padrão (u) (GUM 2.3.1)

Incerteza do resultado de uma medição expressa como um desvio padrão.

- Avaliação da incerteza Tipo A (GUM 2.3.2)

Método de avaliação da incerteza pela análise estatística de série de observações.

- Avaliação da incerteza Tipo B (GUM 2.3.3)

Método de avaliação da incerteza por outros meios que não a análise estatística de série de observações.

A magnitude da contribuição Tipo B é avaliada por julgamento científico, baseando-se em todas as informações disponíveis sobre a possível variabilidade da grandeza medida. O conjunto de informações pode incluir:

- modelos matemáticos;
- dados de medições prévias;
- a experiência ou o conhecimento geral do comportamento e propriedades de materiais e instrumentos relevantes;
- especificações do fabricante;
- comparações interlaboratoriais;
- dados fornecidos em certificados de calibração e outros certificados;
- incertezas relacionadas a dados de referência extraídos de manuais.

- Incerteza padrão combinada (u_c) (GUM 2.3.4)

Incerteza padrão do resultado de uma medição, quando este resultado é obtido por meio de valores de várias outras grandezas, sendo igual à raiz quadrada positiva de uma soma de termos, que constituem as variâncias ou covariâncias destas outras grandezas, ponderadas de acordo com quanto o resultado da medição varia com mudanças nestas grandezas.

- Incerteza expandida (U) (GUM 2.3.5)

Grandeza que define um intervalo em torno do resultado de uma medição com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição de valores que possam ser razoavelmente atribuídos ao mensurando.

- Fator de abrangência (k) (GUM 2.3.6)

Fator numérico utilizado como um multiplicador da incerteza padrão combinada de modo a obter uma incerteza expandida.

- Graus de liberdade (ν) (GUM C.2.31)

Em geral, corresponde ao número de termos em uma soma menos o número de restrições aos termos da soma.

- Padrão (VIM 6.1)

Medida materializada, instrumento de medição, material de referência ou sistema de medição destinado a definir, realizar, conservar ou reproduzir uma unidade ou um ou mais valores de uma grandeza para servir como referência.

- Padrão Internacional (VIM 6.2)

Padrão reconhecido por um acordo internacional para servir, internacionalmente, como base para estabelecer valores de outros padrões da grandeza a que se refere.

- Padrão Nacional (VIM 6.3)

Padrão reconhecido por uma decisão nacional para servir, em um país, como base para atribuir valores a outros padrões da grandeza a que se refere.

- Padrão Primário (VIM 6.4)

Padrão que é designado ou amplamente reconhecido como tendo as mais altas qualidades metrológicas e cujo valor é aceito sem referência a outros padrões da mesma grandeza.

- Padrão Secundário (VIM 6.5)

Padrão cujo valor é estabelecido por comparação a um padrão primário da mesma grandeza.

- Padrão de Referência (VIM 6.6)

Padrão, geralmente tendo a mais alta qualidade metrológica disponível em um dado local ou em uma dada organização, a partir do qual as medições lá executadas são derivadas.

- Padrão de Trabalho (VIM 6.7)

Padrão utilizado rotineiramente para calibrar ou controlar medidas materializadas, instrumentos de medição ou materiais de referência.

- Rastreabilidade (VIM 6.10)

Propriedade do resultado de uma medição ou do valor de um padrão estar relacionado a referências estabelecidas, geralmente a padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia contínua de comparações, todas tendo incertezas estabelecidas.

- Calibração (VIM 6.11)

Conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição ou sistema de medição ou valores representados por uma medida materializada ou um material de referência, e os valores correspondentes das grandezas estabelecidos por padrões.

- Verificação

Conjunto de operações necessárias para assegurar que um instrumento de medição atende aos requisitos do uso pretendido. Em alguns casos, a verificação é aceita em substituição à calibração, entretanto possui menor rigor metrológico. Um instrumento de medição pode ser calibrado e verificado periodicamente para garantir o “status” da calibração (ABNT, 2005).

O conceito de verificação aqui apresentado é aplicável aos requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005) e do manual Habilitação para

Laboratórios de Microbiologia (ANVISA, 2006). O Vocabulário Internacional de Termos de Metrologia Legal (INMETRO, 2005b) apresenta uma definição pertinente à Metrologia Legal e diferente da utilizada neste trabalho.

- Material de Referência (VIM 6.13)

Material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais.

- Material de Referência Certificado (VIM 6.14)

Material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificados por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido.

2.2

Fundamentos de metrologia

A comunidade metrológica internacional tem um longo histórico. Em 1875, um tratado diplomático, a Convenção do Metro, foi assinado por 17 países em Paris, iniciando assim as atividades internacionais com o objetivo de prover acesso à comparação de medições de todos os tipos entre os seus membros e estabelecendo uma estrutura permanente para um comum acordo em relação às unidades de medição. A Convenção do Metro, estabeleceu a Conferência Geral de Pesos e Medidas (CGPM), o Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM) e o Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM), dando a estes autoridade para agir em assuntos relacionados à metrologia internacional. Atualmente, a Convenção do Metro possui 51 países como membros, entre eles o Brasil.

A estrutura metrológica internacional é apresentada na Figura 2.1. Sob os termos da Convenção do Metro, o BIPM opera com a supervisão exclusiva do CIPM, o qual está sob autoridade da CGPM. A CGPM elege os membros do CIPM, os quais são representantes de países do mundo todo. Além disso, Comitês

Consultivos (CC) foram criados pelo CIPM, cujos membros são instituições de países membros da Convenção do Metro, reconhecidos como os mais experientes em cada área. Atualmente existem 10 Comitês Consultivos em atuação.

Na ocasião da 11ª CGPM em 1960, o Sistema Internacional de Unidades (SI) foi estabelecido, sendo composto por sete unidades de base as quais são largamente empregadas em medições físicas e químicas (metro, quilograma, segundo, ampere, kelvin, mol e candela) – cabe aqui ressaltar que o mol só foi introduzido em 1971. O SI surgiu da necessidade de se ter um sistema de unidades de medidas conhecidas e aceitas internacionalmente.

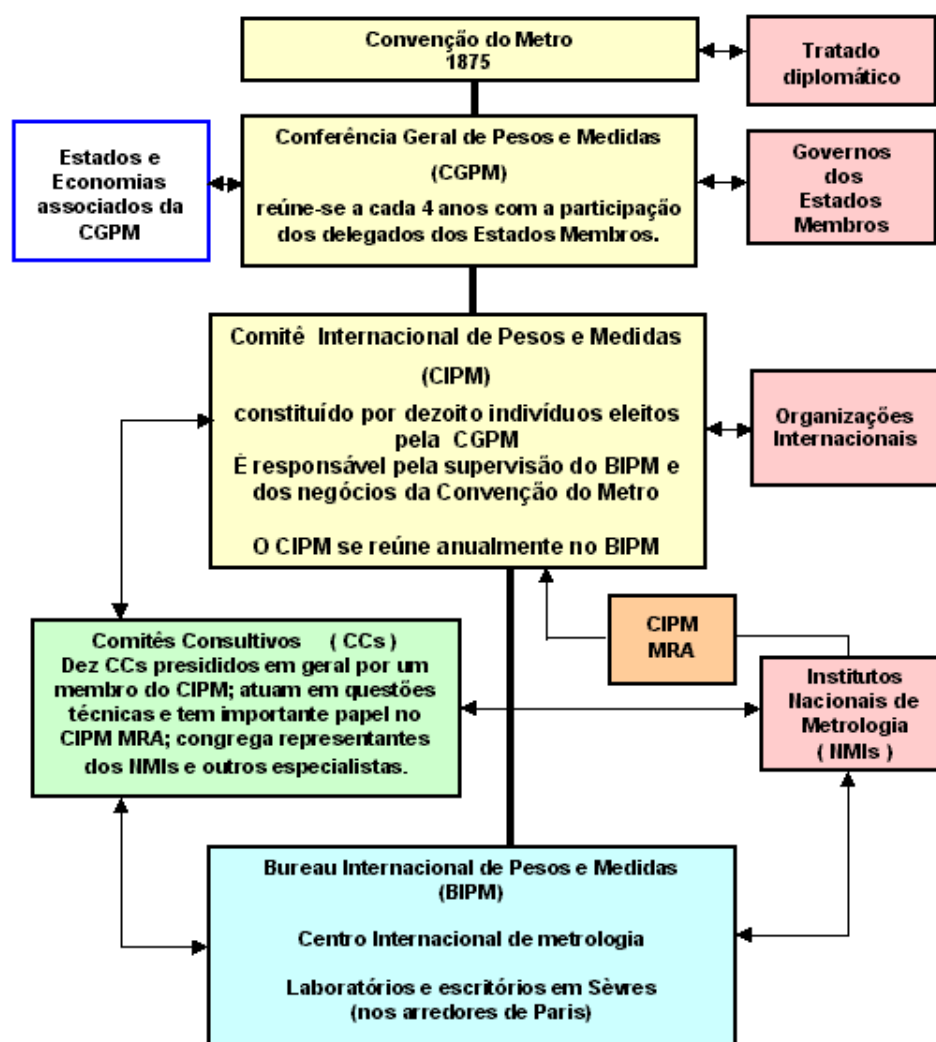


Figura 2.1 - Estrutura Metrológica Internacional (Fonte: INMETRO, 2006a)

As definições fundamentais das unidades de medida do SI constituem o ápice da pirâmide que compõe a hierarquia do sistema metrológico (Figura 2.2).

Adjacente ao topo desta pirâmide, situa-se o BIPM, responsável pela prática da metrologia de maior exatidão. Entre outras funções, compete ao BIPM a guarda dos padrões internacionais de medida e a disseminação das unidades SI aos Institutos Nacionais de Metrologia (NMIs) dos países signatários da Convenção do Metro. Por sua vez, cabe aos NMIs a guarda dos padrões nacionais e a disseminação (referenciada aos padrões internacionais) das unidades SI para os padrões de referência dos laboratórios de calibração e ensaio de seus respectivos países. Através do Acordo de Reconhecimento Mútuo (MRA), a equivalência metrológica entre padrões nacionais de medição e certificados de calibração emitidos pelos NMIs é estabelecida. Atingindo a base da pirâmide hierárquica,



Figura 2.2 - Hierarquia do Sistema Metrológico (Fonte: INMETRO, 2006b)

encontram-se os padrões de trabalho dos laboratórios de chão de fábrica, cuja calibração advém dos padrões de referência dos laboratórios de calibração (Frota e Ohayon, 1998). Este é o fundamento hierárquico que estabelece um amplo e preciso senso de rastreabilidade, essencial à qualidade de uma medição e à comparação de resultados.

Embora os princípios metrológicos estejam sendo bem desenvolvidos para aplicações nas ciências físicas e na engenharia, é fato que alguns dos maiores desafios para a metrologia ocorrem nas medições de grandezas químicas e biológicas (Kaarls e Milton, 2004). As medições destas grandezas têm impacto não somente em aspectos comerciais, como também na qualidade de vida da

sociedade. Com isso, a química e a biologia podem ser considerados campos promissores para o desenvolvimento da metrologia no século XXI.

2.2.1

Metrologia química

O conceito de metrologia química como uma parte da metrologia foi introduzido na década de 90. A metrologia aplicada à química envolve um campo bastante amplo e complexo de atuação, considerando-se a gama enorme de materiais, elementos químicos, unidades de concentrações, técnicas de análises, padrões e referências. As medições nesta área necessitam de um entendimento profundo de todas as variáveis envolvidas e a verificação da adequação à química dos diferentes conceitos metrológicos já estabelecidos (Ponçano e col., 2006).

A metrologia química vem merecendo, há algum tempo, grande destaque nos órgãos nacionais e internacionais ligados à metrologia. Em 1990, foram fundados na Europa a EURACHEM (*A Focus for Analytical Chemistry in Europe*) e o CITAC (*Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry*), com o objetivo de permitir a comparação e a rastreabilidade das medições analíticas. Em 1993, o BIPM, reconhecendo a necessidade de desenvolver uma infra-estrutura internacional para o campo das medições químicas, estabeleceu o Comitê Consultivo para Quantidade de Matéria (CCQM) (Oliveira, 2005). No Brasil, em 1998, foi criado o Programa Brasileiro de Metrologia em Química (PBMQ), coordenado pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e no ano 2000 foi criada uma Divisão no Inmetro para atuar nesta área. O PBMQ constitui-se em um conjunto de ações direcionadas a propiciar ao País uma sólida base metrológica em química, compreendendo conceitos e práticas mundialmente adotados, importantes para a obtenção de resultados confiáveis em apoio ao comércio e ao bem estar social, através do uso e fortalecimento das competências técnico-científicas brasileiras (Ponçano e col., 2006).

Conforme citado em Cuadros-Rodríguez e col. (2001), Valcárcel e col. (1999) reportaram que processos de medição químicos (PMQ) e processos de medição físicos (PMF) diferem em alguns aspectos práticos, tais como:

- A maioria dos PMQ requer um pré-tratamento da amostra a ser analisada, introduzindo assim novas fontes de incerteza no resultado final. Esta etapa preliminar não está presente na maioria dos PMF;
- A qualidade das medições dos PMQ depende não somente dos instrumentos utilizados, como nos PMF, mas também de fatores adicionais;
- Existem poucos materiais de referência certificados (MRC) disponíveis em química, em contraste com os muitos existentes em física;
- A maioria dos padrões nos PMF é utilizada em uma única etapa, que consiste na calibração do equipamento, enquanto que nos PMQ os padrões podem ser utilizados em outras etapas;
- A incerteza nas medições químicas não pode ser estimada somente a partir das recomendações aplicadas nas medições físicas devido às diferenças encontradas entre as componentes das duas grandezas.

Alguns autores (Muijlwijk, 1999 em Cuadros-Rodríguez e col., 2001) julgam que estas diferenças são apenas superficiais e não fundamentais, e por isso a metrologia pode ser aplicada em todos os campos da ciência. Entretanto, observando os crescentes esforços feitos nos últimos anos para se alcançar a rastreabilidade nos resultados das medições químicas, as diferenças inerentes entre as propriedades das medições físicas e químicas devem ser levadas em consideração.

A Rastreabilidade e o Sistema Internacional de Unidades em Química

A contínua globalização do comércio e da economia requer que os resultados de medições sejam confiáveis, rastreáveis e comparáveis. Em todos os setores, o conceito “uma vez testado, aceito em qualquer lugar”, vem ganhando cada vez mais importância, motivo da crescente necessidade de resultados de medições confiáveis que possam ser comparadas em qualquer lugar e a qualquer tempo (EURACHEM/CITAC, 2003). Portanto, a cadeia de rastreabilidade torna-se cada vez mais importante em todas as áreas e não é diferente na área das medições químicas.

Como dito anteriormente, apesar do SI ter sido estabelecido em 1960, apenas em 1971, o mol foi adotado pela 14ª CGPM (Resolução 3) como a sétima unidade de base do SI e definido da seguinte forma: “O mol é a quantidade de matéria de um sistema contendo tantas entidades elementares quantos átomos existem em 0,012 quilograma de carbono 12.” A seguinte recomendação também era dada pela Resolução 3: “Quando se utiliza o mol, as entidades elementares devem ser especificadas, podendo ser átomos, moléculas, íons, elétrons, assim como outras partículas, ou agrupamentos especificados em tais partículas.” Posteriormente, em 1980, o CIPM aprovou um relatório do Comitê Consultivo das Unidades (CCU) com a seguinte determinação: “Na definição do mol, entende-se que se faz referência aos átomos de carbono 12 livres, em repouso e no seu estado fundamental.” (INMETRO 2003b).

Devido à grande variedade e complexidade das matrizes químicas, o estabelecimento da rastreabilidade no campo da análise química é um pouco mais difícil do que em outras áreas da metrologia, sendo que nem sempre é possível que a cadeia de rastreabilidade possa chegar ao mol (Richter e Guttler, 2003).

Quando a rastreabilidade ao SI não é possível, as referências devem ser buscadas por meio de recursos como materiais de referência certificados, métodos e padrões consensados, além da participação em programas de comparações interlaboratoriais (Carvalho, 2005). Assim, se os padrões são rastreáveis ao SI, então os resultados das medições também são rastreáveis.

2.2.2 Biometrologia

Ao contrário da química, onde o comportamento de uma molécula pode ser muitas vezes entendido através da estrutura atômica, a operação de sistemas biológicos não pode ser prontamente determinada pela estrutura molecular. Além disso, moléculas biológicas podem ocorrer em misturas heterogêneas, onde cada uma possui uma atividade diferente, dificultando análises e medições (Milton e O'Connor, 2004).

A relevância da biometrologia é bem evidenciada na área da saúde, onde os pacientes em tratamento médico devem estar seguros de que os testes a que foram submetidos tenham resultados exatos e que as dosagens dos fármacos

estejam corretas. Um exemplo prático da importância da aplicação dos preceitos metrológicos pode ser visualizado em resultados de análises clínicas. Estes resultados constituem-se em indicadores fundamentais, servindo de base para diagnósticos, que definem tratamentos médicos decisivos para a saúde do paciente. Resultados falso-positivos levam a tratamentos desnecessários e a outras inter-relações possíveis; enquanto que resultados falso-negativos podem levar a tratamentos terapêuticos indevidos e até mesmo ao não tratamento, podendo gerar situações fisiológicas irreversíveis (Ponçano e col., 2006).

Adicionalmente, existem casos de doenças que não apresentam sintomas clínicos característicos, nas quais os resultados laboratoriais são decisivos. Um exemplo típico é o das hipercalcemias (altos níveis de cálcio no soro) que podem ser causadas por hipertireoidismo e por doença maligna. Segundo Gallaher e col. (2003) em Ponçano e col. (2006), neste caso em particular, foram feitos alguns levantamentos do aspecto econômico, os quais demonstraram que o impacto oriundo da redução do nível de incertezas das medições envolvidas, de 0,5 mg/dL para 0,1 mg/dL, foi bastante significativo, reduzindo os gastos anuais com tratamento de US\$ 1,3 bilhão para US\$ 0,4 bilhão.

Outro exemplo prático da aplicação da biometrologia está no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de determinadas doenças. Grandes avanços nesta área têm sido obtidos pelo conhecimento do proteoma humano, que compreende mais de meio milhão de proteínas, sendo que, deste total, apenas 30% têm a função conhecida. As proteínas estão envolvidas na maioria dos processos fisiológicos, e o mau funcionamento das mesmas, muitas vezes, está associado com o desenvolvimento de doenças. Um enorme grupo de pesquisadores tem estudado a separação e a identificação de proteínas, bem como a caracterização de suas estruturas, funções e atividades. O comportamento de uma proteína é influenciado não somente pela sequência dos aminoácidos que a compõe (estrutura primária), mas também pelo arranjo espacial dos aminoácidos próximos entre si em α -hélice ou folha- β (elementos da estrutura secundária), pelas interações das diversas α -hélices e folhas pregueadas (estrutura terciária) e finalmente pelas interações entre as subunidades protéicas (estrutura quaternária). Apesar de diversas proteínas serem usadas de forma regulamentar em produtos biofarmacêuticos, existe pouca rastreabilidade entre os resultados das técnicas de medição disponíveis para a determinação destas estruturas. (Kaarls, 2004).

A comparação dos resultados obtidos em biotecnologia ainda é insatisfatória: muitos laboratórios não estão certos de que seus próprios métodos conduziram aos mesmos resultados publicados por outros (Kirsop, 2003). A principal explicação para este fato pode estar na dificuldade em se estabelecer a rastreabilidade ao SI. Enquanto os materiais de referência em química podem ser definidos em termos de mol, o mesmo nem sempre é possível para preparações biológicas onde a atividade precisa também ser considerada (Dybkaer, 1996 em Partis e col., 2002).

Em alguns casos, a atividade pode ser definida em termos de unidades universais não rastreáveis às unidades SI. Segundo Partis e col. (2002), Preparações Biológicas Internacionais de Referência garantem a uniformidade na designação de atividade de substâncias biológicas quando não é possível que estas sejam expressas em termos de grandezas físicas ou químicas. O *Expert Committee on Biological Standardization* da Organização Mundial de Saúde (OMS) considera Preparações Biológicas Internacionais de Referência como padrões de referência primários destinados para o uso na calibração das atividades de padrões de referência secundários com o objetivo de definir uma unidade acordada internacionalmente, permitindo assim a comparação de medições biológicas mundialmente (Partis e col., 2002).

Conforme Dybkaer e Storrington (1995) em Partis e col. (2002), a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) recomendam o uso da unidade SI (mol) com os padrões biológicos propostos pela OMS sempre que possível. Nas situações onde o mol não puder ser usado, estas entidades recomendam que seja feita uma descrição da grandeza utilizada e que uma referência ao padrão e ao método utilizado seja incluída.

No caso específico de enzimas, estas são medidas, de uma maneira geral, através de suas atividades catalíticas e os resultados de tais determinações são expressos em termos da quantidade de atividade presente em determinado volume ou massa da amostra. De um modo geral, a unidade de atividade é a medida da velocidade em que a reação se realiza, por exemplo, a quantidade de substrato consumido ou a quantidade de produto formado em uma unidade de tempo. De acordo com a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB), uma unidade de enzima – Unidade Internacional (U) – é a quantidade de

enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato por minuto, nas condições de ensaio (1 Unidade Internacional (U) = 1 μ mol/min). Portanto, a atividade catalítica não se refere à quantidade ou ao peso da enzima, porque muitas enzimas ainda não foram purificadas.

A atividade específica é entendida como sendo a atividade por unidade de peso da proteína, ou em alguns processos, por unidade de peso da biomassa que a produziu. Nos fluidos biológicos, as atividades catalíticas são, em geral, referidas para unidades de volume (mililitro ou litro). Por esta razão são expressas em mU/mL ou U/L (Ponçano e col., 2006). Entretanto, a IUB e a IUPAC recomendam que a atividade catalítica seja expressa em mol/s, respeitando o SI. Esta unidade é denominada katal (kat). A dosagem enzimática então deve ser expressa em katal por litro (kat/L). Na prática, utiliza-se o microkat (μ kat) ou o nanokat (nkat). A relação entre a unidade internacional (U) e a unidade catalítica (kat), após algumas transformações, é dada por:

$$1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkat}$$

Além das Preparações Biológicas Internacionais de Referência recomendadas pela OMS, Férard e col.(1998) reportaram que muitos materiais de referência certificados (MRC) para enzimas já estão disponíveis comercialmente. A maioria destes MRC é produzida pelo *Community Bureau of Reference* (BCR) e certificados através de métodos publicados pela IFCC. O custo com a produção dos MRC é bastante alto e os mesmos estão disponíveis em quantidades limitadas. Sendo assim, outros materiais com um nível metrológico inferior, tais como padrões secundários podem ser validados com um MRC através de um método referenciado ou validado e posteriormente ser usado para validar um padrão de trabalho. Este último poderá ser usado para determinar os valores da composição de uma amostra. Com isso, os valores podem ser obtidos com exatidão seguindo um protocolo bem definido envolvendo uma cadeia de rastreabilidade (Figura 2.3).

Para a lipase, o BCR produz e comercializa os materiais de referência BCR-693 (proveniente do suco pancreático humano) e BCR-694 (obtida através de técnicas recombinantes), ao custo de 75 euros por ampola contendo 1 mL de enzima (1732 U/L e 1043 U/L, respectivamente). A produção de MRC

provenientes de outras fontes, como microrganismos, por exemplo, é então justificável, e pode ser uma alternativa mais viável em termos de custo e quantidade disponibilizada.

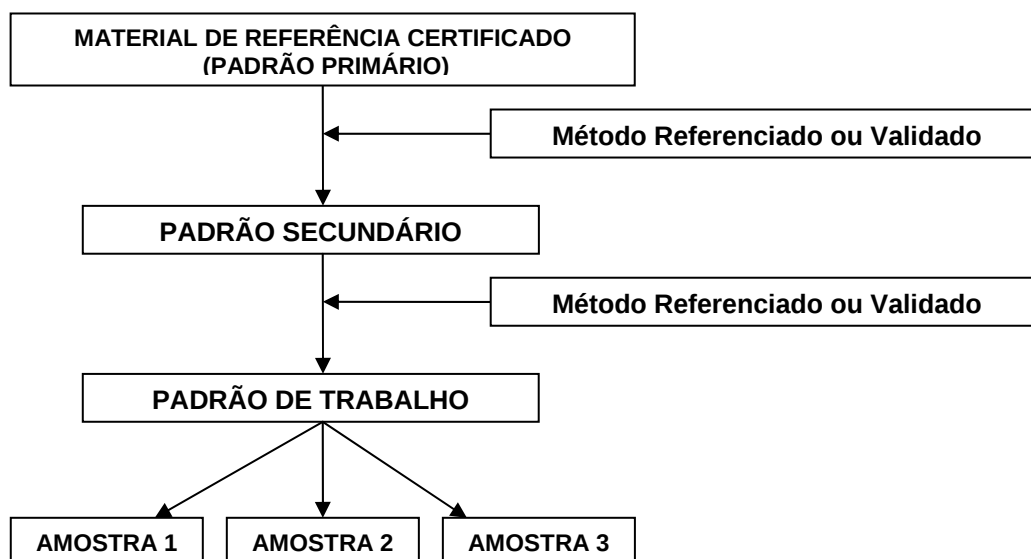


Figura 2.3 - Esquema representativo da hierarquia de materiais de referência para a transferência de exatidão nas medições de enzimas. (Férard e col., 1998)

2.2.3 Estimativa da incerteza de medição

Além da rastreabilidade, outro aspecto metrológico é especialmente significativo em biomedicações para garantia da confiabilidade: a incerteza da medição, já definida anteriormente. Informações sobre a incerteza são necessárias para assegurar que as referências usadas são suficientemente adequadas para o fim a que se propõem, e também para oferecer informação similar ao resultado da medição (EURACHEM/CITAC, 2003).

A abordagem geral para avaliar e expressar a incerteza é aquela baseada nas recomendações do GUM (INMETRO, 2003a). Os componentes individuais da incerteza devem ser identificados e demonstrados como estando sob controle, com avaliação de sua contribuição para a variabilidade dos resultados. No caso de ensaios biotecnológicos, é geralmente apropriado basear a estimativa da incerteza somente em dados de repetitividade e reprodutibilidade. Entretanto, alguns componentes, como por exemplo, efeito da pipetagem, pesagem e diluição, podem

ser prontamente medidos e facilmente avaliados para demonstrar uma contribuição muitas vezes desprezível à incerteza total (ANVISA, 2006).

Na maioria dos casos, o mensurando não é medido diretamente, mas é determinado por “N” grandezas de entrada, ou grandezas de influência, $X_1, X_2, \dots, X_N$, através da relação funcional:

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N) \quad (\text{Equação 2.3})$$

As grandezas de entrada $X_1, X_2, \dots, X_N$, são consideradas variáveis aleatórias e podem ser determinadas diretamente durante a medição ou trazidas de fontes externas.

Uma estimativa do mensurando (y) é obtida da Equação 2.3, utilizando-se as estimativas das grandezas de entrada $x_1, x_2, \dots, x_N$. A saída y é tomada como a média aritmética de “n” determinações independentes de y , como também das grandezas de entrada x_i .

Se a estimativa de y é obtida usando as médias das determinações das grandezas de entrada, ou de grandezas de influência, tem-se o seguinte modelo:

$$y = f(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_n) \quad (\text{Equação 2.4})$$

A estimativa do desvio padrão associado da saída y , incerteza padrão combinada $u_c(y)$, é obtida a partir dos desvios padrões estimados de cada grandeza de entrada x_i , $u(x_i)$.

Cada incerteza padrão $u(x_i)$ pode ser estimada de duas maneiras:

- avaliação do Tipo A, baseada num conjunto de observações de x_i , através de um tratamento estatístico;
- avaliação do Tipo B, através de outros meios que não dependem de um conjunto de observações.

Deve-se expressar todas as componentes de $u(x_i)$, tipos A e B, correspondentes a um desvio padrão. Para isto, divide-se o valor (a_i) de cada contribuição de incerteza pelo seu respectivo divisor, correspondente à uma distribuição de probabilidade atribuída.

2.2.3.1

Avaliação do Tipo A da incerteza padrão

Quando são executadas medições da grandeza X_i sob condições de repetitividade, a Equação 2.5 representa a avaliação da incerteza padrão de uma medição da grandeza X_i e a Equação 2.6 é a avaliação da incerteza padrão da média das “n” medições repetidas da grandeza X_i

$$u(x_i) = s(x_i) \quad (\text{Equação 2.5})$$

$$u(\bar{x}_i) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 2.6})$$

2.2.3.2

Avaliação do Tipo B da incerteza padrão

A avaliação do Tipo B pode ser feita assumindo-se que X_i tem uma determinada distribuição e um intervalo de dispersão. As distribuições mais comuns são retangular, triangular e normal.

Assumindo-se uma distribuição retangular, a incerteza padrão é dada pela Equação 2.7; no caso de uma distribuição triangular é dada pela Equação 2.8.

$$u(x_i) = \frac{a_i}{\sqrt{3}} \quad (\text{Equação 2.7})$$

$$u(x_i) = \frac{a_i}{\sqrt{6}} \quad (\text{Equação 2.8})$$

Informações sobre qual destas duas distribuições assumir em cada caso são obtidas no GUM (INMETRO, 2003a).

Quando se dispõe de um certificado de calibração, com informações do nível da confiança e do fator de abrangência (k), assume-se uma distribuição normal e a incerteza padrão é dada pela Equação 2.9, onde $U(x_i)$ é a incerteza expandida declarada.

$$u(x_i) = \frac{U(x_i)}{k} \quad (\text{Equação 2.9})$$

2.2.3.3

Determinação da incerteza padrão combinada ($u_c(y)$)

A incerteza padrão combinada é calculada através da Equação 2.10:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial x_i} \right]^2 \times u^2(x_i) = \sum_{i=1}^N c_i^2 \times u^2(x_i) \quad (\text{Equação 2.10})$$

onde c_i é o coeficiente de sensibilidade do mensurando y em relação à uma grandeza de entrada X_i o qual estima a variação do mensurando devido à uma variação na grandeza de entrada, e pode ser calculado pela Equação 2.11:

$$c_i = \frac{\partial \mathcal{F}(x_i)}{\partial x_i} = \frac{\partial \mathcal{F}}{\partial x_i} \quad (\text{Equação 2.11})$$

2.2.3.4

Fator de abrangência (k) e número de graus de liberdade efetivos (ν_{eff})

Quando são realizadas muitas medições, geralmente $n > 30$, de um mesmo mensurando, os resultados se aproximam muito de uma distribuição normal. Entretanto, como nem sempre esse número é possível, a aproximação a uma distribuição normal é feita aplicando um fator (t_p) de correção da distribuição t-Student. Para se obter o fator t_p , é necessário determinar o número de graus de liberdade efetivo da distribuição.

O número de graus de liberdade efetivos da incerteza padrão combinada é estimado pela Equação de Welch-Satterthwaite (Equação 2.12):

$$\nu_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{(u(x_i) \times c_i)^4}{\nu_i}} \quad (\text{Equação 2.12})$$

onde N é a quantidade de grandezas de entrada e ν_i corresponde ao número de graus de liberdade de cada grandeza X_i de entrada. Se $u(x_i)$ é obtido por meio de uma avaliação do Tipo A, $\nu_i = n-1$. Se $u(x_i)$ é obtido por meio de uma avaliação Tipo B e pode ser tratado exatamente como conhecido, como é o caso na prática, $\nu_i \rightarrow \infty$.

Uma vez determinado o número de graus de liberdade efetivo obtém-se o valor do fator de abrangência ($k = t_p$) através da tabela de distribuição t-student para o nível da confiança p desejado, geralmente 95,45%.

2.2.3.5

Determinação da incerteza expandida (U)

A incerteza pode ser expressa em termos de incerteza padrão combinada, $u_c(y)$, ou de incerteza expandida; neste caso o fator de abrangência também deve ser expresso. Então, a incerteza expandida (U) é dada pela Equação 2.13.

$$U = ku_c(y) \quad (\text{Equação 2.13})$$

Após serem calculados o valor do mensurando y e sua incerteza expandida U , os mesmos deverão ser declarados, por exemplo: $y \pm U$, complementados com informações sobre o valor do fator de abrangência k e seu respectivo nível da confiança. As incertezas são geralmente expressas bilateralmente em termos da unidade do mensurando ou de forma relativa.

2.3

Células de *Yarrowia lipolytica*

Leveduras não-convencionais – capazes de crescer tanto como levedura como em forma de hifas, dependendo das condições de cultivo – têm sido estudadas há muitos anos, incluindo as espécies *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schwanniomyces occidentalis* e *Yarrowia lipolytica* conforme reportado por Buckholz e Gleeson (1991) em Fickers e col. (2005). Entre estas, *Yarrowia lipolytica* foi reconhecida como uma das leveduras mais atrativas, devido à grande versatilidade de aplicações (Muller e col., 1998).

Yarrowia lipolytica é uma levedura do Tipo Ascomiceto, pertencente à família *Dipodascaceae*. Diferente de outras leveduras como *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, não é considerada patogênica pela American Food and Drug Administration (FDA) (Holzschu e col., 1979 em Fickers e col., 2005). A espécie é aeróbica estrita e a maioria das cepas é incapaz de crescer em temperaturas

acima de 32 °C. Em sua revisão sobre *Yarrowia lipolytica*, Fickers e col. (2005) citaram que esta levedura pode ser isolada de substratos ricos em lipídeos e proteínas tais como leites e seus derivados (Vasdinyei e Deák, 2003, Suzzi e col., 2001) ou linguiças (Gardini e col., 2001), além do solo, esgoto e ambientes poluídos com óleo (Kim e col., 1999, Zinjarde e Pant, 2002).

Em meados dos anos 60, o interesse por *Yarrowia lipolytica* era em função de sua habilidade de utilizar substratos hidrofóbicos, especialmente alcanos, para produção de proteínas unicelulares (SCP – “single-cell protein”). Além disso, a produção de metabólitos intermediários, como ácido cítrico e ácido α -cetoglutárico resultou em amplo cultivo em fermentadores usados em larga-escala (Finogenova e col., 2005).

No final dos anos 90 muitos grupos iniciaram estudos de dimorfismo, devido ao fato das células de *Yarrowia lipolytica* serem capazes de crescer tanto como leveduras como em forma de hifas dependendo das condições de crescimento (Herrero e col., 1999).

O desenvolvimento de ferramentas genéticas e a observação de que esta levedura era capaz de expressar e secretar proteínas como proteases, lipases, esterases e RNases, desencadeou uma série de estudos de secreção de proteínas nos laboratórios de Gaillardin (França), Ogrydziak (EUA) e Pfizer (EUA) e mais tarde pelo grupo de Dominguez (Espanha). Estes grupos sugeriram que *Yarrowia lipolytica* poderia ser uma alternativa para a produção de proteínas heterólogas (Fickers e col., 2005, Barth e Gaillardin, 1997). Nicaud e col. (2002) também reportaram que o grande número de marcadores genéticos disponíveis nesta levedura permite o desenvolvimento de eficientes sistemas de produção de proteínas heterólogas.

Além da produção de proteínas heterólogas, de metabólitos importantes, e de estudos de dimorfismo, células de *Yarrowia lipolytica* também têm sido usadas em processos de bioconversão em indústrias químicas e de alimentos, biotransformação de esteróides, produção de aroma e degradação de rejeitos, entre outras (Mauersberger e col., 2001 e Scioli e Vollaro, 1997 em Alonso e col., 2005).

2.4 Lipases

2.4.1 Definição, estrutura e características

Lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres e glicerol (Saxena e col., 2003a) na interface água-lipídeo (Figura 2.4). Na ausência de água ou em condições microaquosas, catalisam a reação reversa de síntese (Kaushik e col., 2006), entre outras (Figura 2.5).

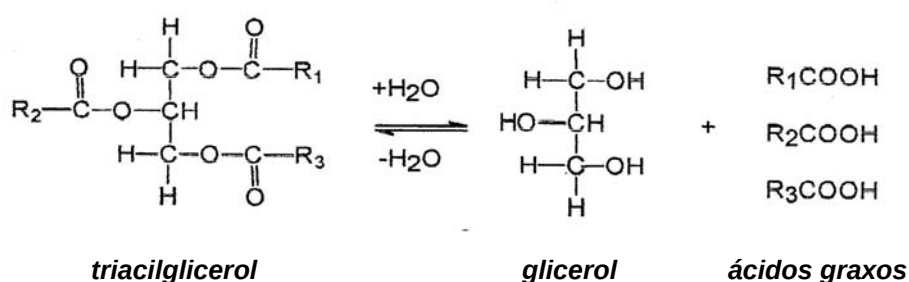
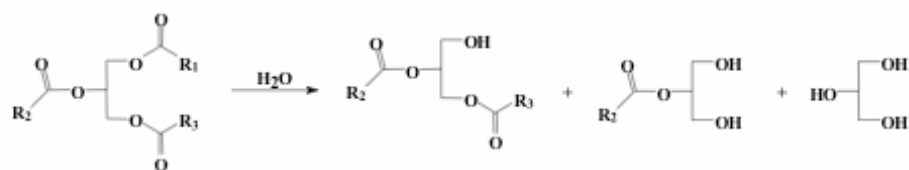


Figura 2.4 - Reação da ação catalítica de lipases (Jaeger e Reetz, 1998)

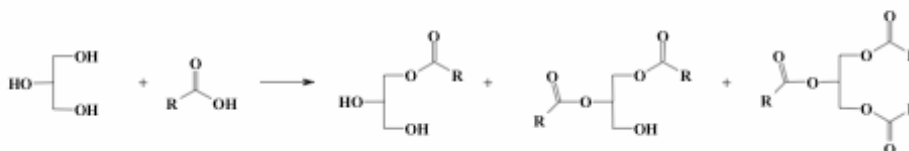
As estruturas tridimensionais das lipases de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana foram determinadas em 1990 e desde então outras estruturas de lipases microbianas têm sido determinadas (Jaeger e Reetz, 1998).

Todas as lipases cujas estruturas tridimensionais são conhecidas pertencem à classe das α/β hidrolases. Juntamente com outras hidrolases, contêm um domínio central composto por uma e até oito diferentes folhas β conectadas à seis α -hélices. O sítio ativo, constituído por uma tríade catalítica composta por serina (S), glutamato (E) ou aspartato (D), e histidina (H) (Schmidt-Dannert, 1999), é freqüentemente protegido por uma “tampa” em α -hélice, composta principalmente por resíduos hidrofóbicos. O movimento da estrutura que compõe a tampa confere às lipases pelo menos duas conformações distintas, sendo a primeira denominada “fechada” ou menos ativa pelo não deslocamento da tampa em meios aquosos e a segunda denominada “aberta” ou mais ativa, pelo deslocamento da tampa na presença de substratos hidrofóbicos (Petkar e col., 2006).

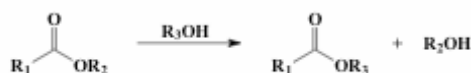
A – HIDRÓLISE



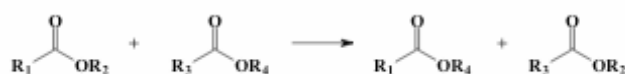
B – SÍNTESE – ESTERIFICAÇÃO



C- TRANSESTERIFICAÇÃO – ALCOÓLISE



D – INTERESTERIFICAÇÃO



E – ACIDÓLISE



Figura 2.5 - Representação esquemática das reações catalisadas por lipases (Heizir e col., 2004)

A Figura 2.6 apresenta a estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. Nesta figura, as folhas β são representadas pelas setas vermelhas e as α -hélices como espirais (azuis e amarela); a espiral amarela é a “tampa” que cobre o sítio ativo. Os resíduos que formam a tríade catalítica do sítio ativo (S82, D229 e H251) também são representados.

A elucidação das estruturas tridimensionais destas enzimas permitiu o reconhecimento de que lipases de diferentes origens apresentam diferentes sítios de ligação, o que explica as diferentes especificidades (Schmidt-Dannert, 1999).

Jaeger e Reetz (1998) também reportaram que as diferenças de tamanho e polaridade destes sítios determinam a preferência pelo substrato apresentada por estas enzimas.

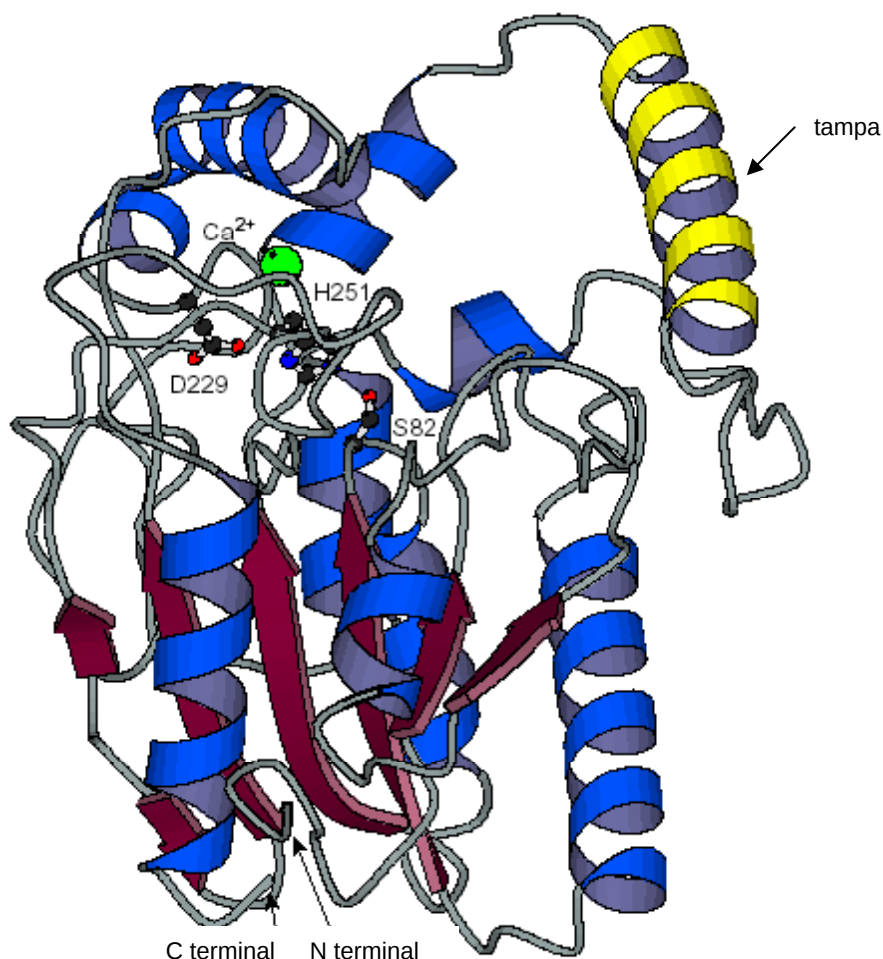


Figura 2.6 - Estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. (Jaeger e Reetz, 1998)

2.4.2 Aplicações

O interesse industrial nas lipases microbianas deve-se principalmente à diversidade em suas propriedades enzimáticas, versatilidade de aplicações e relativa facilidade de produção. Outros fatores que tornam estas enzimas atrativas do ponto de vista comercial podem ser citados (Hasan e col., 2006):

- Muitas lipases são ativas em condições ambientes ou em baixas temperaturas, o que permite seu uso em condições mais brandas,

reduzindo assim a degradação de produtos formados, o que geralmente ocorre em altas condições de temperatura e pressão;

- Devido à especificidade, a formação de produtos indesejáveis, que normalmente ocorre nos processos convencionais, é reduzida ou eliminada;
- A maior estabilidade apresentada pelas enzimas de microrganismos termoestáveis, livres e/ou imobilizadas, permite, por exemplo, o uso em reatores com temperaturas maiores que 70 °C por períodos de tempo prolongados.

Aplicações promissoras de lipases são encontradas em processos orgânicos, formulação de detergentes, síntese de biosurfactantes, indústria óleoquímica, indústria de laticínios, indústria agroquímica, manufatura de papel, nutrição, cosméticos e processos farmacêuticos (Sharma e col., 2001). Segundo Liese e col. (2000), o desenvolvimento de tecnologias baseadas no uso de lipases para a síntese de novos compostos está estimulando ainda mais o uso destas enzimas.

Algumas aplicações comerciais de lipases são apresentadas na Tabela 2.1.

A maior aplicação comercial da atividade hidrolítica das lipases é na indústria de detergentes, constituindo cerca de 32% do total de vendas. Estima-se que 100 toneladas de lipases são adicionadas em aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos a cada ano (Jaeger e Reetz, 1998).

Quantidades menores, mas significativas, são usadas em transformações oleoquímicas (Bornscheuer, 2000). Considerando a possibilidade da obtenção de produtos específicos de alto valor agregado, este tipo de processo pode tornar-se viável economicamente. Alguns exemplos destes produtos são: astaxantina (corante de alimentos), ácido 4-hidroxidecanóico (precursor na síntese de aromas), éster γ -decalactona (sabor de frutas), ácidos dicarboxílicos (indústrias de pré-polímeros) e ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) do tipo ômega-3 e ômega-6, a partir da hidrólise de óleos marinhos por lipases não específicas (Sharma e col., 2001). Os ácidos mais importantes, contidos nos óleos marinhos, são os eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), que apresentam aplicações terapêuticas no tratamento de enfermidades inflamatórias auto-imunes e doenças

Tabela 2.1 – Algumas aplicações comerciais de lipases microbianas (Heizir e col., 2004)

Setor	Função	Produto
Alimentício		
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhoria do sabor/qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos
Bebida	Melhoria do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas
Processamento de derivados do ovo	Melhoria da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais, hidrólise de óleos	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
Químico		
Química Fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Lipídeos especiais, agentes digestivos
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Detergentes
Cosméticos	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Papel	Hidrólise de lipídeos	Papel de melhor qualidade
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação e tratamento de efluentes

cardiovasculares, e não podem ser obtidos por métodos convencionais de aquecimento sem sofrer uma decomposição substancial. Da mesma forma, o ácido γ -linolênico, um importante produto nutricional encontrado em sementes oleaginosas, pode ser obtido pela hidrólise catalisada por lipases sob condições moderadas de temperatura (Masson e col., 2000).

A hidrólise seletiva da gordura do leite é um outro exemplo de aplicação potencial de lipases. Segundo Balcão e Malcata (1998), o declínio do consumo *per capita* de gordura de leite em diversos países, e a demanda por leite e derivados com menor teor de gordura têm aumentado a necessidade e o interesse do setor industrial em encontrar alternativas para o uso desta gordura. Hidrolisados deste tipo têm sido extensamente utilizados em cereais, molhos, aperitivos e assados em geral (um exemplo clássico é o uso em pipocas), resultando em produtos com melhor aroma e maior aceitabilidade pelos consumidores. A adição desses hidrolisados aos alimentos confere uma variedade de efeitos organolépticos e é dependente da quantidade empregada. A lipase é responsável pela formação do aroma distinto no preparo de queijos do tipo *Cheddar*, para produzir substitutos de manteiga, aroma de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos e bolos. Em níveis baixos, nenhum aroma de ácido graxo livre no alimento é detectável; conforme o teor dessa adição é aumentado, um aroma semelhante à manteiga começa a ser detectado e, em presença de elevados níveis, o aroma sugere queijo (Balcão e Malcata, 1998). As características dos hidrolisados dependem da fonte da lipase utilizada (Heizir e col., 2004), sendo adequadas as enzimas oriundas do leite (lipase lipoprotéica), pâncreas (lipase pancreática), fungos (*Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roquefortii*) e bactérias (*Achromobacter lipolyticum*, *Pseudomonas fluorescens*).

A aplicação de lipases tem sido também preconizada na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, indústrias de alimentos e laticínios em geral. Estas indústrias produzem um elevado teor de resíduos líquidos e sólidos, com odores desagradáveis, que prejudicam intrínseca e extrinsecamente as unidades industriais. Além disso, esses resíduos contêm elevados valores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica (Lie e Molin, 1991).

Neste contexto, processos alternativos que visam a recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de extremo interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídeos, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (Leal e col., 2002).

Uma outra área de grande importância na qual as lipases podem contribuir de forma significativa é a síntese industrial de enantiômeros puros, incluindo fármacos quirais anti-inflamatórios tais como naproxeno (Xin e col., 2001) e ibuprofeno (Arroyo e col., 1999), agentes anti-hipertensivos (captopril, enalapril e zofenapril) e bloqueadores de canais de cálcio (diltiazem). As lipases são usadas na síntese destes fármacos (Berglund e Hutt, 2000).

Novas perspectivas para a aplicação de lipases incluem a biodegradação de plásticos, tais como polihidroxialcanoatos (PHA) e policaprolactona (PCL), a utilização como biosensores (Reetz, 2002) e a produção de biodiesel (Du e col., 2004).

Lipases termoestáveis

Enzimas termoestáveis podem ser obtidas a partir de microrganismos mesófilos (25 – 40°C) e termófilos (45 - 60°C) (Kumar e col., 2005, Saxena e col., 2003b); e mesmo microrganismos psicrófilos (0 °C) podem produzir tais enzimas (Hasan e col., 2006). Algumas lipases termoestáveis já foram isoladas de diferentes fontes como *P. fluorescens* (Kojima e col., 1994), *Bacillus* sp. (Sidhu e col., 1998), *B. coagulans* (El-Shafei e Rezkallah, 1997), *Aeromonas sobria* (Macedo e col., 1997) e *Geotrichum* sp. (Lotrakul e Dharmsthiti, 1997).

A importância de lipases termoestáveis para diferentes aplicações tem crescido rapidamente. O principal interesse nestas lipases está no fato das mesmas apresentarem altas atividades em temperaturas elevadas e estabilidade em solventes orgânicos (Niehaus e col., 1999). Biocatalisadores termoestáveis permitem operações em altas temperaturas, o que é altamente vantajoso devido à alta reatividade, alta estabilidade, altos rendimentos, baixa viscosidade e poucos problemas de contaminação (Hasan e col., 2006). Devido à estas características, as lipases termoestáveis apresentam considerável potencial para interessantes

aplicações biotecnológicas e industriais, como a síntese de biopolímeros e biodiesel, entre outras (Haki e Rakshit, 2003).

Kumar e col. (2005) isolaram uma lipase termoestável a partir de uma bactéria, *Bacillus coagulans*. Esta enzima apresentou atividade de 1,16 U/mL em 48 horas a 55 °C e pH 8,5, utilizando óleo de mostarda como fonte de carbono e uma mistura (1:1) de peptona e extrato de lêvedo como fonte de nitrogênio.

Outra lipase termoestável, obtida a partir de um fungo, *Aspergillus carneus*, foi purificada por Saxena e col. (2003b). Tal enzima apresentou estabilidade na faixa de pH entre 8,0 e 10,0 por 24 horas e a 70 °C por 5 minutos. Também foram observadas altas atividades na presença de solventes orgânicos polares e apolares como metanol, propanol 30%, benzeno, tolueno e hexano.

A termoestabilidade de uma lipase pode estar relacionada com a sua estrutura, conforme observaram Zhu e col. (2001). Os autores reportaram que tal característica é influenciada por fatores do meio como pH e presença de íons metálicos. Também foi observado que mutações na tampa que recobre o sítio ativo podem afetar significativamente a termoestabilidade da enzima (Zhu e col., 2001).

A estabilidade térmica de muitas lipases pode ainda ser significativamente aumentada pela imobilização (Hiol e col., 2000). Lipases de *Candida antarctica*, por exemplo, nas formas livre e imobilizada apresentaram-se diferentes quanto à inativação em altas temperaturas (Arroyo e col., 1999).

2.4.3 Produção e purificação

Enzimas capazes de hidrolisar triglicerídeos têm sido estudadas há mais de 300 anos e a capacidade de lipases de catalisar a hidrólise e a síntese de ésteres foi reconhecida há aproximadamente 70 anos atrás. Estas enzimas eram tradicionalmente obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliares na digestão humana. O interesse inicial nas lipases microbianas surgiu devido à dificuldade em obter o material pancreático de animais (Hasan e col., 2006). Atualmente a maioria das lipases produzidas são obtidas a partir de fungos e bactérias, embora também possam ser derivadas de fontes vegetais e ainda de animais (Sharma e col., 2001).

Lipases produzidas por microrganismos são geralmente mais utilizadas devido à grande variedade de propriedades, aos altos rendimentos alcançados, à facilidade de manipulação genética, ao fornecimento regular já que não há variações sazonais e ao rápido crescimento dos microrganismos em meios relativamente baratos. Além disso, as lipases microbianas são geralmente mais estáveis que aquelas obtidas a partir de animais e vegetais (Hasan e col., 2006).

Segundo Mahadik e col. (2004), os fungos são reconhecidos como as melhores fontes de lipases e usados preferencialmente para aplicações industriais, especialmente na indústria de alimentos. As lipases produzidas por este tipo de microrganismo geralmente são extracelulares, facilitando a extração do meio de fermentação (Beys Silva e col., 2005). Entre os fungos produtores de lipases podemos citar *Aspergillus niger* (Ellaiah e col., 2004), *Rhizopus arrhizus* (Lin e col., 2006), *Antrodia cinnamomea* (Lin e col., 2006) e *Penicillium restrictum* (Gombert e col., 1999).

Leveduras como *Candida cylindracea* (Kamiya e Gotto, 1998), *Yarrowia lipolytica* (Alonso e col., 2005), *Saccharomycopsis lipolytica* (Tahoun e col., 1985) e *Rhodotorula glutinis* (Papaparaskevas e col., 1992) também têm sido reportadas como boas produtoras de lipases. A Tabela 2.2 apresenta algumas lipases que podem ser obtidas comercialmente a partir de microrganismos.

A produção de lipases depende de muitas variáveis, tais como tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, concentração do indutor, concentração do inóculo, temperatura, pH, condições de agitação e aeração, entre outros (Elibol e Ozer, 2002). Muitos estudos têm sido feitos para definir o meio de cultura mais adequado em fermentações submersas e sólidas (Sharma e col., 2001). Sabe-se que tanto o tipo de fermentação quanto o biorreator influem na produtividade (Rodriguez e col., 2006).

O uso de células manipuladas geneticamente na produção de lipases também tem sido reportado, com o objetivo de melhorar o rendimento e produzir enzimas com características de interesse (Hasan e col., 2006). Adicionalmente, os produtos de origem microbiana, inclusive as lipases, podem ser obtidos a partir de células imobilizadas (Ellaiah e col., 2004, Hemachander e col., 2001).

A seguir serão discutidos alguns aspectos relevantes da produção de lipases.

Tabela 2.2 – Algumas lipases microbianas disponíveis comercialmente (Sharma e col., 2001)

Tipo	Fonte	Empresa(s)
Fungo/Levedura	<i>C. rugosa</i>	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Sigma
	<i>C. antarctica</i>	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T. lanuginosus</i>	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>R. miehei</i>	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bactéria	<i>Burkholderia cepacia</i>	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Genencor
	<i>P. mendocina</i>	Genecor
	<i>Ch. viscosum</i>	Asahi, Biocatysts

2.4.3.1

Fermentação

Fermentação submersa

A fermentação submersa é caracterizada pela utilização de um meio fermentativo líquido, com nutrientes solúveis. Este processo tem como vantagens a facilidade de controle de parâmetros como aeração, agitação, pH, temperatura e a possibilidade de automação. A maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, é um inconveniente do processo. Outra limitação é quando a enzima produzida é extracelular, obtendo-se uma preparação mais diluída, sendo necessária a inclusão de uma etapa de concentração mais trabalhosa no processo de purificação (Alonso, 2001). Este tipo de fermentação pode ser realizado em frascos agitados, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial.

Rathi e col. (2001) reportaram a influência de alguns parâmetros na produção de lipases por *Burkholderia cepacia*. A produção geralmente é induzida por fontes de lipídeos. Entre os dezesseis óleos usados, o óleo de mostarda (1% v/v) forneceu maior atividade (34 U/mL) a 50 °C, pH 7,0 e sob agitação de 250 rpm. A atividade enzimática aumentou cerca de três vezes com a adição de 1% (m/v) de glicose ao meio durante a fermentação. Os autores observaram

também que, para este microrganismo, a adição de nitrogênio, seja de fontes orgânicas ou inorgânicas, não afeta a produção significativamente.

Para a lipase de *Acinetobacter radioresistens* (Chen e col., 1998), as melhores condições de fermentação reportadas foram pH 7,0, temperatura de 30 °C, sob agitação de 400 rpm e uma combinação de 0,1% (m/v) de óleo de oliva com 1,5% (m/v) de n-hexadecano como fonte de carbono. Observou-se que a presença de n-hexadecano aumenta a estabilidade da enzima, protegendo-a da degradação pelas proteases também produzidas. Como fonte de nitrogênio, utilizou-se NH₄Cl (1 g/L).

Burkert e col. (2004) observaram que os melhores meios para a produção de lipase por *Geotrichum sp.* eram compostos de (a) nitrato de amônio (2,1-2,5%), “corn steep liquor” (13-15%) e óleo de soja (0,6%), e (b) nitrato de amônio (0,8-1%), “corn steep liquor” (13-15%) e óleo de oliva (0,6%). As atividades obtidas foram 20 U/L e 17 U/L, respectivamente, para os meios (a) e (b). A temperatura de 30 °C foi reportada como ótima. A fermentação foi conduzida em agitador a 120 rpm.

Para uma lipase extracelular de *Metarhizium anisopliae*, Beys Silva e col. (2005) obtiveram atividade específica máxima (108 U/mg) em meio contendo óleo de oliva 2% (m/v) e peptona 0,5% (m/v). A melhor temperatura para a produção reportada foi 32 °C, em pH 7,2 e 150 rpm em agitador.

Aspergillus carneus produz uma lipase extracelular com atividade de 13 U/L em agitador a 200 rpm, pH 8,0 e temperatura de 37 °C (Kaushik e col., 2006). A composição ótima do meio foi glicose (0,8% m/v) e peptona (0,8% m/v).

A combinação dos efeitos da concentração inicial de glicose (fonte de carbono) e óleo de milho (indutor) foi investigada por Elibol e Ozer (2002) utilizando células de *Rhizopus arrhizus*. As concentrações ótimas reportadas foram 1,0 e 3,3 g/L de glicose e óleo de milho, respectivamente, em agitador a 150 rpm e 30°C. Extrato de lêvedo (2 g/L) foi utilizado como principal fonte de nitrogênio. O pH do meio foi ajustado inicialmente para 6,0 e a atividade alcançada foi de 370 U/L. Os autores também verificaram que a glicose tem efeito repressor na produção da lipase em concentrações maiores que 1,0 g/L.

Células de *Yarrowia lipolytica* 681 foram utilizadas por Corzo e Revah (1999) para a produção de lipase extracelular. Os autores observaram que óleo

de oliva e óleo de milho eram os melhores indutores e também fontes de carbono para a produção de biomassa e da enzima, apresentando as maiores atividades (25,3 U/L e 25,0 U/L, respectivamente).

Uma atividade de 66 U/L foi observada para a lipase produzida por *Cryptococcus sp.* S-2 (Kamini e col., 2000) em meio contendo 1% de trioleína e 1% de extrato de lêvedo, a 25 °C e pH 5,6. Os autores reportaram que óleo de sardinha era um bom indutor para a produção (50 U/L), podendo ser usado efetivamente em substituição à trioleína, diminuindo o custo do processo, por ser uma opção mais barata. A fermentação foi conduzida em agitador a 100 rpm.

A produção de lipase por *Candida sp.* 99-125 foi descrita por He e Tan (2006). A fermentação foi conduzida em biorreator de 5 litros e em agitador de bancada, ambos a 26°C, pH entre 6,0 e 7,0 e 220 rpm. Como principais fontes de carbono e nitrogênio foram utilizados, respectivamente óleo de soja (4,2% m/v) e farinha de soja (5,8% m/v). As condições ótimas forneceram atividades de 6230 U/L para a condução em agitador e 9600 U/L para o biorreator.

Muralidhar e col. (2001) compararam duas fontes de carbono diferentes (glicose e óleo de oliva) para a produção de lipases por células de *Candida rugosa*. O melhor rendimento (47 U/L) foi obtido com 34 g/L de óleo de oliva, a 27 °C, pH 6,5 e 160 rpm em agitador.

Fermentação sólida

A fermentação sólida envolve o crescimento e o metabolismo de microrganismos em substratos sólidos com baixas percentagens de água (Mahadik e col., 2002). Esta técnica apresenta inúmeras vantagens em relação à submersa, tais como uso de equipamentos menos complexos, biorreatores mais compactos devido ao pouco volume de água, pouco espaço necessário para a fermentação, meios de cultura mais simples, baixa demanda de energia, baixo custo operacional e rendimentos superiores (Mahadik e col., 2002, Rodriguez e col., 2006). Além disso, a menor probabilidade de contaminação e a obtenção de preparações enzimáticas mais concentradas também são características vantajosas (Alonso, 2001). Este tipo de fermentação se torna economicamente interessante para países com abundância de biomassa e resíduos agroindustriais, que podem ser usados como matéria-prima barata (Gombert e col., 1999). Entretanto, algumas

limitações são observadas como poucas opções de microrganismos capazes de crescer em condições restritas de água, além da dificuldade no controle e monitoramento dos parâmetros citados anteriormente (Mahadik e col., 2002). Adicionalmente, a extração de produtos em meios sólidos é uma operação crítica e a eficiente recuperação é essencial para a viabilidade do processo (Rodriguez e col., 2006).

Fungos são facilmente cultiváveis em fermentação sólida (Rodriguez e col., 2006). Kamini e col. (1998) estudaram a produção de lipases de *Aspergillus niger* usando uma massa de óleo de gergelim como substrato, obtendo uma atividade de 363 U/g de substrato seco após 72 horas de cultivo.

Christen e col. (1995) investigaram a possibilidade de se obter lipase com *Rhizopus delemar* em uma resina polimérica (Amberlite). A atividade lipásica obtida foi 96 U/g de substrato seco, sendo superior àquela obtida anteriormente em fermentação submersa (14 U/mL).

Rao e col. (1993) otimizaram a produção de lipases por *Candida rugosa* e observaram que a razão carbono/nitrogênio (C/N) do meio reacional é um importante parâmetro para a atividade lipásica, estando o ótimo na faixa entre 9,0 e 9,5.

Rivera-Muñoz e col. (1991) compararam a produção de lipase por *Penicillium candidum* em fermentações sólida e submersa, verificando a superioridade do processo sólido.

Gombert e col. (1999) reportaram a produção de lipases a partir de células de *Penicillium restrictum* usando resíduo sólido de óleo de babaçu como nutriente básico. A atividade lipásica máxima (30 U/g de peso seco inicial) foi obtida após 24 horas de cultivo.

Células de *Rhizopus homothallicus* foram cultivadas para produção de lipase em fermentação sólida usando bagaço de cana-de-açúcar como suporte (Rodriguez e col., 2006). Obteve-se 826 U/g de peso seco inicial após 12 horas de incubação.

2.4.3.2

Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*

Como citado em Yu e col. (2006), a secreção de lipases por *Yarrowia lipolytica* foi descrita primeiramente por Peters e Nelson (1948), os quais

observaram uma única atividade com pH ótimo na faixa de 6,2 a 6,5. Posteriormente, Ota e col. (1982) reportaram atividade lipásica extracelular em culturas suplementadas com frações protéicas derivadas de grãos de soja e duas lipases ligadas à célula, I (39 kDa) e II (44kDa). A lipase extracelular requereu ácido oleico como ativador, ao contrário das formas ligadas à célula (Yu e col., 2006). Kuno e Ota (1996) purificaram uma lipase extracelular (39 kDa) e determinaram a sequência N-terminal de aminoácidos.

Estudos preliminares com seis diferentes leveduras, usando óleo de oliva como indutor, mostraram que a produção de uma lipase extracelular por *Yarrowia lipolytica* 681 foi maior que a produção por *Yarrowia lipolytica* 179, *Candida rugosa* ATCC 14830 e *Candida utilis* CDBBC245 (Corzo e Revah, 1999).

O mecanismo de produção de lipases por células de *Yarrowia lipolytica* (Figura 2.7) foi proposto por Pereira-Meirelles e col. (2000). No início do cultivo (Figura 2.7a), observa-se somente a presença de um nível basal de lipase. A produção da lipase é iniciada, induzida pela grande quantidade de lipídeos no meio de cultura. As moléculas da enzima são direcionadas para a superfície da célula (Figura 2.7b), onde permanecem preferencialmente até que aproximadamente 50% do substrato seja consumido (Figura 2.7c). A lipase começa então a ser liberada para o meio de cultura (Figura 2.7d) e continua durante a segunda fase exponencial de crescimento (Figura 2.7e). A atividade lipásica extracelular máxima é obtida durante a fase estacionária de crescimento. Ao final da fermentação, na fase estacionária tardia de crescimento, somente a lipase basal permanece no interior da célula (Figura 2.7f).

Através deste esquema é possível entender o mecanismo da produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* e que certamente pode diferir do mecanismo proposto para outros microrganismos (Montessinos e col., 1995, Hooker e col., 1997).

2.4.3.3 Purificação

A maioria das aplicações comerciais não requerem preparações homogêneas de lipases; entretanto, um certo grau de pureza muitas vezes

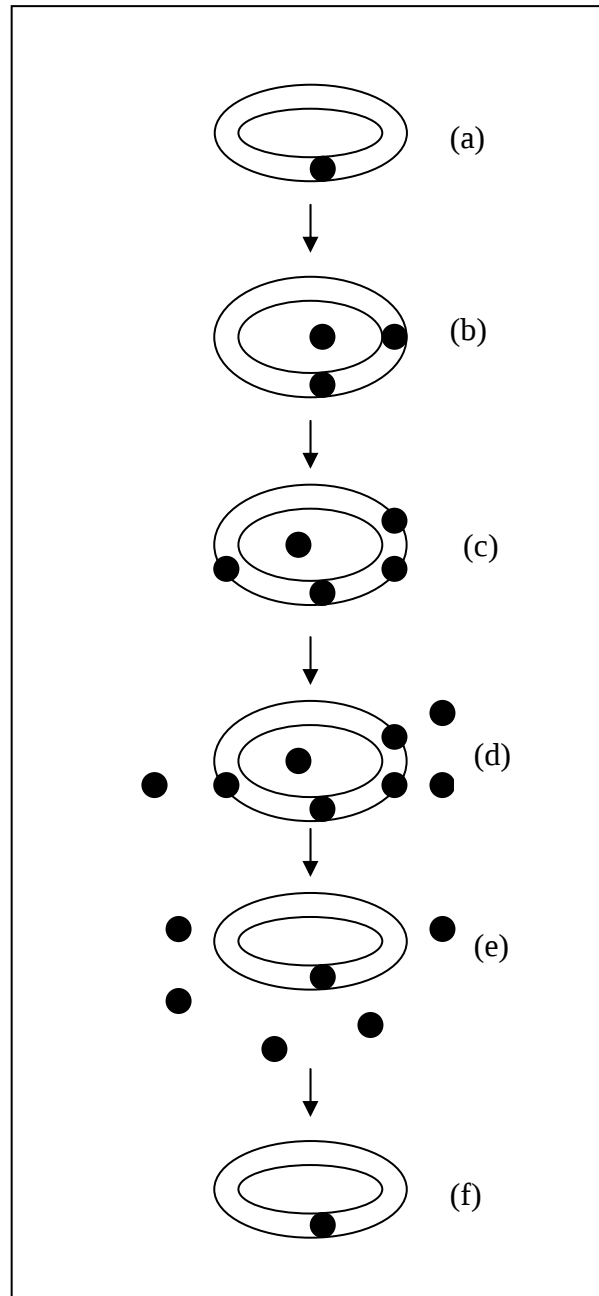


Figura 2.7- Mecanismo de produção de lipases por células de *Yarrowia lipolytica* (Pereira-Meirelles e col., 2000). (a) Lipase basal (b) Início da produção e deslocamento da enzima para a superfície (c) Localização da enzima predominantemente na superfície (d) Início da liberação da enzima (e) Liberação da enzima (f) Célula contendo lipase basal.

possibilita melhores rendimentos e o uso mais eficiente da enzima. Preparações purificadas de lipases são necessárias em indústrias onde a enzima será utilizada na biocatálise de reações com vistas a obtenção de produtos farmacêuticos, cosméticos e química fina. Além disso, a purificação permite a determinação da sequência primária de aminoácidos e, mais recentemente, a determinação da estrutura tridimensional de enzimas (Saxena e col., 2003a).

Os métodos de purificação mais utilizados empregam técnicas como precipitação, cromatografia de interação hidrofóbica, filtração em gel e cromatografia de troca iônica. A cromatografia de afinidade tem sido utilizada em alguns casos para reduzir o número de etapas necessárias à purificação (Sharma e col., 2001). Os principais inconvenientes das estratégias de purificação tradicionais incluem baixos rendimentos e períodos de tempo muito longos. Tecnologias alternativas como processos com membranas, sistemas aquosos bifásicos e imunopurificação estão sendo preferencialmente usadas. Hoje, cada vez mais as indústrias optam por técnicas baratas, rápidas, que forneçam altos rendimentos e viáveis em processos de larga escala (Saxena e col., 2003a).

A Tabela 2.3 apresenta alguns métodos reportados para a purificação de lipases de diferentes microrganismos.

2.4.4 Detecção e medição da atividade lipásica

Muitos métodos estão disponíveis para a medição da atividade lipásica em preparações brutas ou purificadas. A maioria destes métodos baseia-se no princípio de aparecimento de um produto simultaneamente ao consumo de um substrato (Thomson e col., 1999).

Geralmente a atividade lipásica é determinada com triacilgliceróis de cadeias longas como substrato, sendo a trioleína o mais comum deles (Papaparaskevas e col., 1992). A trioleína pode ser considerada um substrato ideal pois apresenta-se na forma líquida na temperatura de ensaio, o que facilita a emulsificação. Alternativamente, óleo de oliva, o qual deve ser purificado previamente em coluna de alumina neutra para a remoção de ácidos graxos, pode ser usado como um substituto econômico para a trioleína (Jensen, 1983). A emulsificação do substrato antes do ensaio é de extrema importância, já que a taxa de reação da lipase varia diretamente com a área interfacial disponível para a enzima (Hadeball, 1991).

A atividade lipásica pode ser determinada através de diversas metodologias, tais como: titulação dos ácidos graxos produzidos, conhecido como método titulométrico (Dellamora-Ortiz e col., 1997); determinação pontenciométrica dos ácidos graxos liberados (Schmidt-Dannert, 1999); medição de halos de hidrólise dos substratos em placas (Pereira-Meirelles e col., 1997); espectrofotometria de

Tabela 2.3 – Métodos empregados para purificação e características de algumas lipases microbianas (Adaptado de Saxena e col., 2003a)

Tipo	Microrganismo	Etapas de purificação	Rendimento (%)/ Fator de purificação	Peso molecular (kDa)	Referência
Bactéria	<i>Pseudomonas cepacia</i>	partição bifásica	76/24	60	Terstappen e col., 1992
	<i>Antrodia cinnamomea</i>	precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em DEAE-Sepharose	33,7/17,2	60	Shu e col., 2006
	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	desintegração celular, precipitação por calor, cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica	31,2/n.d.	16	Schmidt-Dannert e col., 1996
Fungo	<i>Rhizopus delemar</i>	cromatografia de afinidade seguida de filtração em gel	30/10,3	30,3	Haas e col., 1992
	<i>Penicillium cyclopium</i>	precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de adsorção em hidroxiapatita	27/1380	11	Isobe e col., 1988
	<i>Fusarium globulosum</i>	ultrafiltração, precipitação com acetona e cromatografia hidrofóbica	31/29	n.d.	Saxena e col., 2003a
Levedura	<i>Candida rugosa</i>	extração com etanol e cromatografia de troca aniônica de alta resolução	18, n.d.	58	Veeraragavan e Gibbs, 1989
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica	18/2	30	Martins, 2001
	<i>Trichosporon asteroides</i>	precipitação com sulfato de amônio e filtração em gel	n.d./n.d.	37	Dharmsthiti e Ammaranond, 1996

(n.d. = não demonstrado)

absorção (Pereira-Meirelles e col., 2000); turbidimetria (Thomson e col., 1999); quantificação de radioatividade (Jaeger e col., 1994); cromatografia (Jaeger e col., 1994); fluorimetria (Jaeger e col., 1994).

Dentre os métodos citados anteriormente, os mais utilizados são o método titulométrico e o método espectrofotométrico de absorção. Os demais métodos são menos utilizados, provavelmente por utilizarem equipamentos ou reagentes mais caros ou por serem muito demorados (Martins, 2001).

O uso de biosensores para medição da atividade lipásica foi reportado por Starodub (2006). Segundo o autor em sua revisão, a utilização de instrumentos baseados no princípio de biosensores pode conduzir à medição em tempo real, automação dos ensaios, à simplicidade da análise, ao aumento da sensibilidade e à diminuição do tempo de ensaio. Para determinar a atividade lipásica, diferentes biosensores foram analisados em detalhe, baseados no tipo de transdutor empregado: eletroquímicos, óptico, térmico e mecânico (Feldbrügge e col., 1994, Sumner e col., 2000, Satoh e col., 1981, em Starodub, 2006). Foi então observado que os biosensores eletroquímicos apresentaram as características mais favoráveis, como, por exemplo, o fato de não dependerem da fonte da amostra e apresentarem maior sensibilidade e menor tempo de resposta. Os biosensores térmico e óptico também são atrativos, mas ainda requerem aumento na sensibilidade e simplicidade da análise. Uma sensibilidade consideravelmente maior que aquela obtida pelos métodos convencionais foi obtida pelo biosensor mecânico.

A Tabela 2.4 apresenta os métodos utilizados para a detecção e medição da atividade lipásica produzida por alguns microrganismos.

Tabela 2.4 – Métodos empregados para detecção da atividade lipásica

Tipo	Microrganismo	Método/Substrato	Temperatura	pH	Referência
Bactéria	<i>Burkholderia cepacia</i>	titulométrico/óleo de oliva	37 °C	11,0	Rathi e col., 2001
	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	titulométrico/óleo de oliva	37 °C	10,0	Chen e col., 1998
Fungo	<i>Rhizopus homothallicus</i>	colorimétrico/óleo de oliva	40 °C	8,0	Rodriguez e col., 2006
	<i>Aspergillus carneus</i>	espectrofotométrico/p-nitrofenil palmitato	37 °C	9,0	Kaushik e col., 2006
	<i>Geotrichum sp.</i>	titulométrico/óleo de oliva	37 °C	7,0	Burkert e col., 2004
Levedura	<i>Yarrowia lipolytica</i>	titulométrico/tributirina	37 °C	7.4	Corzo e Revah, 1999
		titulométrico/óleo de oliva	37 °C	7.0	Alonso e col., 2005

(n.d. = não demonstrado)

2.5

Planejamento experimental

Como citado no item 2.4.3, verifica-se que a produção de lipases depende de inúmeras variáveis de processo, como temperatura, pH, concentração da fonte de carbono e nitrogênio, inóculo entre outras. A tentativa de otimização de uma variável (ou fator) mantendo as demais constantes pode acarretar interpretações equivocadas por não considerar o efeito combinado dos diferentes fatores envolvidos, uma vez que a otimização do segundo fator, por exemplo, pode alterar o resultado obtido para o primeiro.

Métodos de planejamento fatorial (PF), planejamento fatorial fracionário (PFF) e metodologia de superfície de resposta (RSM) são importantes ferramentas para determinar as condições ótimas, em cada situação problema (Burkert e col., 2004).

O PF é muito aplicado em pesquisas básicas, onde as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo (Barros Neto, 1998). Este tipo de planejamento contém todas as combinações possíveis de fatores e níveis. Ou seja, um planejamento fatorial no qual k fatores são estudados em n níveis, irá conter n^k experimentos. Sendo assim, é fácil perceber que quando o número de fatores e/ou de níveis aumenta, o número de experimentos também será elevado (Aguiar e col, 1995). A alternativa para se diminuir o número de experimentos é o uso do PFF, onde informações a respeito dos efeitos e interações entre os fatores podem ser obtidas usando-se apenas uma fração do experimento completo (Essamri e col., 1998).

A RSM é um dos procedimentos mais empregados nos estudos de otimização de processos biotecnológicos. Além disso, constitui-se em uma ferramenta estatística valiosa para a investigação de processos complexos (Gunawan e col., 2005). Esta metodologia é eficaz na análise dos efeitos de interação entre vários parâmetros, geralmente resultando em altos rendimentos e limitando o número de experimentos (Kaushik e col., 2006).

Os planejamentos clássicos podem, entretanto, não ser apropriados ou serem inviáveis em alguns casos, como:

- o planejamento fatorial ou fatorial fracionário requer muitos ensaios para o tempo e recursos disponíveis;

- nem todas as combinações dos fatores são praticáveis, ou por alguma razão a região experimental é restrita ou irregular geometricamente;
- quando, tendo algum conhecimento do processo que está sendo estudado, sabe-se que os modelos usuais de primeira e segunda ordem não se aplicam.

Na ocorrência de uma destas situações, deve-se recorrer a outros tipos de planejamentos. Segundo Aguiar e col. (1995), o planejamento D-optimal (D) é um dos mais conhecidos e aplicados quando os métodos clássicos não são convenientes, sendo uma alternativa interessante para otimização de processos biotecnológicos. Este tipo de planejamento é mais flexível que os planejamentos fatorial e fatorial fracionário e consequentemente, mais adequado em aplicações complexas (Eriksson e col., 2003).

Alguns trabalhos reportam o uso dos métodos de planejamento citados acima para a produção de lipases. O PF foi utilizado por Burkert e col. (2004) para otimização da produção de lipases por *Geotrichum* sp. Os autores estudaram os efeitos das fontes de carbono (óleo de soja, óleo de oliva e glicose) e nitrogênio (*corn steep liquor* e NH_4NO_3) através de cinco planejamentos: primeiramente um planejamento fatorial 2^4 para analisar os efeitos das concentrações de glicose, *corn steep liquor*, NH_4NO_3 e óleo de oliva ou óleo de soja. Em seguida, dois planejamentos fatoriais 2^3 foram empregados, avaliando as concentrações de *corn steep liquor*, NH_4NO_3 e óleo de soja e mais dois outros 2^3 avaliando as concentrações de *corn steep liquor*, NH_4NO_3 e óleo de oliva. Foi concluído que a produção da enzima é maior no meio contendo óleo de soja do que naquele contendo óleo de oliva. As concentrações ótimas obtidas usando óleo de soja como fonte de carbono foram 2,1 a 2,5% de NH_4NO_3 , 13 a 15% de *corn steep liquor* e 0,6% de óleo de soja. Nestas condições, foi obtida uma atividade lipásica de 20 U/mL, sendo onze vezes maior do que a reportada por Macedo e col. (1997) sem o uso da otimização.

Essamri e col. (1998) propuseram o PFF com dois níveis e sete fatores: tempo da fermentação, agitação, pH do meio, temperatura, concentração de *corn steep liquor*, natureza e concentração do óleo, também para otimização da produção de lipases por células de *Rhizopus oryzae*. Este planejamento foi escolhido já que o planejamento fatorial completo 2^7 implicaria em um total de 128 ensaios. Tal procedimento permitiu a realização de apenas 16 ensaios para o

estudo dos sete fatores. A atividade lipásica obtida após a otimização foi cerca de 9200 unidades maior do que aquela observada anteriormente.

He e Tan (2006) empregaram a RSM para otimizar o meio de cultura para a produção de lipases por *Candida* sp. 99-125. Os autores reportaram que óleo de soja, soja em pó e K_2HPO_4 influenciam significativamente na produção. Consequentemente, as concentrações dos três fatores foram otimizadas. Um planejamento composto central com cinco níveis codificados e selecionados a partir de experimentos anteriores foi usado para explorar a sub-região da superfície de resposta nas vizinhanças do ótimo. Foram feitos um total de 20 experimentos, sendo seis replicatas do ponto central. As concentrações ótimas obtidas, em massa por volume, para o meio de cultura foram 4,187% de óleo de soja, 5,840% de soja em pó e 0,1% de K_2HPO_4 . A otimização permitiu o aumento da produção de 5000 para 6230 U/mL em agitador de bancada.

A combinação dos efeitos das concentrações iniciais de glicose e óleo de milho (indutor) na produção de lipases por células de *Rhizopus arrhizus* foi investigada por Elibol e Ozer. (2002) usando a RSM. Foi realizado um planejamento composto central com cinco níveis codificados conduzindo a 11 experimentos, sendo 3 replicatas do ponto central. Nas condições otimizadas (1,1 g/L de glicose e 3,3 g/L de óleo de milho), a atividade lipásica obtida foi de 370 U/L.

Kaushik e col. (2006) também empregaram a RSM para estudar a produção da lipase extracelular de *Aspergillus carneus*. Através do planejamento composto central foram verificadas as interações de cinco fatores (óleo de girassol, glicose, peptona, taxa de agitação e tempo de incubação), estudados individualmente em trabalhos anteriores. Para cada fator, três níveis foram empregados e uma matriz com 32 experimentos foi gerada. Foi reportado um aumento de 1,8 vezes na produção, com atividade de 12,7 U/mL em comparação a 7,2 U/mL obtido através da análise de uma variável por vez.

Ustok e col. (2006) utilizaram o planejamento D-optimal juntamente com a RSM para estudar a otimização da produção da enzima poligalacturonase por células de *Aspergillus sojae*. Foram verificados os efeitos do tipo de substrato, a concentração de inóculo e o tempo de incubação. A produção da enzima foi cerca de 48% maior quando comparada à otimização individual dos fatores.

Até a conclusão deste trabalho, não foi encontrada nenhuma publicação utilizando D-optimal com vistas à otimização da produção de lipases. Dessa forma, a comparação e discussão deste método com outros empregados até aqui utilizando células de *Yarrowia lipolytica* (Corzo e Revah, 1999) torna-se relevante no sentido de aprimorar as condições da produção, visando melhores rendimentos e menores custos para o processo.