

5

Resultados e discussão

5.1

Curvas de calibração das vidrarias

Com objetivo de garantir a confiabilidade metrológica dos resultados obtidos neste trabalho, todos os equipamentos foram calibrados ou verificados, conforme as recomendações do manual Habilitação de Laboratórios de Microbiologia (ANVISA, 2006), apresentadas no Apêndice 9.2.

Uma forma usual de apresentação dos resultados de uma calibração é por meio de uma curva de calibração que relaciona, em um gráfico, os valores do instrumento calibrado (eixo x) com os valores do padrão (eixo y). Geralmente este gráfico é uma linha reta, mas pode ser ajustado para um polinômio de 2º ou 3º ordem. A equação que resulta deste gráfico descreve o comportamento do instrumento calibrado, em comparação ao padrão utilizado (Mendes e Rosário, 2005).

Sendo assim, para a bureta e pipetas graduadas, foram construídas curvas de calibração, as quais relacionam os volumes nominais com os volumes fornecidos pela calibração. A equação de ajuste foi obtida pelo método dos mínimos quadrados. A Figura 5.1 apresenta a curva de calibração para a pipeta graduada de 1mL nº de identificação 8. As demais curvas são apresentadas no Apêndice 9.3. Para os balões volumétricos foram utilizados diretamente os valores fornecido pelos certificados de calibração (Apêndice 9.1).

A utilização dos equipamentos calibrados com as devidas correções aplicadas, evita a propagação de erros sistemáticos até o final do processo. Em termos de valores, para um dos experimentos foi obtida uma atividade enzimática corrigida de 4815 U/L. Sem as devidas correções, este valor seria de 4674 U/L, o que representa uma diferença pequena em escala de laboratório. Entretanto, em escala industrial, por exemplo na indústria de detergentes, onde aproximadamente 100 toneladas de lipases são adicionadas na composição por ano, esta diferença torna-se extremamente significativa e todas as correções devem ser levadas em consideração desde o início.

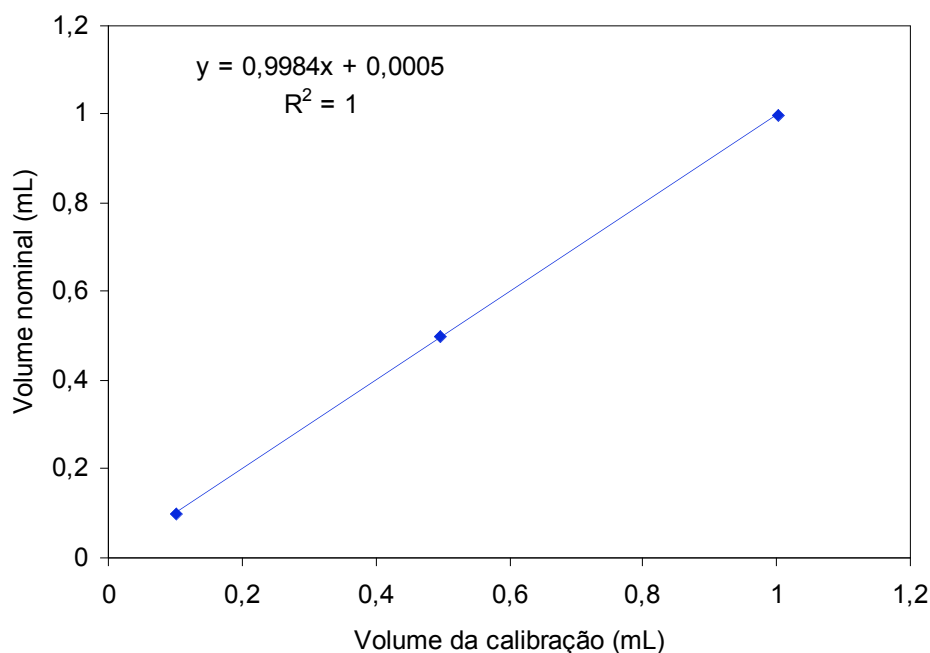


Figura 5.1 - Curva de calibração para a pipeta graduada de 1 mL nº de identificação 8, certificado VOL- 013/06

5.2

Avaliação da melhor metodologia para a obtenção das repetições da quantificação do crescimento celular

Com o intuito de estabelecer qual seria a melhor maneira para se realizar as repetições na quantificação do crescimento celular, para posterior análise estatística com base na estimativa do menor desvio padrão experimental, uma alíquota do meio de cultivo contendo células foi submetida à leitura de duas formas distintas (Figura 5.2).

Ao se optar por uma única diluição de uma amostra e submetê-la a várias leituras no colorímetro (Figura 5.2a), o desvio padrão experimental que se obtém refere-se ao instrumento ($S_{instrumento}$). Por outro lado, ao serem efetuadas várias diluições de uma mesma amostra e leituras independentes (Figura 5.2b), têm-se o desvio padrão experimental da diluição ($S_{diluição}$).

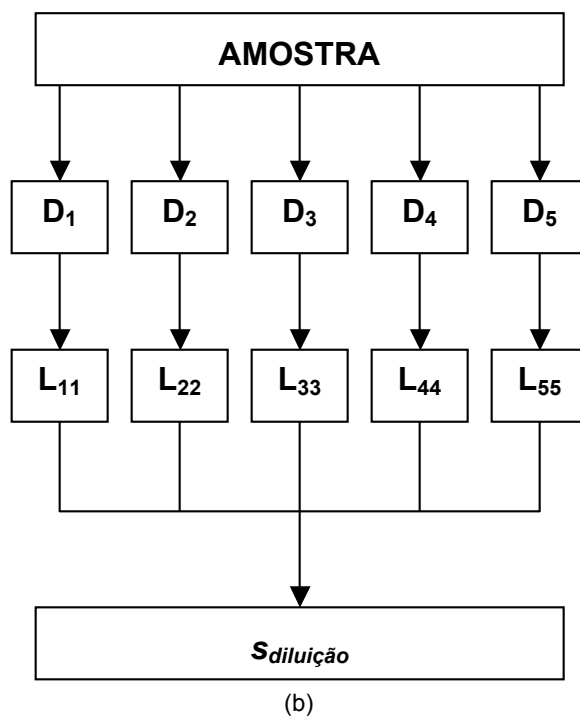
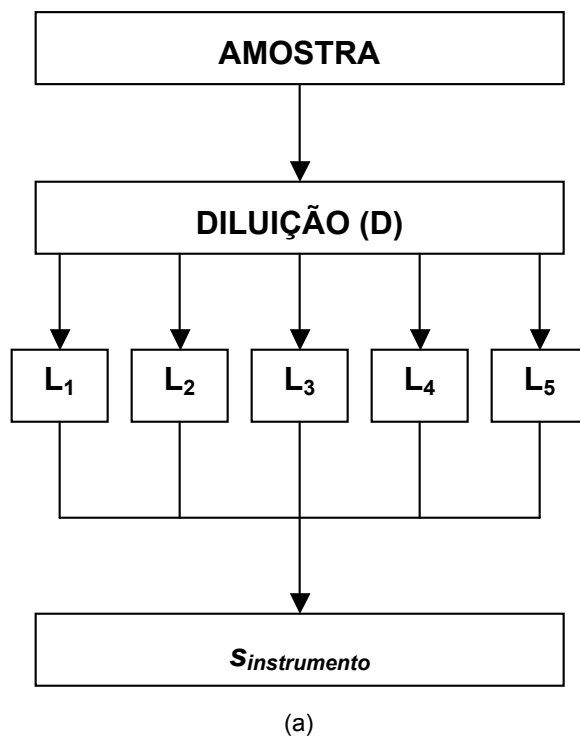


Figura 5.2 : Esquema para determinação do desvio padrão da quantificação do crescimento celular.
 (a) desvio padrão do instrumento, (b) desvio padrão da diluição

A Tabela 5.1 apresenta os resultados em termos de crescimento celular. Verifica-se que o desvio padrão do instrumento é menor que o desvio padrão da diluição. Operacionalmente é a maneira mais conveniente de se realizar as medições e, sendo assim, nos experimentos subseqüentes, as alíquotas foram diluídas uma única vez e submetidas a leituras sucessivas.

Tabela 5.1 - Resultado da estimativa do desvio padrão para a quantificação do crescimento celular.
Valores em mg p.s.cel./mL. s = desvio padrão experimental

AMOSTRA					s
L_1	L_2	L_3	L_4	L_5	$s_{instrumento}$
11,7	11,8	11,9	12,0	11,8	0,11
L_{11}	L_{22}	L_{33}	L_{44}	L_{55}	$s_{diluição}$
11,5	11,3	11,9	12,1	11,2	0,39

5.3

Avaliação do número de repetições necessárias para a determinação da atividade lipásica

Inicialmente, foram realizados experimentos com duas, três, quatro e cinco repetições com o intuito de avaliar o número de repetições necessárias para a determinação da atividade lipásica. Foram calculados o desvio padrão experimental e o desvio padrão experimental da média (incerteza Tipo A) conforme as equações 2.1 e 2.2. Com os valores obtidos (Tabela 5.2), observa-se que a partir de três repetições a incerteza Tipo A equivale a menos de 10% da média aritmética dos resultados; por questões operacionais optou-se por quatro.

5.4

Perfis de crescimento celular e de atividade lipásica

Os perfis de crescimento celular e de atividade lipásica para cada experimento realizado são apresentados a seguir. Para o crescimento celular, cada ponto representa a média aritmética de três repetições e as barras de erros correspondem ao desvio padrão experimental da média. Neste caso, a incerteza da medição corresponderá

Tabela 5.2 - Resultados da determinação do número de repetições necessárias para a determinação da atividade lipásica. Valores em U/L. $\bar{x}$ = média aritmética, s = desvio padrão experimental, $s(\bar{x})$ = desvio padrão experimental da média (incerteza Tipo A)

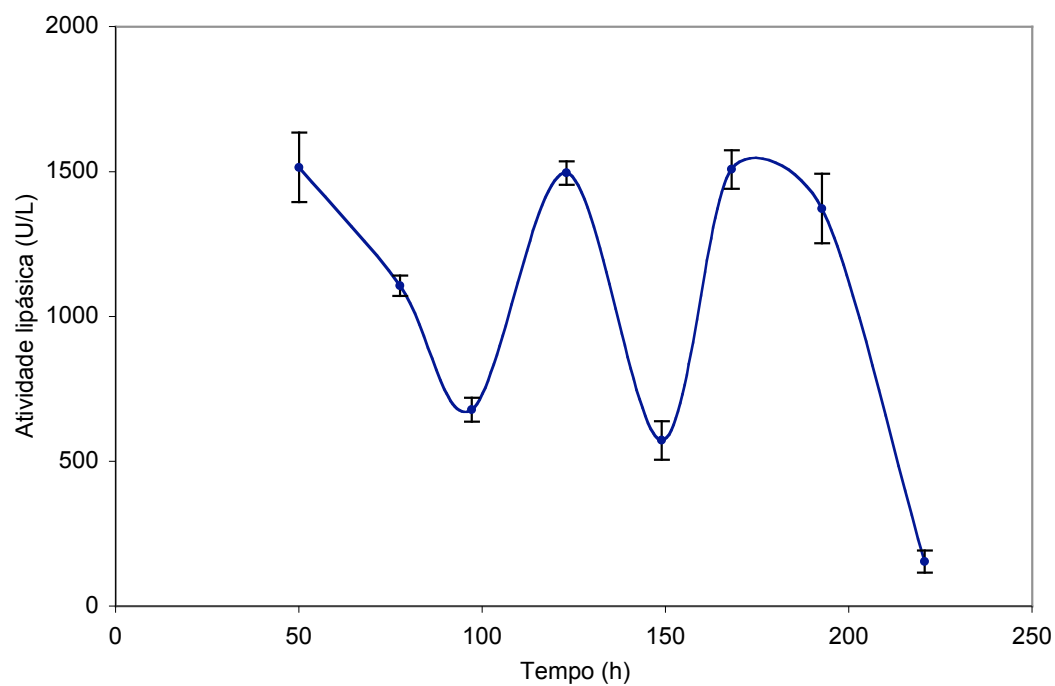
Número de repetições (n)	$\bar{x}$	s	$s(\bar{x})$
2	52,30	8,49	6,00
3	50,63	6,66	3,84
4	51,43	5,66	2,83
5	50,80	5,10	2,28

somente à avaliação da repetitividade, sendo o desvio padrão experimental da média considerado como a incerteza Tipo A das medições. Para a atividade lipásica, os pontos também representam a média aritmética, porém de quatro repetições, conforme mencionado no item 5.3, e as barras de erros correspondem à incerteza expandida.

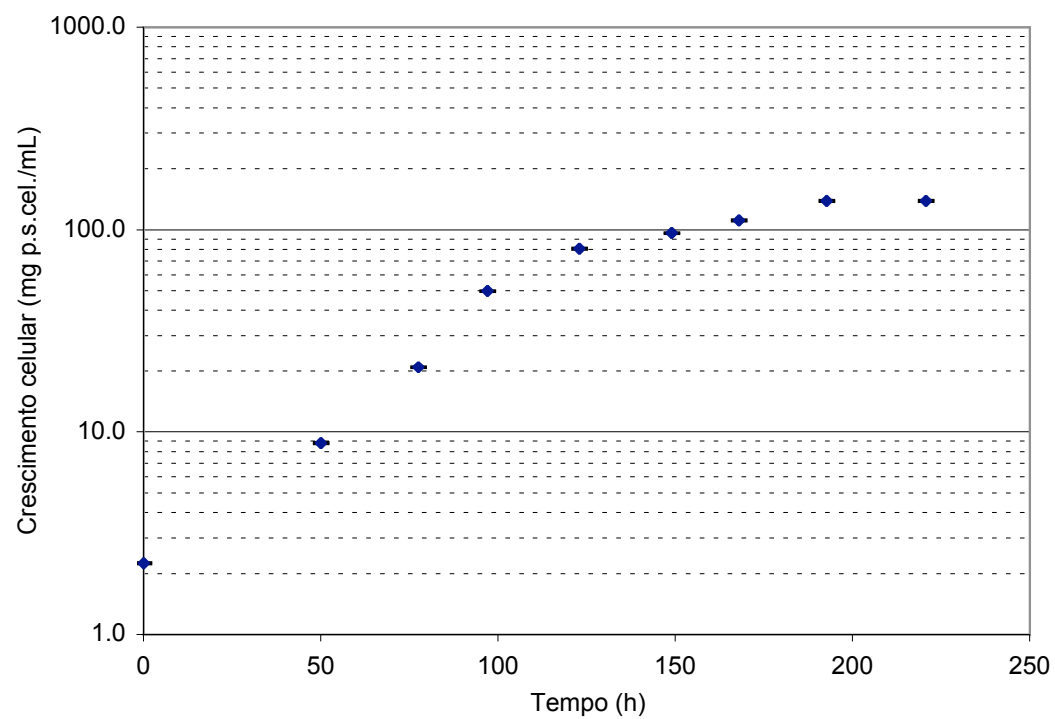
No experimento 1 foi possível observar a primeira fase exponencial de crescimento celular (Figura 5.3b) até aproximadamente 123 horas de cultivo. A fase estacionária foi evidenciada a partir de 193 horas, prolongando-se até o cultivo ser interrompido. Quanto à atividade lipásica, foram observados 3 picos (Figura 5.3a): o primeiro nos tempos iniciais (1515 U/L), o segundo em 123 horas (1496 U/L) e o terceiro em 168 horas (1508 U/L).

O crescimento celular do experimento 2 (Figura 5.4b) apresentou a primeira fase exponencial até 167 horas. Não foram evidenciadas a diauxia e a segunda fase exponencial. A fase estacionária foi observada a partir de 192 horas. O primeiro pico de atividade lipásica foi observado em 100 horas (1677 U/L) e o segundo em 148 horas (2677 U/L), conforme apresentado na Figura 5.4a .

No cultivo do experimento 3 (Figura 5.5b) foi verificada a diauxia entre 54 e 101 horas, seguida da segunda fase exponencial, até 159 horas, quando, então, as células entraram na fase estacionária até o cultivo ser interrompido. Foi observado somente um pico de atividade lipásica em 100 horas (2130 U/L) (Figura 5.5a).

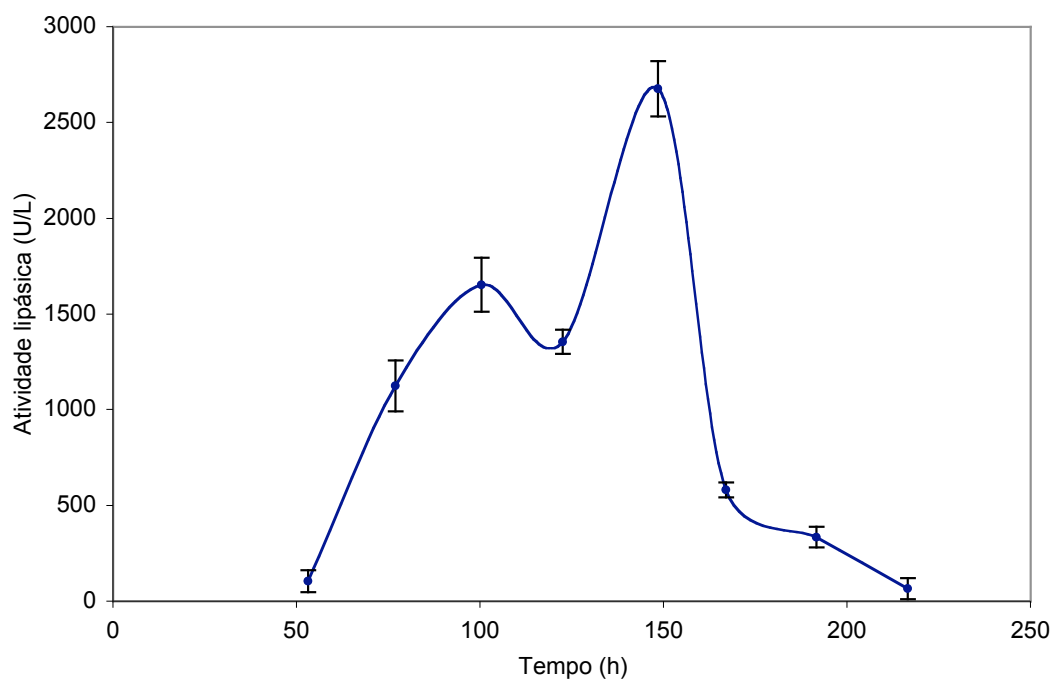


(a)

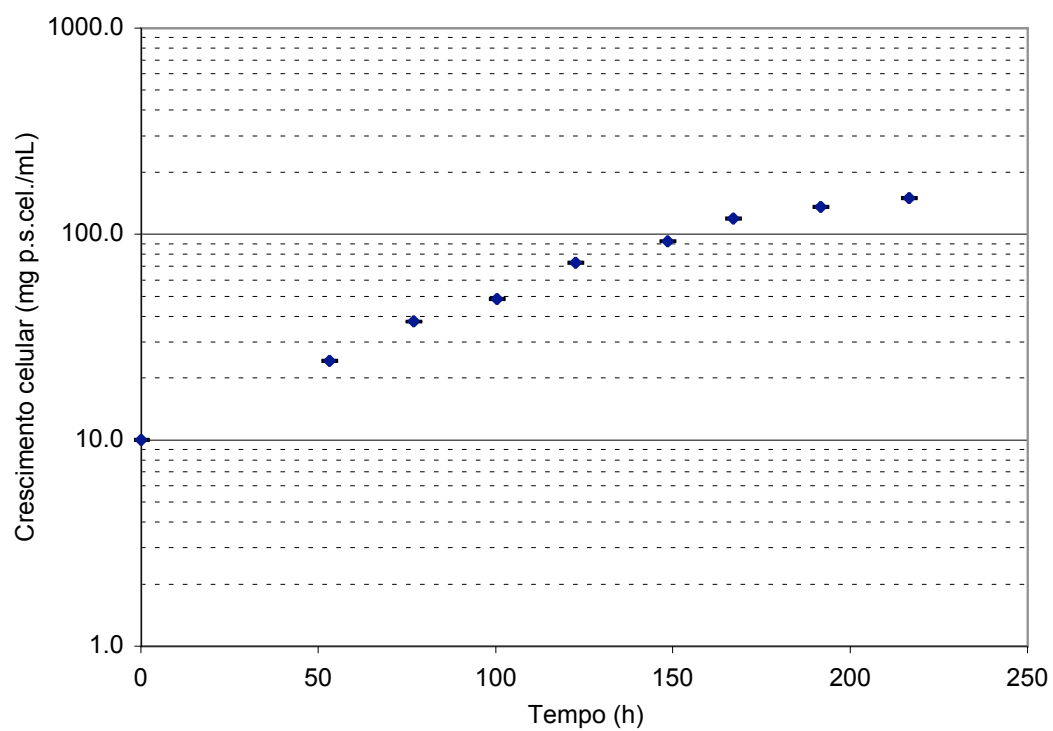


(b)

Figura 5.3 – Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 0,7% de peptona e 2,2% de inóculo (Experimento 1). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular

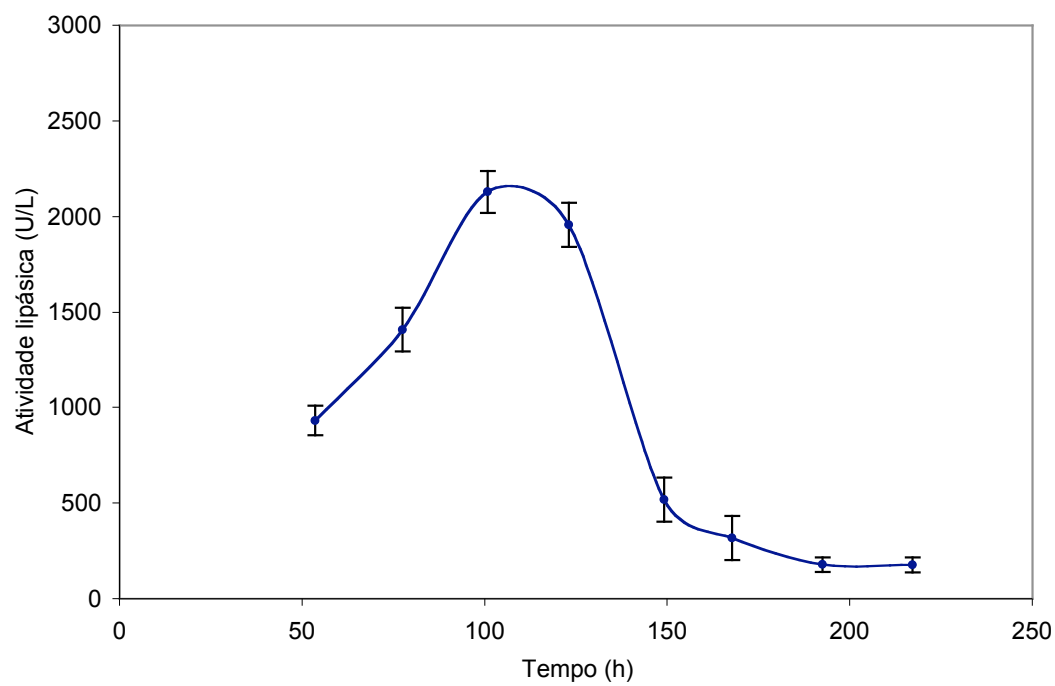


(a)

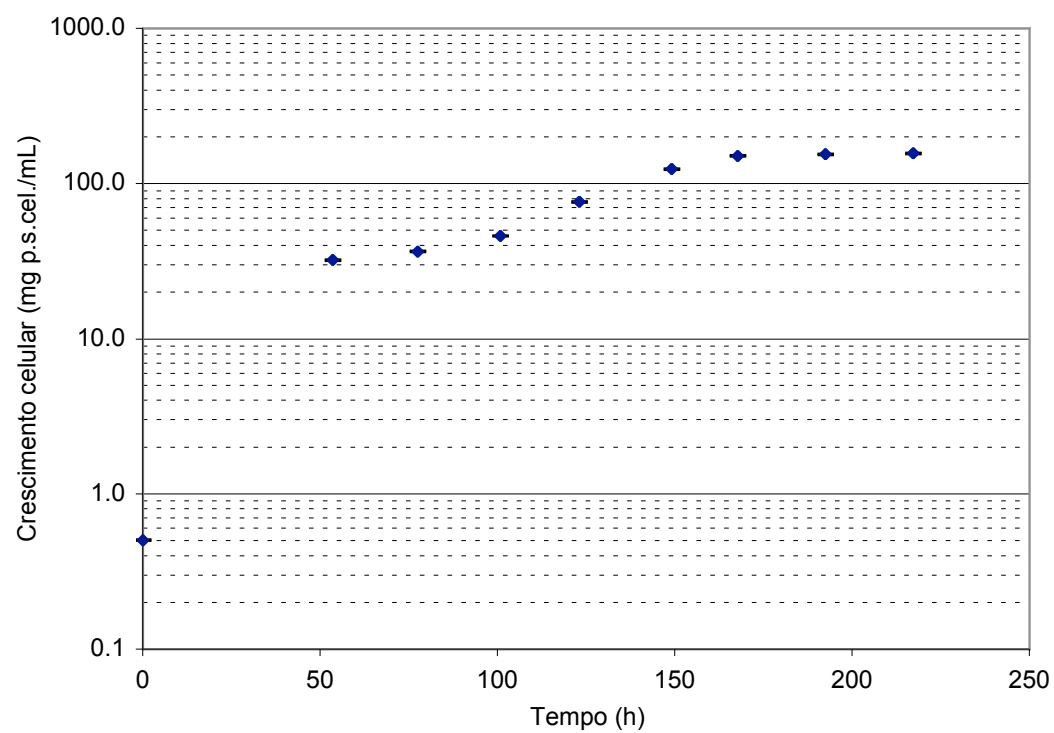


(b)

Figura 5.4 - Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 0,2% de peptona e 10% de inóculo (Experimento 2). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular



(a)



(b)

Figura 5.5 - Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 1,2% de peptona e 0,5% de inóculo (Experimento 3). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular

Através do perfil de crescimento do experimento 4 (Figura 5.6b) observa-se que a cultura encontra-se em fase estacionária entre 72 e 96 horas, após a qual se observa um decaimento da concentração celular. O perfil de atividade lipásica (Figura 5.6a) mostrou que os valores máximos de atividade lipásica (1417 U/L) são encontrados nos tempos iniciais de cultivo.

No experimento 5 foi evidenciada a primeira fase exponencial de crescimento celular (Figura 5.7b) até 119 horas, seguida da diauxia até 143 horas e da segunda fase exponencial até 171 horas. A partir daí, foi observado que as células entraram na fase estacionária, a qual se prolongou até o fim do cultivo. Foram observados dois picos de atividade lipásica, sendo o primeiro nos tempos iniciais de cultivo (930 U/L) e o segundo por volta de 171 horas (853 U/L) (Figura 5.7a).

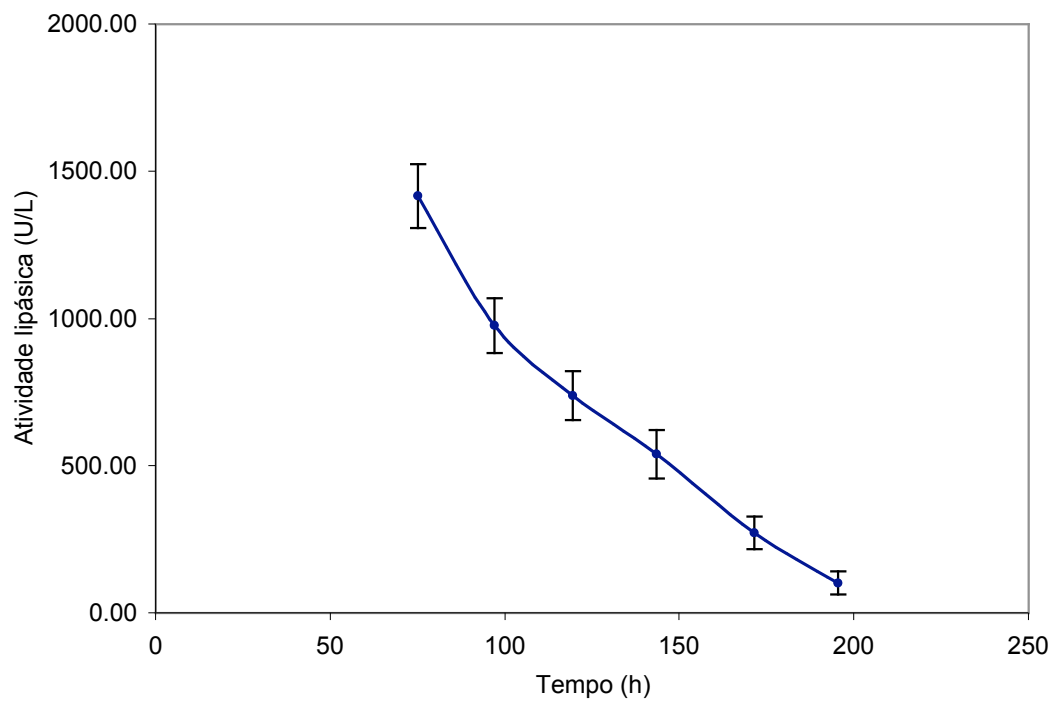
A primeira fase exponencial do experimento 6 (Figura 5.8b) foi observada até 150 horas, a partir da qual verificou-se a fase estacionária. Houve decaimento da concentração celular após 220 horas. Através da Figura 5.8a é possível observar 3 picos de atividade lipásica: em 123 horas (3536 U/L), em 169 horas (3506 U/L) e em 220 horas (3614 U/L).

No experimento 7 só foi possível observar a fase estacionária de crescimento celular (Figura 5.9b). O perfil de atividade lipásica (Figura 5.9a) apresentou somente um pico em 144 horas (1941 U/L).

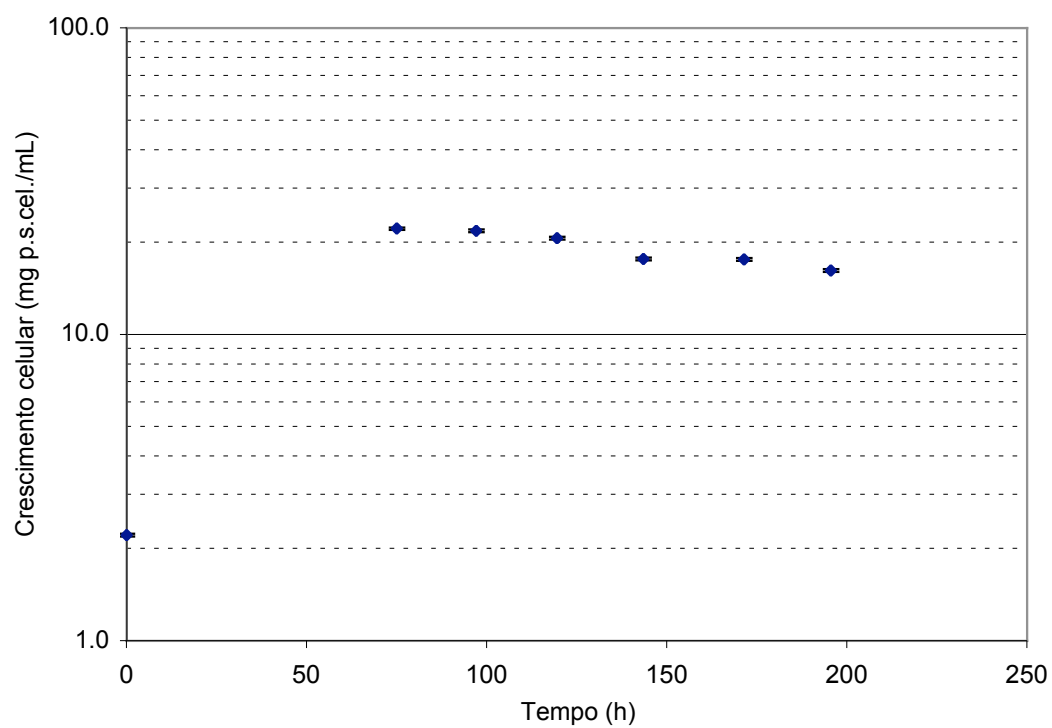
Através do perfil de crescimento do experimento 8 foi evidenciado somente o decaimento da concentração celular após o crescimento inicial (Figura 5.10b), e um único pico de atividade lipásica (Figura 5.10a) em 187 horas (1856 U/L).

O experimento 9 apresentou decaimento celular a partir de 48 horas de cultivo (Figura 5.11b). Um único pico de atividade foi observado e a atividade lipásica máxima (4815 U/L) foi obtida em 70 horas (Figura 5.11a).

No cultivo do experimento 10 (Figura 5.12b) foi evidenciada a primeira fase exponencial de crescimento até 118 horas. A fase estacionária foi observada a partir daí e se prolongou até 166 horas, quando as células entraram em decaimento. Foram verificados dois picos de atividade lipásica (Figura 5.12a): em 94 horas (2543 U/L) e em 142 horas (1911 U/L).

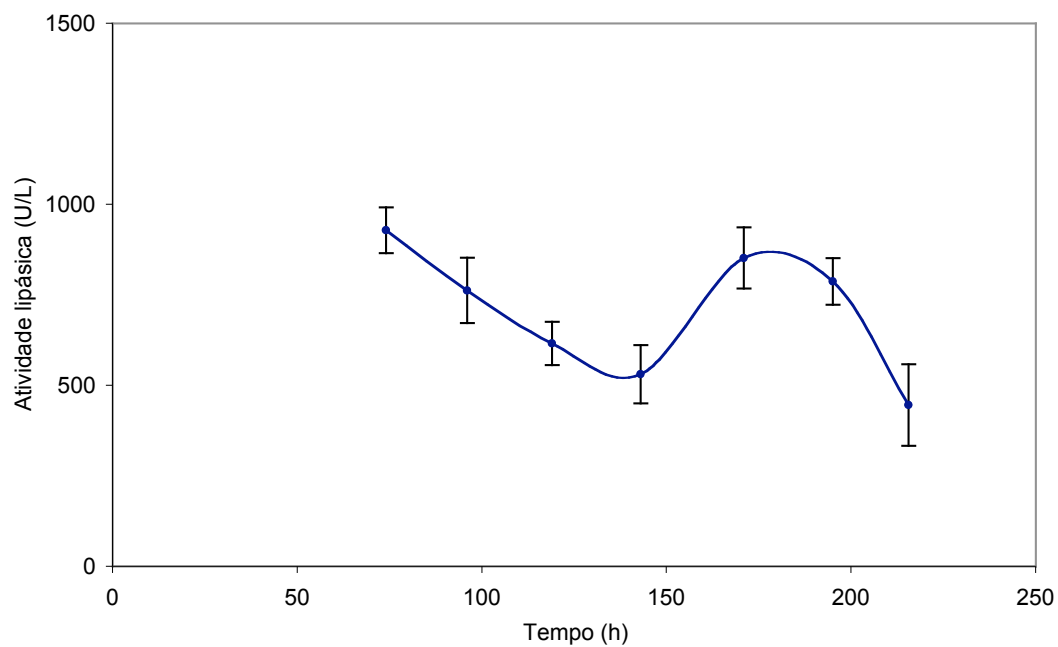


(a)

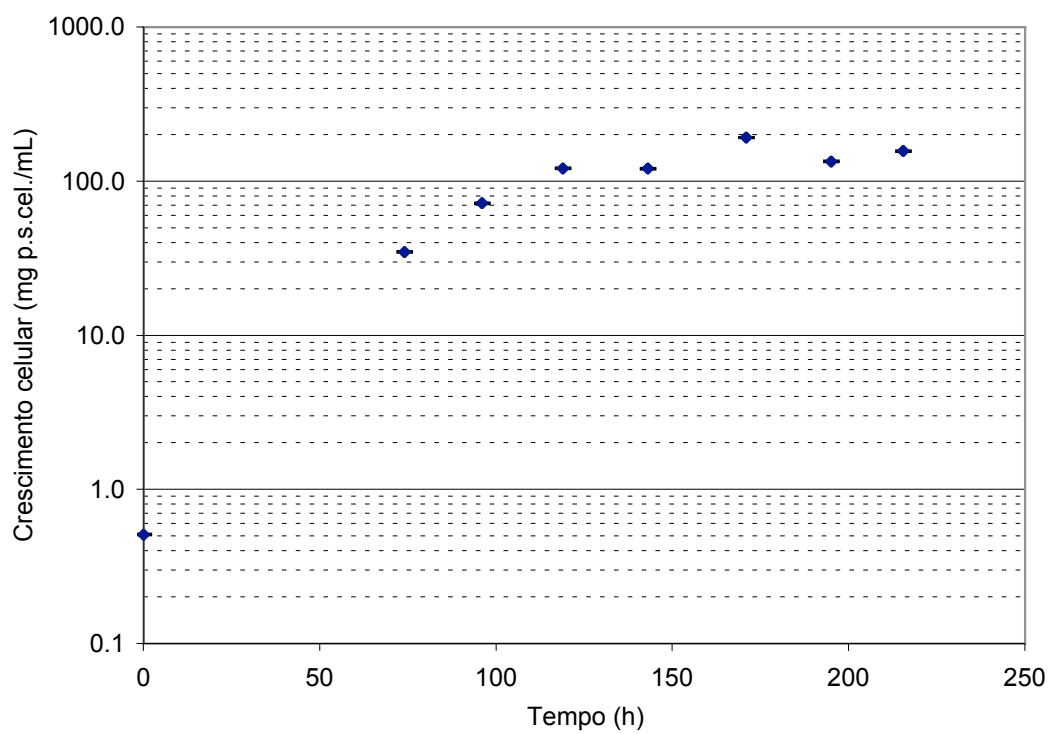


(b)

Figura 5.6 - Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 0,5% de óleo de oliva, 1,2% de peptona e 2,2% de inóculo (Experimento 4). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular

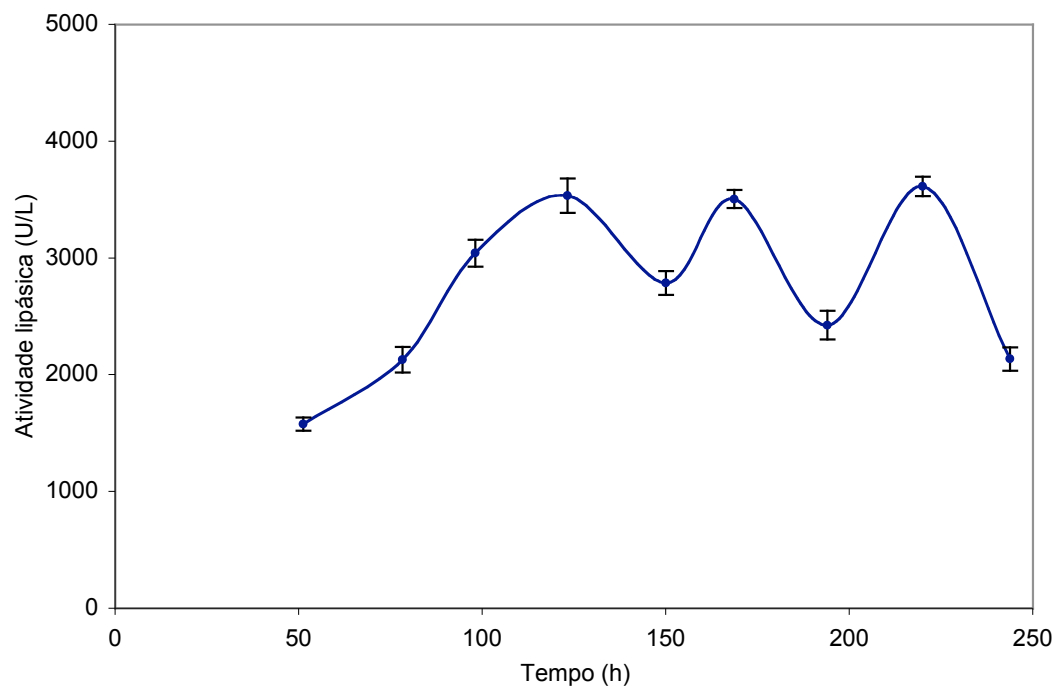


(a)

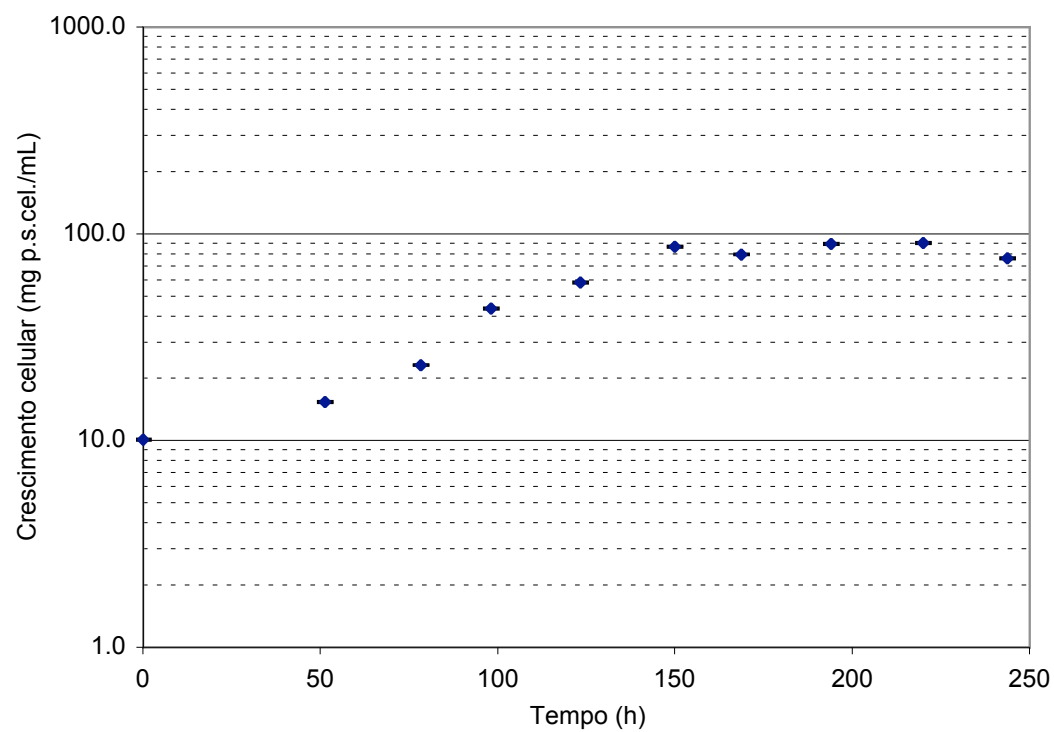


(b)

Figura 5.7 - Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 0,2% de peptona e 0,5% de inóculo (Experimento 5). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular

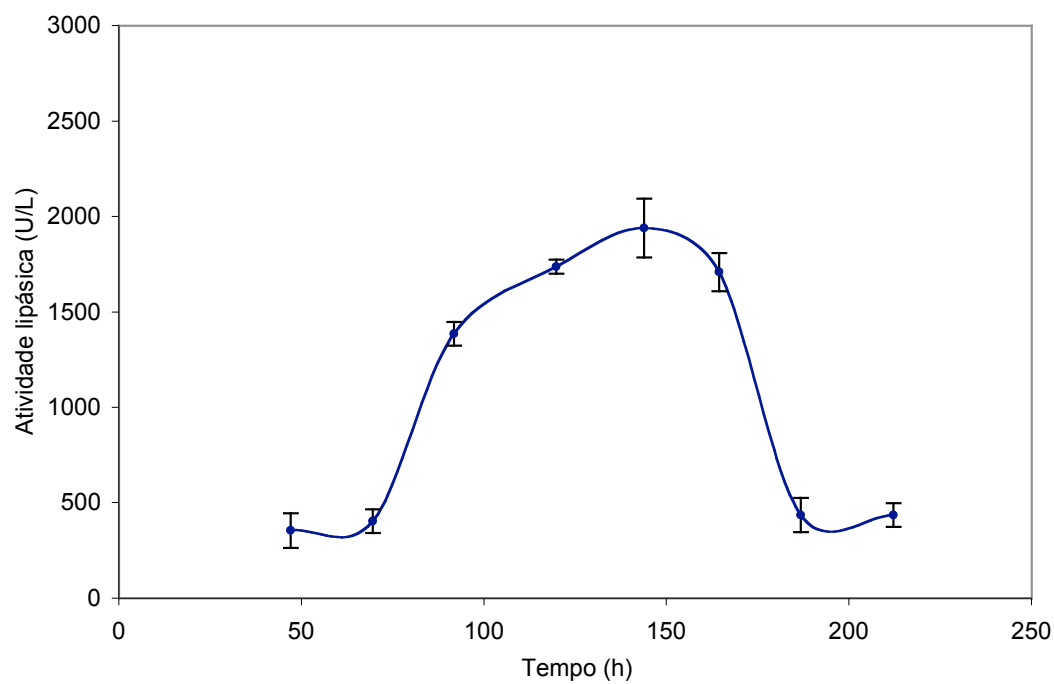


(a)

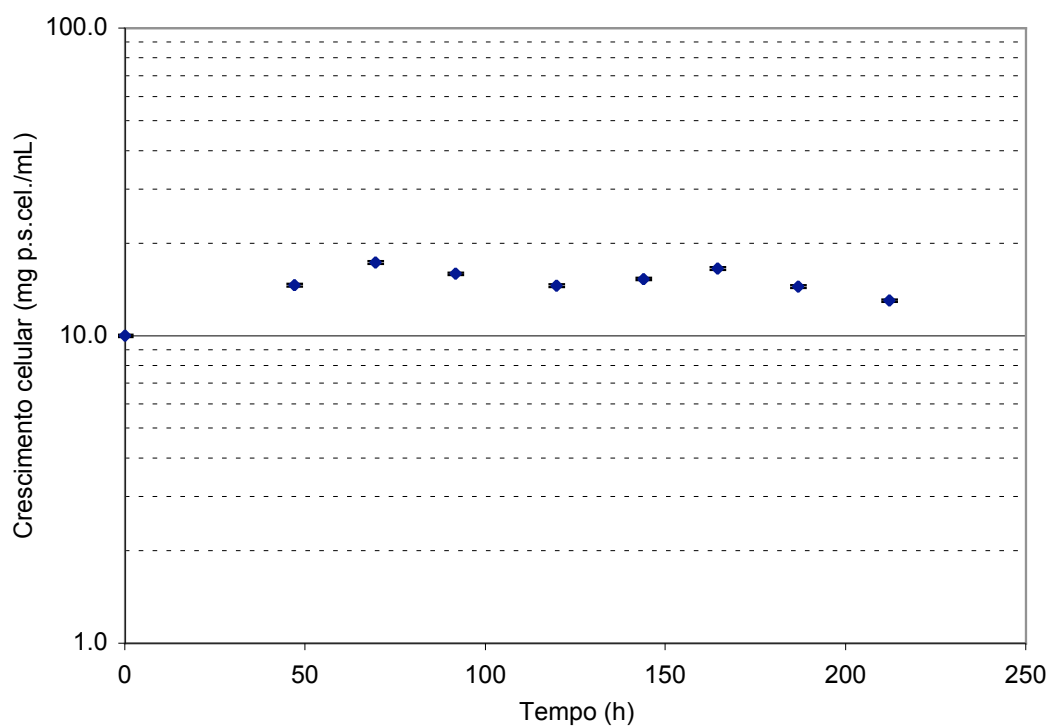


(b)

Figura 5.8 - Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 5,5% de óleo de oliva, 1,2% de peptona e 10% de inóculo (Experimento 6). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular

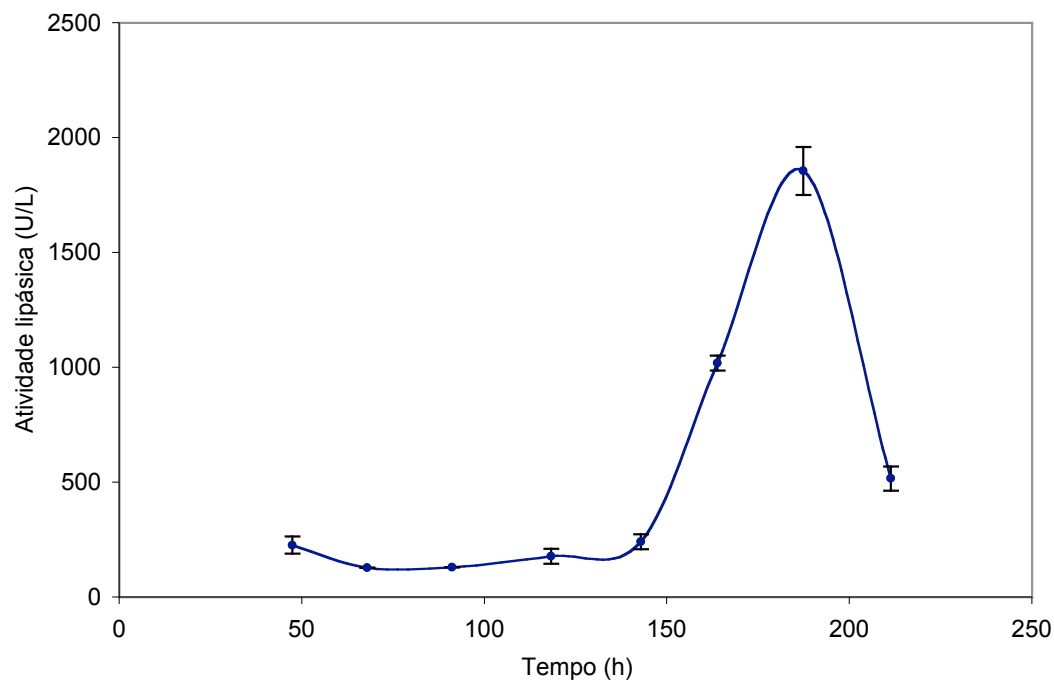


(a)

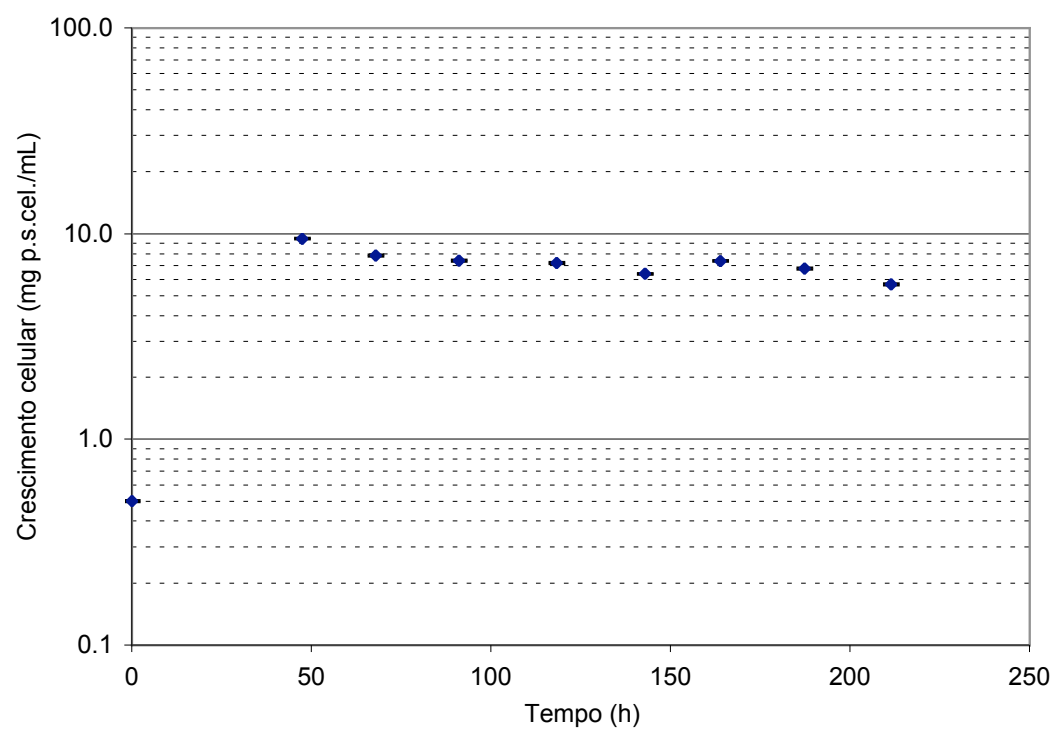


(b)

Figura 5.9 - Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 0,5% de óleo de oliva, 0,2% de peptona e 10% de inóculo (Experimento 7). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular

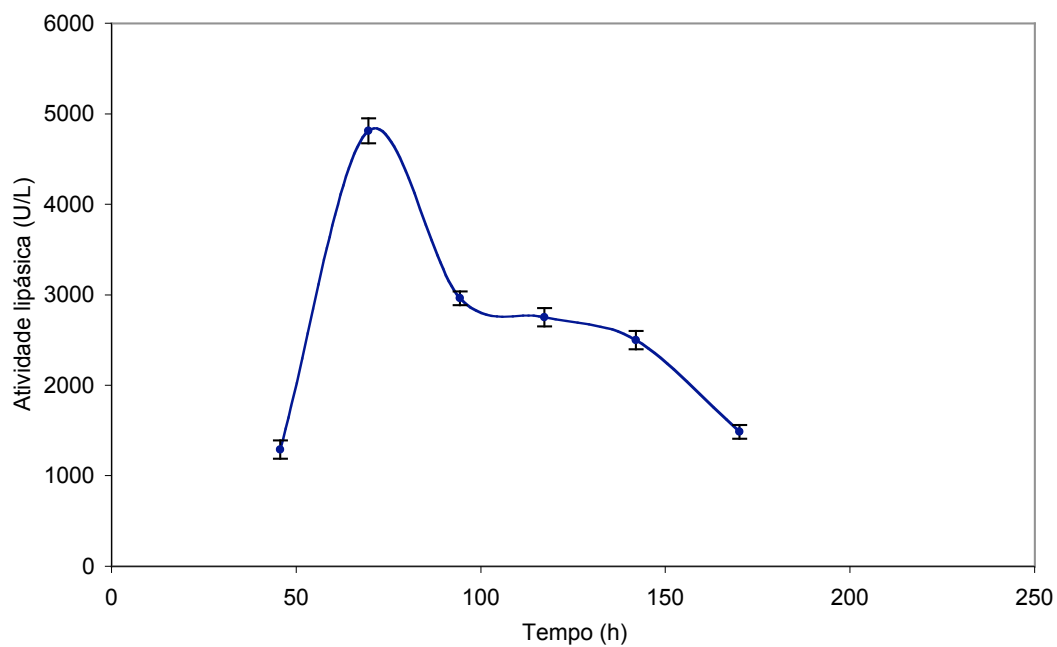


(a)

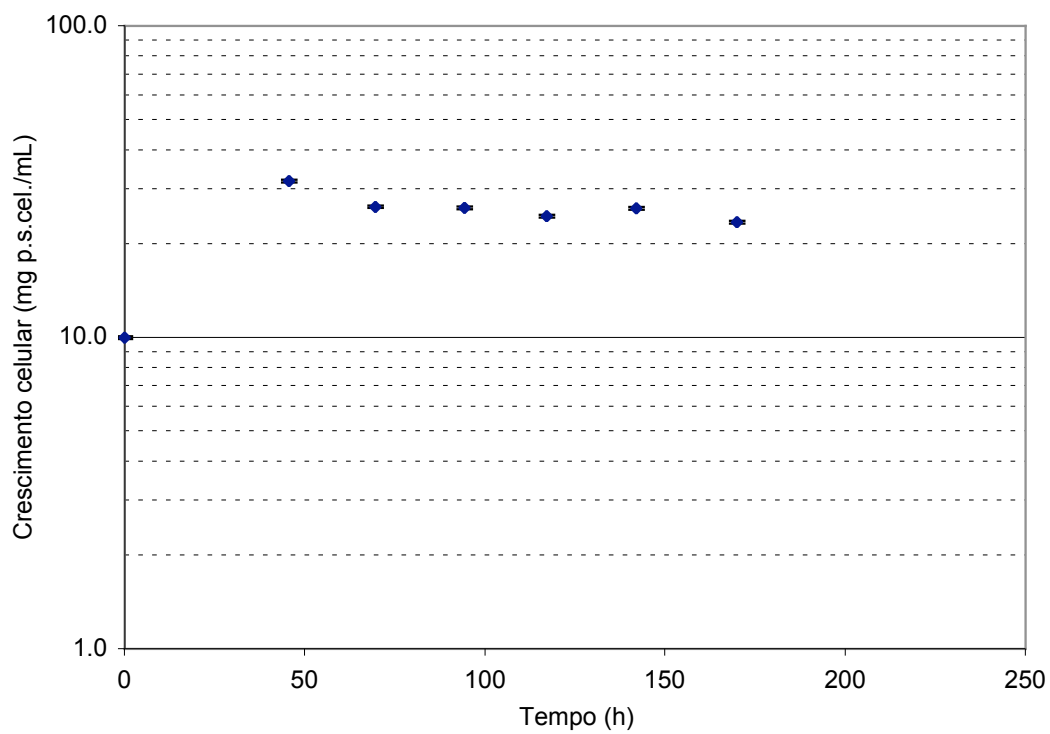


(b)

Figura 5.10 - Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 0,5% de óleo de oliva, 0,2% de peptona e 0,5% de inóculo (Experimento 8). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular

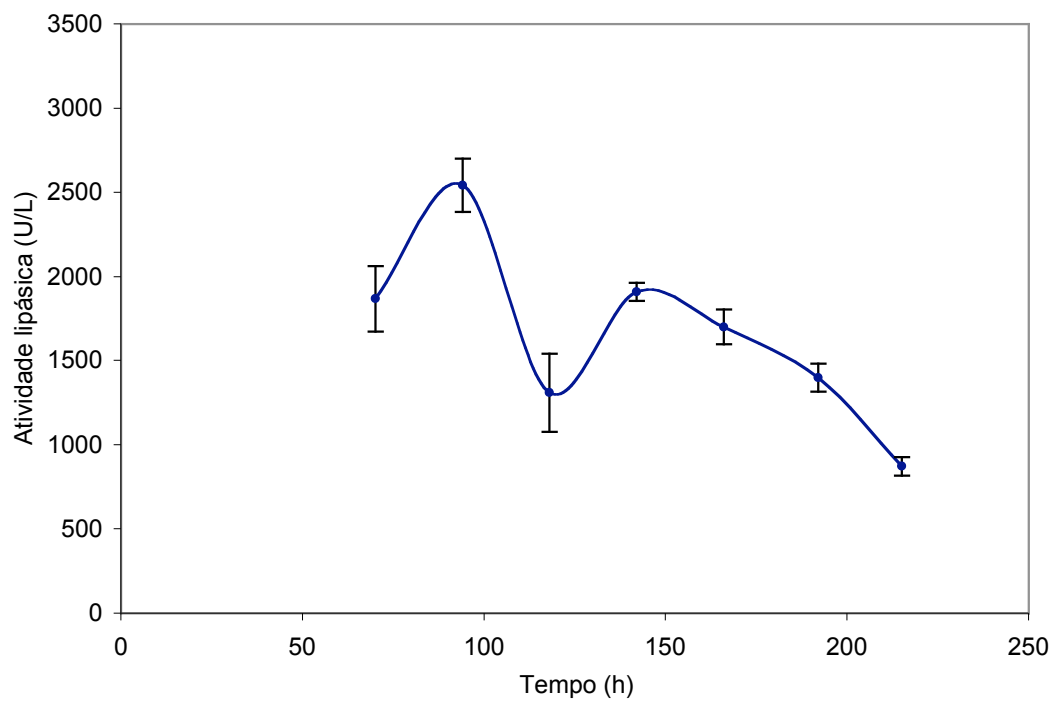


(a)

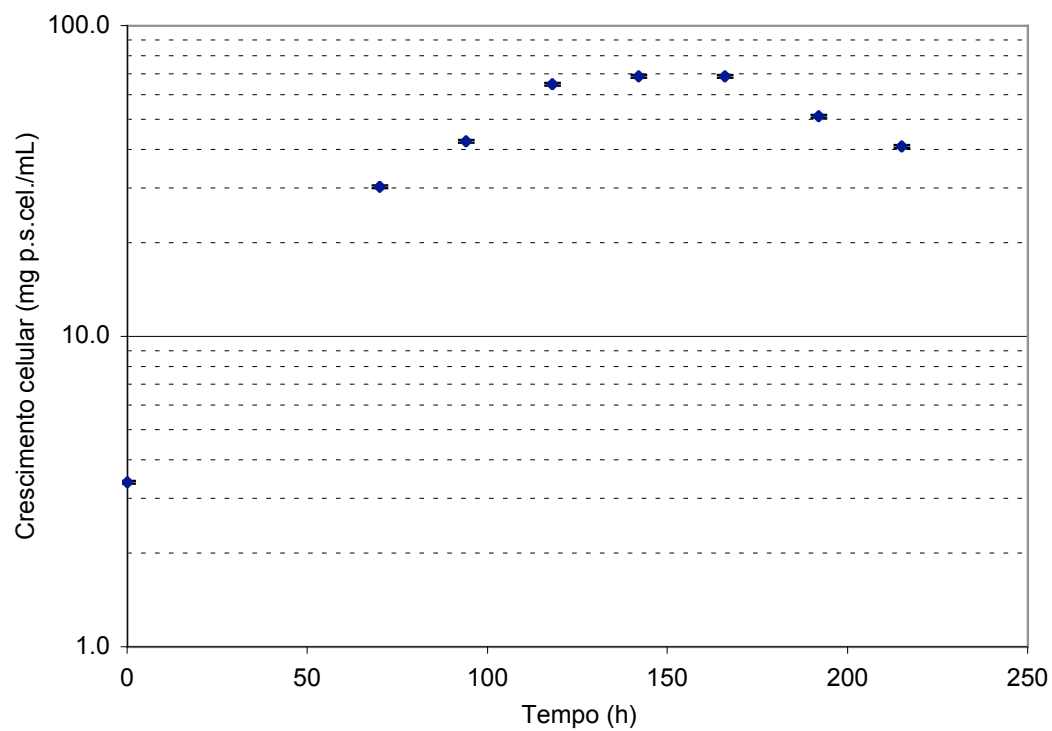


(b)

Figura 5.11 - Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 0,5% de óleo de oliva, 0,7% de peptona e 10% de inóculo (Experimento 9). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular



(a)



(b)

Figura 5.12 - Cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo 3,0% de óleo de oliva, 0,82% de peptona e 4,6% de inóculo (Experimento 10). (a) atividade lipásica, (b) crescimento celular

Conforme demonstrado, a maioria dos perfis apresentou mais de um pico de atividade lipásica. Entretanto, para efeitos de análise e comparação dos resultados serão considerados apenas os picos onde as atividades lipásicas foram máximas em cada experimento.

A Tabela 5.3 apresenta resumidamente as condições de cultivo e os resultados obtidos de cada experimento. Os tempos de reação e as concentrações de biomassa apresentados referem-se ao momento em que a atividade lipásica foi máxima.

Tabela 5.3 – Condições de cultivo e resultados obtidos para cada experimento.

Experimento	C (%)	N (%)	I₀ (mg/mL)	Atividade lipásica máxima (U/L)	Tempo (h)	Biomassa (mg/mL)
1	5,5	0,7	2,2	1515	50	8,83
2	5,5	0,2	10	2677	148	92,9
3	5,5	1,2	0,5	2130	100	46,2
4	0,5	1,2	2,2	1417	75	22,2
5	5,5	0,2	0,5	930	74	34,9
6	5,5	1,2	10	3536	123	58,3
7	0,5	0,2	10	1941	144	15,3
8	0,5	0,2	0,5	1856	187	6,80
9	0,5	0,7	10	4815	69	26,3
10	3,0	0,82	4,6	2543	94	42,5

5.5

Efeito das concentrações da fonte de carbono, da fonte de nitrogênio e do inóculo sobre a produção de lipases

A seguir serão discutidos os efeitos da variação dos três parâmetros estudados neste trabalho (C, N e I_0). Para a avaliação de tais parâmetros, foram feitas comparações entre os meios onde uma concentração variava e as demais eram mantidas constantes; por este motivo, nem todos os experimentos serão citados nas tabelas.

A Tabela 5.4 apresenta os resultados obtidos para os experimentos 7, 2, 8 e 5, onde as concentrações de peptona (N) e inóculo (I_0) foram mantidas constantes e a concentração de óleo de oliva (C) foi de 0,5 e 5,5%. A coluna “ $I_{\max}$ ” corresponde à máxima concentração celular obtida durante o cultivo.

Tabela 5.4 - Efeito da concentração de óleo de oliva.

Experimento	C (%)	N (%)	I_0 (mg/mL)	Razão C/N	Atividade lipásica máxima (U/L)	$I_{\max}$ (mg/mL)
7	0,5	0,2	10	11,0	1941	17,3
2	5,5	0,2	10	97,5	2677	150,2
8	0,5	0,2	0,5	11,0	1856	9,5
5	5,5	0,2	0,5	97,5	930	192,5

Analizando os resultados apresentados na Tabela 5.4, percebe-se que, entre os experimentos 8 e 5, o aumento da concentração de óleo de oliva de 0,5% para 5,5%, com baixas concentrações de inóculo e peptona (0,5 mg/mL e 0,2%, respectivamente), não favoreceu a produção da lipase. Entretanto, entre os experimentos 7 e 2 observa-se o contrário, ou seja, a produção foi favorecida pela maior concentração da fonte de carbono (5,5%) quando altas concentrações de inóculo (10 mg/mL) e baixas concentrações de peptona (0,2%) foram utilizadas.

O efeito da concentração de carbono sobre a produção de lipases por células de *Yarrowia lipolytica* foi estudado empiricamente por Pereira-Meirelles (1997), utilizando diferentes concentrações iniciais de óleo de oliva (0,5; 1,0; 2,0 e 5,0%) e

concentração de peptona igual a 0,64%. A concentração de inóculo era de 0,5 mg p.s.cel./mL. Os teores de enzimas obtidos foram bem distintos, sendo a atividade lipásica máxima (aproximadamente 40 U/g cel.) obtida quando a concentração inicial foi igual a 1,0%. Para a concentração de 0,5% a atividade lipásica obtida foi de aproximadamente 10 U/g cel.. Foi demonstrado que, concomitantemente à lipase, outras enzimas, como proteases são produzidas durante o cultivo em frascos agitados. Dessa forma, foi observado que a atividade lipásica medida representava um balanço entre a atividade lipásica produzida e a degradada pela protease. A concentração de 1,0% forneceu menor atividade proteásica, em oposição às concentrações de 2,0% e 5,0%, o que provavelmente contribuiu para a diminuição dos níveis de lipase em altas concentrações de óleo de oliva. Assim como nos experimentos 2 e 5 do presente trabalho, foi observado um aumento na massa celular em concentrações mais altas de óleo de oliva, sugerindo que o meio ainda dispunha de outros nutrientes (fontes de oxigênio, nitrogênio etc) suficientes para o crescimento celular.

Lima e col. (2003) também variaram a concentração inicial de óleo de oliva (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) na produção de lipases por *Penicillium aurantiogriseum* em frascos agitados. O meio contendo 0,5% apresentou melhores rendimentos (2,5 U/mL em 24 horas). Nas concentrações de 1,5% e 2,0% os picos de atividade foram bem menores, sugerido um efeito inibitório quando altas concentrações de substrato são utilizadas na fermentação, provavelmente devido à baixa transferência de oxigênio no meio. Sabe-se que baixo suprimento de oxigênio pode alterar o metabolismo dos fungos e, como consequência, a produção de lipases.

Ao utilizar uma concentração intermediária de óleo (3,0%) no experimento 10, altos teores de lipase também foram obtidos (2543 U/L), embora ainda inferiores aqueles obtidos para os experimentos 6 e 9.

Com o objetivo de avaliar qual a melhor concentração inicial de peptona no meio de cultivo, foram comparados os experimentos 2, 6, 5, 3, 7 e 9, em que as concentrações de óleo de oliva e inóculo foram mantidas constantes. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.5. A coluna “ $I_{\max}$ ” corresponde à máxima concentração celular obtida durante o cultivo.

Tabela 5.5 - Efeito da concentração de peptona.

Experimento	C (%)	N (%)	I ₀ (mg/mL)	Razão C/N	Atividade lipásica máxima (U/L)	I _{max} (mg/mL)
2	5,5	0,2	10	97,5	2677	150,2
6	5,5	1,2	10	24,2	3536	90,5
5	5,5	0,2	0,5	97,5	930	192,5
3	5,5	1,2	0,5	24,2	2130	157,3
7	0,5	0,2	10	11,0	1941	17,3
9	0,5	0,7	10	5,5	4815	31,8

Como pode ser observado, o aumento da concentração de peptona de 0,2% para 0,7% ou 1,2% favoreceu a produção de lipases, independente da concentração de óleo de oliva e inóculo nas faixas utilizadas. A concentração de 0,7% de peptona, nas condições de pouco carbono (0,5%) – razão C/N igual a 5,5 – e muito inóculo (10 mg/mL), foi a melhor para a produção, já que foi alcançada a maior atividade lipásica (experimento 9).

Lima e col (2003) reportaram que, tipicamente para fungos, altas concentrações de nitrogênio – e baixas razões C/N – são requeridas. Pelos resultados apresentados na Tabela 5.5, o mesmo parece ocorrer para *Yarrowia lipolytica* quando a concentração da fonte de carbono é mantida constante e a razão C/N é baixa em função de concentrações maiores de nitrogênio.

Pereira-Meirelles (1997) observou que a relação C/N (na faixa de 4 a 21) não influenciava o processo quando a concentração de óleo de oliva (1,0%) era mantida constante, sendo a produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* influenciada mais pelo tipo de fonte de nitrogênio do que pela razão C/N nas condições estudadas.

A formação de menos biomassa nos experimentos 7 e 9 sugere que, em tais condições, os nutrientes (carbono e nitrogênio) estariam sendo utilizados preferencialmente para a produção da enzima.

Para o experimento 1, onde também foi utilizada a concentração de 0,7% de peptona, a atividade lipásica foi bem menor (1515 U/L) quando comparada ao experimento 9. A máxima concentração celular obtida foi de 139,4 mg/mL sugerindo

que, nas condições deste experimento, os nutrientes foram consumidos, talvez preferencialmente, para a produção de biomassa.

Para verificar o efeito da concentração de inóculo, foram comparados os resultados obtidos nos meios 5, 2, 3, 6, 8 e 7 (Tabela 5.6). A coluna “ $I_{\max}$ ” corresponde à máxima concentração celular obtida durante o cultivo.

Tabela 5.6 - Efeito da concentração de inóculo.

Experimento	C (%)	N (%)	I_0 (mg/mL)	Razão C/N	Atividade lipásica máxima (U/L)	$I_{\max}$ (mg/mL)
5	5,5	0,2	0,5	97,5	930	192,5
2	5,5	0,2	10	97,5	2677	150,2
3	5,5	1,2	0,5	24,2	2130	157,3
6	5,5	1,2	10	24,2	3536	90,5
8	0,5	0,2	0,5	11,0	1856	9,5
7	0,5	0,2	10	11,0	1941	17,3

Comparando-se os pares de experimentos 5 e 2, 3 e 6, é possível notar que o aumento da concentração de inóculo de 0,5 mg/mL para 10 mg/mL favoreceu a produção de lipases, tanto para razão C/N de 97,5 quanto para a de 24,2.

Entre os experimentos 8 e 7, considerando as incertezas expandidas que serão apresentadas no item 5.7, não houve diferença entre as atividades lipásicas com o aumento do inóculo e com razão C/N mais baixa (11,0). De fato, é de se esperar que com baixas concentrações de carbono e nitrogênio (0,5% e 0,2%) no meio, não adiantaria aumentar a concentração de inóculo, pois não há nutrientes suficiente para produzir muita enzima e muita biomassa.

O aumento da concentração de inóculo de 0,5 mg/mL para 2,2 mg/mL, com diferentes concentrações da fonte de carbono e nitrogênio não ocasionou níveis superiores de atividade lipásica, conforme foi observado para os experimentos 1 (1515 U/L) e 4 (1417 U/L).

Para Valero (1990) e Pereira-Meirelles (1997) a escolha da concentração de inóculo mostrou ser um fator determinante para a produção de lipases, em células de

C. rugosa e *Yarrowia lipolytica*, respectivamente. Valero (1990) utilizou inóculos de 1% ($2,1 \times 10^5$ cfu/mL) e 10% ($3,0 \times 10^6$ cfu/mL) em meios contendo 0,1% de uréia e 1% de óleo de oliva, sendo alcançada a maior atividade lipásica (3600 U/L) no primeiro caso. Com células de *Yarrowia lipolytica*, foram utilizados inóculos de 0,1; 0,4; 1,0; 2,0 e 10,0 mg/mL, em meios com 1,0% de óleo de oliva e 0,64% de peptona. Foi verificado que, inicialmente, o aumento da concentração levou ao aumento da atividade lipásica, que por sua vez atingiu um valor máximo quando as concentrações de inóculo 1,0 e 2,0 mg/mL foram utilizadas, embora em tempos de cultivo bem maiores (aproximadamente 170 horas) do que aqueles observados para as demais concentrações. A concentração de inóculo de 10 mg/mL levou à obtenção de valores menores de atividade lipásica e níveis de protease altos, o que, portanto, poderia ser responsável pela diminuição da atividade lipásica neste caso.

5.6

Planejamento experimental para a produção de lipases de *Yarrowia lipolytica*

A Equação 5.1 apresenta o modelo proposto em 4.2 (Equação 4.1) com os coeficientes calculados através do método dos mínimos quadrados a partir dos valores experimentais. Na equação, y representa a atividade lipásica e ξ_1 , ξ_2 , ξ_3 representam as variáveis codificadas C, N e I, respectivamente.

$$y = 1758 - 337,1\xi_1 + 804,4\xi_2 + 372,7\log\xi_3 + 93,8\xi_1^2 - 1866\xi_2^2 + 2669(\log\xi_3)^2 - 289,6\xi_1\xi_2 + 415,5\xi_1\log\xi_3 - 85,2\xi_2\log\xi_3 \quad (\text{Equação 5.1})$$

A Tabela 5.7 apresenta as respostas obtidas experimentalmente (y), as respostas preditas ($\hat{y}$) obtidas através do modelo (Equação 5.1) e os valores dos resíduos (e) os quais correspondem à diferença entre as duas respostas. Como verifica-se, os resíduos são nulos para todos os experimentos, indicando que o modelo proposto está bem adequado para o processo em questão.

Tabela 5.7 – Valores dos resíduos (e) para todos os experimentos. Valores em U/L.

Experimento	y	$\hat{y}$	$e = y - \hat{y}$
1	1515	1515	0,0
2	2677	2677	0,0
3	2130	2130	0,0
4	1417	1417	0,0
5	930	930	0,0
6	3536	3536	0,0
7	1941	1941	0,0
8	1856	1856	0,0
9	4815	4815	0,0
10	2543	2543	0,0

As curvas de nível da superfície de resposta obtidas através do modelo proposto (Equação 5.1), em gráficos de atividade lipásica máxima contra as variáveis codificadas ξ_1 e ξ_2 , com concentração de inóculo fixa são apresentadas nas Figuras 5.13 a 5.15.

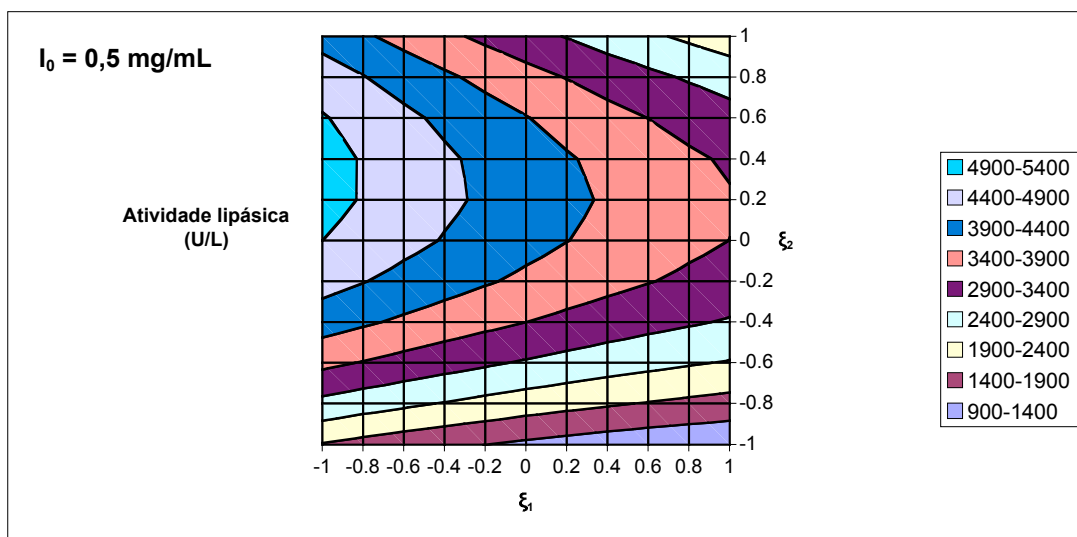


Figura 5.13 – Curvas de nível da superfície de resposta da atividade lipásica máxima contra a concentração de carbono (ξ_1) e nitrogênio (ξ_2) com a concentração de inóculo fixa em 0,5 mg/mL.

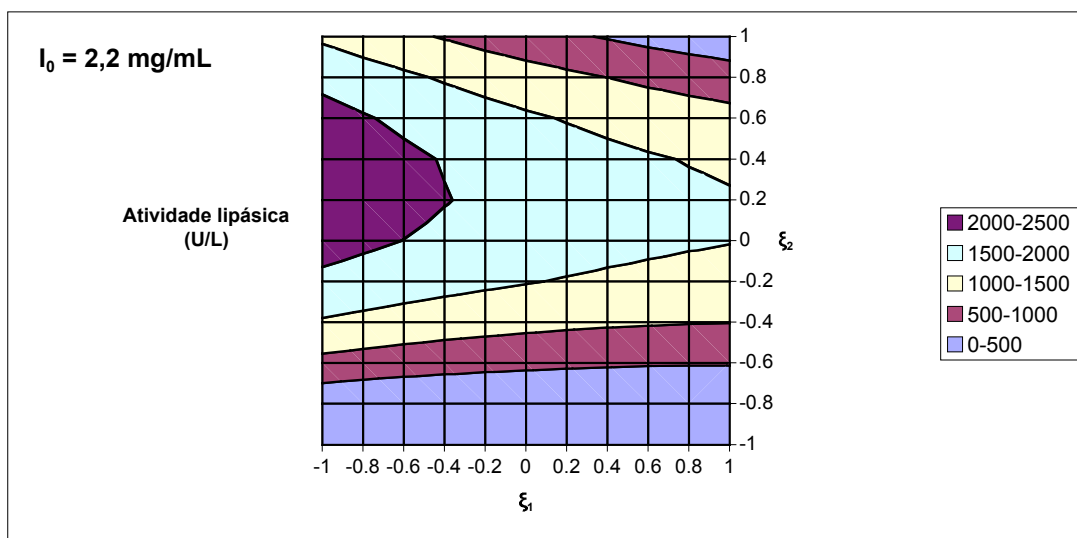


Figura 5.14 – Curvas de nível da superfície de resposta da atividade lipásica máxima contra a concentração de carbono (ξ_1) e nitrogênio (ξ_2) com a concentração de inóculo fixa em 2,2 mg/mL.

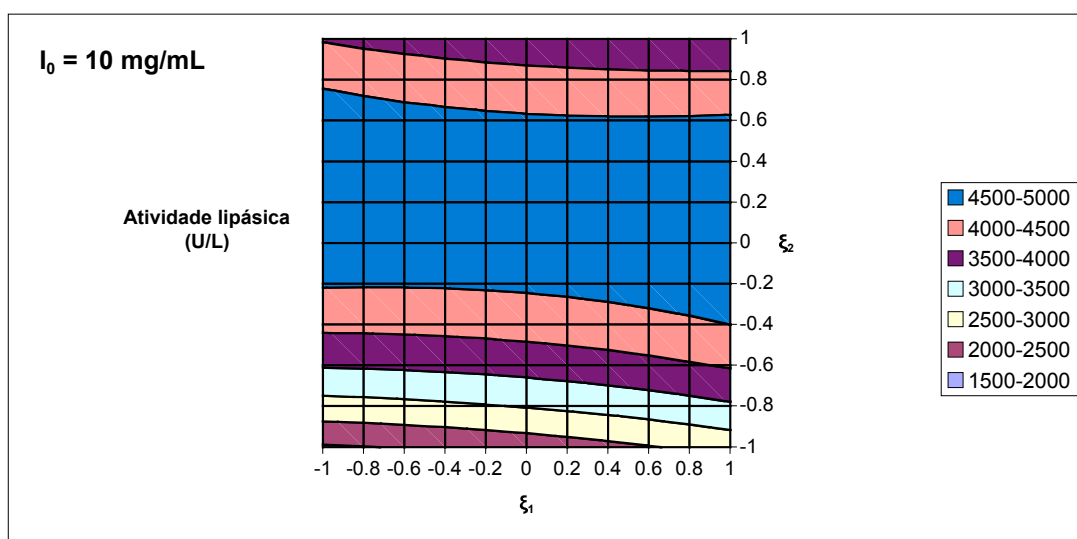


Figura 5.15 – Curvas de nível da superfície de resposta da atividade lipásica máxima contra a concentração de carbono (ξ_1) e nitrogênio (ξ_2) com a concentração de inóculo fixa em 10 mg/mL.

Para concentrações de inóculo de 0,5 mg/mL, a partir do modelo proposto (Equação 5.1), maiores atividades lipásicas (4900 a 5400 U/L) podem ser obtidas, porém em condições diferentes das testadas neste trabalho, como pode ser visualizado na Figura 5.13.

O aumento da concentração de inóculo de 0,5 mg/mL para 2,2 mg/mL, com diferentes concentrações de óleo de oliva e peptona (Figura 5.14) não promove aumento no teor de lipases, como apresentado no item 5.5.

Analisando a Figura 5.15, é possível observar que as maiores atividades lipásicas (4500 a 5000 U/L) aparecem na área central escura, exatamente onde se encontram as condições do experimento 9 (0,5% de óleo de oliva, $\xi_1 = -1$, e 0,7% de peptona, $\xi_2 = 0$). Portanto, dentre as estudadas, as concentrações deste experimento são as melhores para o cultivo de células de *Yarrowia lipolytica*, com vistas à produção de lipases. Um fator relevante do ponto de vista da produção é que o meio utilizado é economicamente viável.

A Tabela 5.8 apresenta os resultados de atividade enzimática máxima (U/L), produtividade volumétrica (U/L h) e produtividade específica (U/mg p.s.cel. h) para todos os experimentos planejados. Além da maior atividade lipásica, o experimento 9 também apresentou o maior valor de produtividade volumétrica. O experimento 6 apresentou altos teores de lipase (3536 U/L), porém com 123 horas de cultivo, em contraste com as 70 horas do experimento 9; conseqüentemente, a produtividade volumétrica foi mais baixa: 28,68 U/L h.

A produtividade específica do experimento 1 foi a maior apresentada (3,43 U/mg h). Entretanto os níveis de lipases foram bem inferiores (1515 U/L), em comparação com os outros valores encontrados. Para se obter atividade lipásica próxima à obtida no experimento 9 (4815 U/L), o experimento 1 deveria ser repetido por três vezes. Além disso, a concentração da fonte de carbono do mesmo é de 5,5%, tornando o custo da produção ainda mais alto.

Em frascos agitados, também com células de *Yarrowia lipolytica*, Corzo e Revah (1999) e Pereira-Meirelles (1997) reportaram 2300 U/L e 2700 U/L de atividade lipásica máxima, e 34,8 U/L h e 19,0 U/L h de produtividade volumétrica, respectivamente. O primeiro autor utilizou o método RSM para otimização da produção.

Tabela 5.8 – Parâmetros de produção de lipases por células de *Yarrowia lipolytica*

Experimento	Atividade lipásica máxima (U/L)	Produtividade volumétrica (U/L h)	Produtividade específica (U/mg p.s.cel h)
1	1515	30,30	3,43
2	2677	18,03	0,19
3	2130	21,14	0,46
4	1417	18,89	0,85
5	930	12,56	0,36
6	3536	28,68	0,49
7	1941	13,49	0,88
8	1856	4,77	0,50
9	4815	69,28	2,63
10	2543	27,05	0,64

Atividades lipásicas máximas na mesma ordem de grandeza daquela obtida no experimento 9 foram obtidas por Martins (2001) e Alonso (2001) apenas em fermentador de bancada (4240 U/L e 4680 U/L, respectivamente), também utilizando células de *Yarrowia lipolytica*. Por outro lado, as produtividades volumétricas observadas foram bem inferiores (25,5 U/L h e 20,0 U/L h, respectivamente), em meios de cultivo que apresentavam condições próximas em relação às concentrações de nutrientes (1,0% de óleo de oliva e 0,64% de peptona) e valores diferentes de inóculo (4,0 e 2,0 mg/mL, respectivamente).

Comparando os valores obtidos pelos autores citados acima com os apresentados neste trabalho, verifica-se que a otimização utilizando o planejamento D-optimal favoreceu a produção em frascos agitados, nas condições estudadas,

permitindo a obtenção de atividades enzimáticas em níveis só obtidos anteriormente em fermentador e com produtividades volumétricas bem superiores.

5.7

Estimativa da incerteza de medição da atividade lipásica

A partir de todas as incertezas padronizadas calculadas como descrito no item 4.10, foi obtida a incerteza expandida U para a atividade lipásica. A Tabela 5.9 apresenta as atividades lipásicas máximas de cada experimento realizado, com as respectivas incertezas expandidas e os fatores de abrangência (k). São apresentados valores em U/L e em $\mu\text{kat/L}$ (unidade SI).

Tabela 5.9 – Incertezas expandidas estimadas para a atividade lipásica.

Experimento	Atividade lipásica máxima		U		k
	(U/L)	($\mu\text{kat/L}$)	(U/L)	($\mu\text{kat/L}$)	
1	1515	25,3	120	2,0	3,31
2	2677	44,6	140	2,3	3,31
3	2130	35,5	110	1,8	3,31
4	1417	23,6	108	1,8	3,31
5	930	15,5	63	1,1	3,31
6	3536	58,9	146	2,4	3,31
7	1941	32,4	154	2,6	3,31
8	1856	30,9	105	1,8	3,31
9	4815	80,3	137	2,3	3,31
10	2543	42,4	158	2,6	3,31

A incerteza expandida estimada, para a qual levou-se em consideração todas as possíveis fontes de contribuição (incertezas Tipo A e Tipo B), foi percentualmente menor para o experimento 9 do que aquelas declaradas pelo BCR para os materiais de

referência BCR-693 e BCR-694 (1734 ± 72 U/L e 1044 ± 60 U/L, respectivamente), onde apenas a incerteza Tipo A foi avaliada (Ferard e col., 2002).

Através dos resultados apresentados neste trabalho, é possível sugerir a produção de lipases por células de *Yarrowia lipolytica* com vistas à obtenção de materiais de referência certificados, uma vez que um dos requisitos para tal aplicação é a que a enzima apresente alta atividade catalítica, o que foi verificado no experimento 9 (4815 ± 137 U/L), acompanhada da declaração da incerteza para um nível de confiança estabelecido. Estudos posteriores para avaliar outros requisitos como alto grau de purificação e estabilidade da enzima se fazem necessários, com o intuito de garantir a qualidade e confiabilidade necessária ao MRC.