



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

## **TESE DE DOUTORADO**

### **UTILIZAÇÃO DE SEMENTES DE FAVELEIRA (*Cnidocolus phyllacanthus*) EM PROCESSOS ENZIMÁTICOS COM FUNGO *Rhizopus* sp.**

Haroldo Luis Sousa Neres  
Doutorando

Dra. Carla Verônica Rodarte de Moura  
Orientadora

Teresina - PI, Março de 2017

**HAROLDO LUIS SOUSA NERES**

**UTILIZAÇÃO DE SEMENTES DE FAVELEIRA  
(*Cnidoscolus phyllacanthus*) EM PROCESSOS ENZIMÁTICOS  
COM FUNGO *Rhizopus* sp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Carla Verônica Rodarte de Moura

Teresina - PI, Março de 2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

N444u Neres, Haroldo Luis Sousa.  
Utilização de sementes de faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus*) em processos enzimáticos com fungo *Rhizopus* sp. / Haroldo Luis Sousa Neres, 2017.  
107 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO) – Universidade Federal do Piauí, 2017.  
“Orientação: Profª Drª Carla Verônica Rodarte de Moura.”

1. Faveleira. 2. *Rhizopus*. 3. Lipase. 4. Processos Fermentativos. I. Título.

CDD 660.634

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: HAROLDO LUÍS SOUSA NERES

TÍTULO DO PROJETO: "Utilização de sementes de faveleira (*cnidoscolus phyllacanthus*) em processos enzimáticos com fungo *Rhizopus* sp."

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Carla Verônica Rodarte de Moura

| BANCA EXAMINADORA:   | CONCEITO        | ASSINATURA               |
|--|-----------------|--------------------------|
| Profa. Dra. Carla Verônica Rodarte de Moura - UFPI<br>(Presidente)       | <u>aprovado</u> | <u>CarlaRodarteMoura</u> |
| Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes - UFPI<br>(Examinador)                 | <u>Aprovado</u> | <u>LivioCes</u>          |
| Profa. Dra. Maria Marlúcia Gomes Pereira Nóbrega – UFPI<br>(Examinadora) | <u>APROVADO</u> | <u>MariaNobrega</u>      |
| Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus - UFPI<br>(Examinador)                  | <u>Aprovado</u> | <u>J.R.J.</u>            |
| Profa. Dra. Thiciana da Silva Sousa - UFPI<br>(Examinadora)              | <u>aprovado</u> | <u>ThicianSfSouza</u>    |

DATA DA AVALIAÇÃO: 06 de março de 2017.

HORÁRIO: 08:30h

LOCAL: Auditório do Departamento de Química /UFPI.

## DEDICATÓRIA

*“Aos meus pais, Antônio Gomes Pereira Neres e Maria dos Remédios Silva Sousa, pelo imensurável esforço dispensado ao meu desenvolvimento educacional e profissional”.*

*“Obrigado Pai e Mãe, vocês são meus guias”!*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, fonte de força e inspiração, pois está presente em todos os momentos da minha vida, proporcionando o alcance de meus objetivos.*

*Aos meus pais, Antônio Gomes Pereira Neres e Maria dos Remédios Silva Souza, que sempre se dedicaram, da melhor forma possível, no processo de formação de seus filhos e netos.*

*Aos meus irmãos, Pedro Paulo Neres, Ana Paula Neres, Ezequiel Neres e Antônio Filho Neres, que sempre honraram a força dispensada pelos nossos pais para o nosso desenvolvimento como pessoas íntegras.*

*À minha noiva, Karithiane Karithiuce Haffizza Mill Medeiros Lustosa, pelo companheirismo durante minha trajetória acadêmica de doutoramento.*

*À professora Dra. Carla Verônica Rodarte de Moura e ao Professor Dr. Edmilson Miranda de Moura pelo excelente trabalho de orientação e que foram muito importantes para as minhas conquistas acadêmicas e profissionais.*

*À professora Dra. Maria Christina Sanches Muratori, pelas relevantes contribuições no desenvolvimento das pesquisas e construção da tese.*

*Aos alunos de Doutorado, Mestrado e Iniciação Científica que compõem o Laboratório de Biodiesel e Materiais (LBM), em especial: Itaciara Erliny, Marco Aurélio, Wiury Abreu, Gilvan Moreira, Doulgas Sousa, Hermerson Mendes, Adriano Castro, Milton Falcão, Emmanuel Sousa, Diego Botelho, Patrícia Pitombeira, Karla Ribeiro, Carla Fontenele, Bernardo Ferreira, Roberta Yonara, Daiane Fossatti, Leanne Silva e Jesus Duarte.*

*Aos pesquisadores dos diversos laboratórios que contribuíram fundamentalmente para o desenvolvimento deste trabalho, em especial: Rafael Bacelar, Aline Dourado, Thiago Linus, Cícero Lopes e Edgar Alves.*

*À turma de Doutorado 2013.1, em especial: Roosevelt Delano, Paulo Ronaldo, Fabiana Beltrão, Suely Melo, Antônia Leal e Fátima Cardoso.*

*A todos os servidores da Universidade Federal do Piauí, entre professores, técnico-administrativos e o pessoal de apoio, que desempenham um excelente serviço, proporcionando o fortalecimento educacional de seu corpo discente.*

*Ao Instituto Federal do Piauí pela concessão do afastamento para minha qualificação profissional e pelo apoio prestado durante toda a pesquisa, disponibilizando laboratórios e seu corpo técnico para o desenvolvimento de análises que foram essenciais para conclusão deste estudo.*

*A todos que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Muito obrigado!*

## RESUMO

### UTILIZAÇÃO DE SEMENTES DE FAVELEIRA (*Cnidocolus phyllacanthus*) EM PROCESSOS ENZIMÁTICOS COM FUNGO *Rhizopus* sp.

A biotecnologia está ganhando cada vez mais importância nas indústrias e instituições de pesquisas, justificado pela diversidade de aplicações e benefícios que essa área pode trazer para a sociedade. Dessa forma, esse trabalho tem como principal objetivo a obtenção, caracterização e aplicação de produtos e processos biotecnológicos de grande potencial para o mercado industrial. Nesse sentido, foi feita a coleta de sementes de faveleira e posteriormente realizado o processo de extração do óleo, onde foram determinadas suas propriedades para aplicação em reações de hidrólise catalisada por lipases. O extrato enzimático, usado como catalisador, foi obtido por meio do processo fermentativo em substrato líquido peptonado com fungo *Rhizopus* sp. e posteriormente foi feita a caracterização por técnicas químicas, espectroscópicas e cromatográficas para detecção de lipases. Em seguida foram realizados testes de atividade enzimática com óleo de faveleira e óleo de oliva, apresentando resultados catalíticos satisfatórios. Em uma segunda etapa, os resíduos provenientes da extração do óleo de faveleira foram reaproveitados e aplicados como substrato sólido para o desenvolvimento do fungo *Rhizopus* sp., obtendo-se um novo extrato lipolítico que foi testado em óleos vegetais para avaliar seu potencial catalítico, apresentando alta atividade hidrolítica em óleos de faveleira e babaçu, demonstrando assim o grande potencial para utilização de resíduos sólidos de sementes vegetais como substrato para obtenção de lipases.

Palavras-chave: Faveleira, *Rhizopus*, Lipase, Processos Fermentativos

## **ABSTRACT**

### **USE OF FAVELEIRA SEEDS (*Cnidocolus phyllacanthus*) IN ENZYMATIC PROCESSES WITH FUNGUS *Rhizopus* sp.**

Biotechnology is gaining more importance in research institutions, justified by the diversity of applications and benefits that this area can bring to society. Thus, the main objective of this work is to obtain, characterize and apply biotechnological products and processes of great potential for the industrial market. In this sense, the faveleira seeds were collected and the oil extraction process was carried out, where their properties were determined for application in hydrolysis reactions catalysed by lipases. The enzymatic extract, used as a catalyst, was obtained by means of the fermentative process in liquid substrate peptone with fungus *Rhizopus* sp. and characterization was carried out by chemical, spectroscopic and chromatographic techniques to detect lipases. Then, enzymatic activity tests were carried out with faveleira oil and olive oil, with satisfactory catalytic results. In a second step, the residues from the extraction of faveleira oil were reused and applied as a solid substrate for the development of the fungus *Rhizopus* sp., obtaining a new lipolytic extract that was tested in vegetable oils to evaluate its catalytic potential, presenting High hydrolytic activity in faveleira and babassu oil, thus demonstrating the great potential for the use of solid residues of vegetable seeds as a substrate for obtaining lipases.

Keywords: Faveleira, *Rhizopus*, Lipase, Fermentation Processes

## LISTA DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>FIGURA 1.</b> Reação de Hidrólise Catalisada por Lipase.....  | <b>19</b> |
| <b>FIGURA 2.</b> Processo Fermentativo em Substrato Líquido: (A) Início do Processo Fermentativo (B) Término do Processo Fermentativo.....                             | <b>21</b> |
| <b>FIGURA 3.</b> Processo Fermentativo em Substrato Sólido: (A) Início do Processo Fermentativo (B) Término do Processo Fermentativo.....                              | <b>22</b> |
| <b>FIGURA 4.</b> Imagem do Fungo <i>Rhizopus</i> sp visto ao Microscópio Óptico.....   | <b>23</b> |
| <b>FIGURA 5.</b> (A) Triacilglicerol Simples; (B) Triacilglicerol Misto (C) Diacilglicerol (D) Monoacilglicerol.....   | <b>25</b> |
| <b>FIGURA 6.</b> Representação Regional dos Potenciais Produtores de Óleos Vegetais.....   | <b>27</b> |
| <b>FIGURA 7.</b> (A) Árvore de Faveleira; (B) Fazenda de Faveleira na Região de Paulistana - PI; (C) Sementes de Faveleira; (D) Sementes Trituradas para Pesquisa..... | <b>29</b> |
| <b>FIGURA 3.1.</b> Cromatograma do Óleo de Faveleira.....  | <b>47</b> |
| <b>FIGURA 3.2.</b> Espectro de Infravermelho do Óleo de Faveleira.....   | <b>50</b> |
| <b>FIGURA 3.3.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do Óleo de Faveleira.....  | <b>51</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>FIGURA 3.4.</b> Perfil Termogravimétrico do Óleo de Faveleira.....  | <b>52</b> |
| <b>FIGURA 3.5.</b> Perfil Calorimétrico do Óleo de Faveleira.....  | <b>52</b> |
| <b>FIGURA 3.6.</b> Variação de pH durante o Processo Fermentativo com <i>Rhizopus</i><br>sp.....             | <b>54</b> |
| <b>FIGURA 3.7.</b> Produção de Massa Micelial durante o Processo Fermentativo com<br><i>Rhizopus</i> sp..... | <b>54</b> |
| <b>FIGURA 3.8.</b> Espectro de Infravermelho do Extrato Enzimático e de Lipase<br>Padrão.....                | <b>55</b> |
| <b>FIGURA 3.9.</b> Cromatograma do Extrato Enzimático e Lipase Padrão.....                                   | <b>56</b> |
| <b>FIGURA 3.10.</b> Difratoograma do Extrato Enzimático.....   | <b>57</b> |
| <b>FIGURA 3.11.</b> Microscopia Eletrônica de Varredura do Extrato Enzimático.....                           | <b>58</b> |

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA 3.1.** Composição Centesimal das Sementes de Faveleira.....**46**

**TABELA 3.2.** Propriedades Físico-Químicas do Óleo de Faveleira.....**49**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AOAC** - Association of Official Analytical Chemists

**AOCS** - American Oil Chemical Society

**CG** - Cromatografia Gasosa

**CG-EM** - Cromatografia Gasosa Acoplado ao Espectro de Massas

**DRX** - Difração de Raios X

**DSC** – Calorimetria Diferencial de Varredura

**DTG** – Derivada da Termogravimetria

**FSL** – Fermentação em Substrato Líquido

**FSS** – Fermentação em Substrato Sólido

**FTIR** - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

**GRAS** - Generally Regarded as Safe

**IOC** – Instituto Oswaldo Cruz

**IUPAC** - União Internacional de Química Pura e Aplicada

**IV** - Infravermelho

**MEV** - Microscopia Eletrônica de Varredura

**NUEPPA** – Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos

**pH** – Potencial Hidrogeniônico

**RMN <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**TG** - Termogravimetria

**UA** – Unidade de Atividade Enzimática

# SUMÁRIO

|   |             |
|---|-------------|
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>VI</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>VII</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>  | <b>X</b>    |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>   | <b>XI</b>   |
| <b>APRESENTAÇÃO.....</b>  | <b>16</b>   |
| <b>CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA.....</b>   | <b>18</b>   |
| 1. ENZIMAS: LIPASES.....  | 19          |
| 2. PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DE LIPASES.....  | 21          |
| 3. FUNGO <i>RHIZOPUS</i> .....  | 23          |
| 4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....  | 23          |
| 5. ÓLEOS VEGETAIS.....  | 24          |
| 6. MATÉRIA PRIMA DE ÓLEOS VEGETAIS.....   | 27          |
| 7. FAVELEIRA.....   | 28          |
| 8. REFERÊNCIAS.....   | 30          |
| <b>CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DAS SEMENTES DE FAVELEIRA<br/>PARA UTILIZAÇÃO NO PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE<br/>ENZIMÁTICA DO EXTRATO PROVENIENTE DO FUNGO <i>RHIZOPUS</i> SP.....</b> | <b>37</b>   |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>38</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>39</b>   |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 40          |
| 2. PARTE EXPERIMENTAL.....  | 42          |
| 2.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS SEMENTES DE FAVELEIRA.....   | 42          |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE FAVELEIRA E DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....   | 42        |
| 2.3. ANÁLISE POR INFRAVERMELHO, RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO E ANÁLISES TÉRMICAS DO ÓLEO DE FAVELEIRA.....   | 43        |
| 2.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO UTILIZANDO FUNGOS <i>RHIZOPUS</i> SP. POR MEIO DO PROCESSO FERMENTATIVO EM SUBSTRATO LÍQUIDO.....                                 | 43        |
| 2.5. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR INFRAVERMELHO, CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA, DIFRAÇÃO DE RAIOS X E MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA..... | 44        |
| 2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....  | 44        |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....   | 46        |
| 3.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS SEMENTES DE FAVELEIRA.....   | 46        |
| 3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE FAVELEIRA.....   | 46        |
| 3.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE FAVELEIRA.....   | 48        |
| 3.4. CARACTERIZAÇÃO POR INFRAVERMELHO, RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO E ANÁLISE TÉRMICA DO ÓLEO DE FAVELEIRA...  | 49        |
| 3.5. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DO FUNGO <i>RHIZOPUS</i> .....  | 53        |
| 3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....  | 58        |
| 4. CONCLUSÕES.....  | 60        |
| 5. AGRADECIMENTOS.....  | 61        |
| 6. REFERÊNCIAS.....   | 62        |
| <b>CAPÍTULO III - PROCESSO PARA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DAS SEMENTES DE FAVELEIRA NA OBTENÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO COM FUNGO <i>RHIZOPUS</i> SP.....</b>              | <b>68</b> |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>69</b> |
| 1. CAMPO DA INVENÇÃO.....   | 70        |
| 2. FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO.....   | 70        |
| 3. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO.....   | 72        |

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| 4. REINVINDICAÇÕES..... | 74        |
| <b>ANEXOS.....</b>      | <b>76</b> |

## APRESENTAÇÃO

A Biotecnologia é uma área interdisciplinar, focada no desenvolvimento de produtos e processos utilizando agentes biológicos, e que tem ganhado cada vez mais espaço nas estratégias econômicas de diversos países. Dessa forma, essa importante área do conhecimento busca agregar diversos segmentos da ciência para fortalecer setores industriais importantes, utilizando de forma sustentável a biodiversidade disponível.

O Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), objetiva estimular a formação de profissionais, com foco no nordeste brasileiro, para suprir demandas acadêmicas e do setor empresarial, integrando o desenvolvimento científico e tecnológico das instituições envolvidas, além de proporcionar avanços socioeconômicos na região.

Dentro dessa perspectiva, esse trabalho conseguiu estabelecer parcerias importantes com membros de diversas áreas do conhecimento (químicos, biólogos, veterinários, agrônomos, nutricionistas, engenheiros, dentre outros) de renomadas instituições de pesquisas, proporcionando assim, o pleno desenvolvimento de um trabalho voltado para o campo biotecnológico.

Os agentes biológicos utilizados nesse trabalho foram os fungos do gênero *Rhizopus* e a espécie vegetal *Cnidoscolus phyllacanthus*, popularmente conhecida como faveleira. Os fungos são microrganismos de grande relevância biotecnológica, sendo empregados constantemente em pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos e ou processos. Já a faveleira é uma oleaginosa abundante na região nordeste do Brasil, mas que carece de pesquisas que demonstre seu potencial para aplicações industriais, o que gerou o interesse deste autor para o desenvolvimento de trabalhos utilizando essa espécie vegetal.

Portanto, este trabalho acadêmico está estruturado em 3 capítulos, sendo o capítulo I constituído por uma revisão de literatura geral, abrangendo aspectos referentes às enzimas fúngicas, processos fermentativos e sobre a espécie *Cnidoscolus phyllacanthus*. O capítulo II, referente a um artigo que envolve um processo fermentativo em substrato líquido para obtenção de um extrato enzimático,

aplicável na determinação da atividade hidrolítica em óleo de faveleira. O capítulo III representa um pedido de patente que aborda a utilização de resíduos de sementes de faveleira como substrato para obtenção de extrato enzimático fúngico, aplicável como catalisador em reações de hidrólise de óleos vegetais.

*Haroldo Luís Sousa Neres.*

# **CAPÍTULO I**

## **REVISÃO DA LITERATURA**

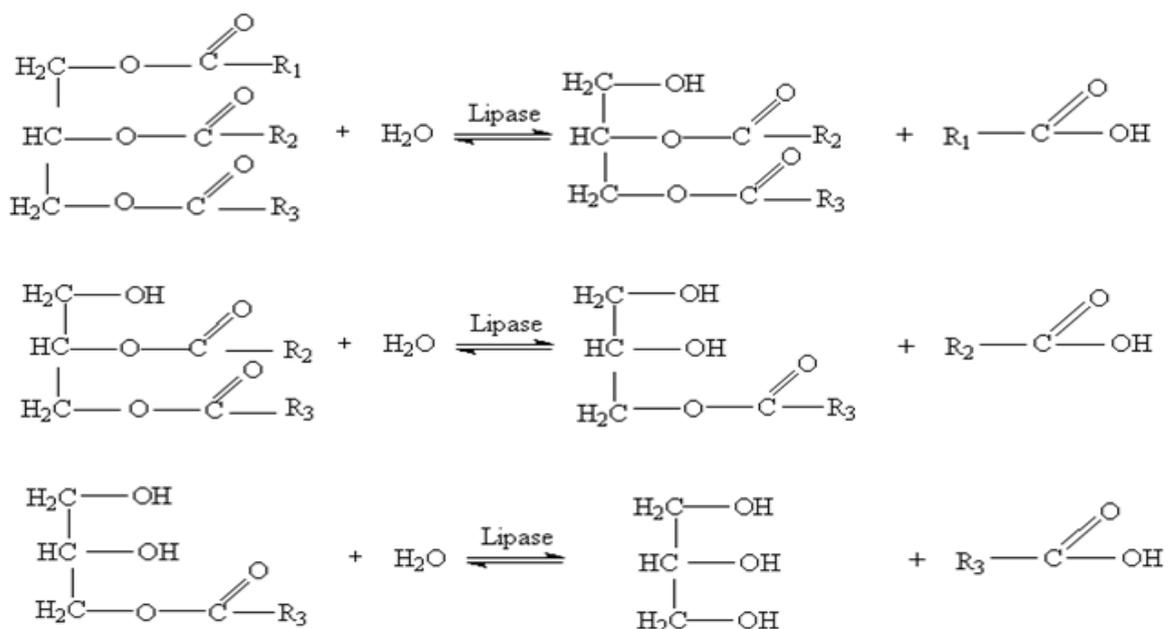
## 1. ENZIMAS: LIPASES

As enzimas são proteínas essenciais aos organismos vivos, pois possibilitam a realização de diversos processos reacionais que permitem a manutenção da vida. Esses catalisadores biológicos promovem a aceleração e a consequente conversão de inúmeras substâncias em produtos que são necessários para o metabolismo celular (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005; FERREIRA, 2015).

Atualmente as enzimas têm sido bastante aplicadas no meio industrial, pois apresentam ampla versatilidade em reações químicas, ou seja, atuam em uma extensa faixa de temperatura, pH e necessitam de condições brandas para o processo reacional ocorrer, como baixas pressões (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; MENDES et al., 2011; SILVA, 2012; LIMA et al., 2014).

A Enzimologia classifica esses catalisadores de acordo com suas propriedades reacionais. Dessa forma, as lipases são um grupo de enzimas denominadas de triacilglicerol-acil-hidrolases que aceleram a hidrólise de triacilgliceróis na ligação éster-carboxílica proporcionando a formação de glicerol e ácidos graxos livres (Figura 1) (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; ALI; REN; HUANG, 2014; MOHAMMADI et al., 2015).

**Figura 1.** Reação de Hidrólise Catalisada por Lipase (MENDES et al., 2005)



Esses catalisadores, dependendo da ambientação do meio reacional, também podem ser utilizados em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (AN; ZHAO; YE, 2015; KHASANOV; DAVRANOV; RAKHIMOV, 2015; RAMOS et al., 2015).

As lipases podem ser encontradas naturalmente em plantas, animais e microrganismos, no entanto, a obtenção de lipases vegetais e animais para aplicação industrial é bastante limitada, devido ao seu alto custo e necessidade de um grande volume de material para extração do biocatalisador (LÓPEZ et al., 2010; OZYILMAZ; GEZER, 2010; SIQUEIRA, 2012). Em contrapartida, as lipases provenientes de microrganismos podem ser mais facilmente manipuláveis, possibilitando o desenvolvimento de pesquisas e conseqüentemente facilitando suas aplicações na indústria (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001; PANDEY, 2003; TREICHEL et al., 2010; GRIEBELER et al., 2011; MOHAMMADI et al., 2015; UNLU et al., 2015).

As lipases microbianas são obtidas principalmente de fungos e bactérias e apresentam excelentes propriedades bioquímicas, podendo atuar em variados substratos e ambientações diferentes, pois apresentam boa estabilidade em diversos solventes orgânicos, atuando em uma ampla faixa de condições reacionais sem perder seu efeito catalítico (NAGARAJAN, 2012; REINEHR et al., 2014; SETH et al., 2014; SHARMA; KANWAR, 2014).

Os microrganismos geralmente excretam as lipases pela membrana externa para o meio de cultura, facilitando a sua detecção e conseqüentemente sua aplicação (CARVALHO et al., 2003; MESSIAS et al., 2011; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012). Muitos microrganismos produzem lipases extracelulares, podendo-se destacar os fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Thermomyces* (TREICHEL et al., 2010; MESSIAS et al., 2011; SILVA, 2012).

As lipases fúngicas geralmente não são nocivas à saúde humana e por isso são classificadas como GRAS (Generally Regarded as Safe), o que facilita o desenvolvimento de pesquisas acadêmicas e suas aplicações nos mais diversos setores da indústria (SHUKLA; GUPTA, 2007; MESSIAS et al., 2011; REINEHR et al., 2014). Dessa forma, esses biocatalisadores tem ganhado bastante espaço na

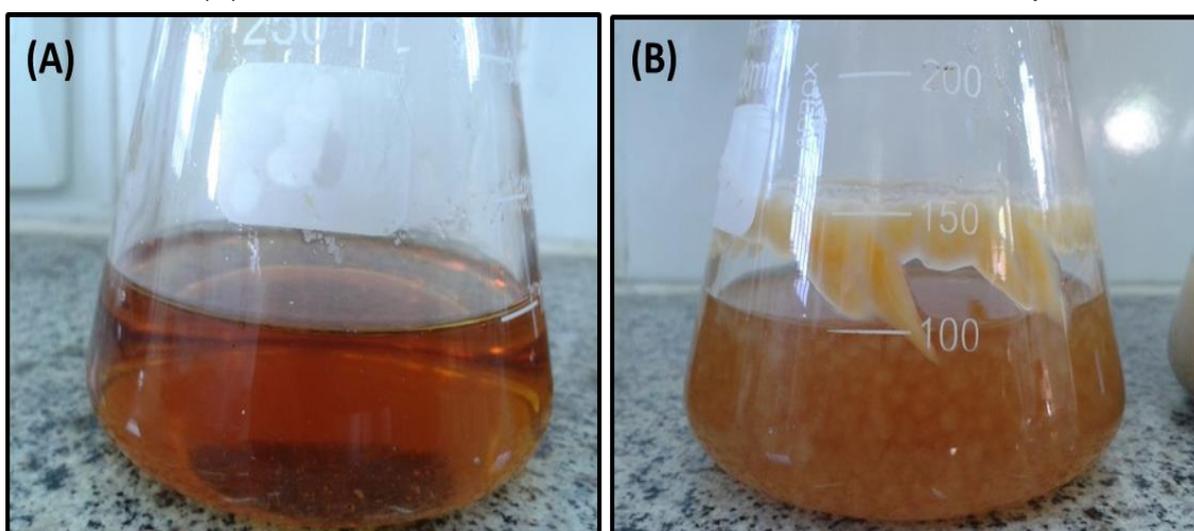
fabricação de detergentes, medicamentos, alimentos, têxteis, cosméticos, biocombustíveis, biossensores e também no tratamento de efluentes (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; MESSIAS et al., 2011; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012).

## 2. PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DE LIPASES

O processo de produção de lipases por microrganismos é realizado por duas vias principais: a fermentação em substrato líquido e a fermentação em substrato sólido (MESSIAS et al., 2011; RAMOS et al., 2011; SILVA, 2012; REINEHR et al., 2014).

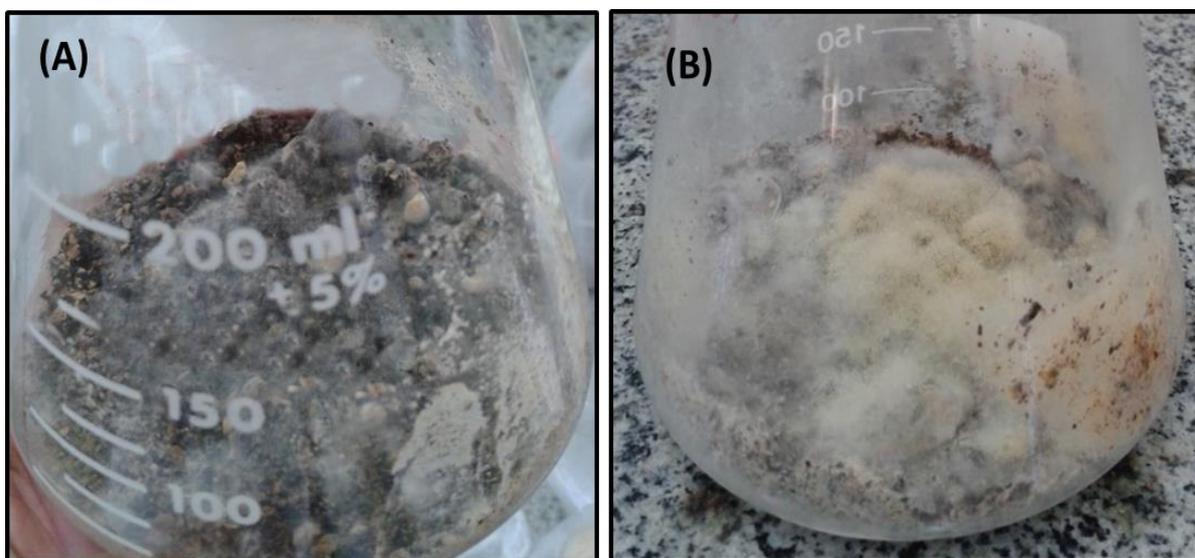
A fermentação em substrato líquido (Figura 2) é caracterizada pela aplicação dos microrganismos em soluções líquidas contendo os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento e conseqüentemente para a produção de lipases (MESSIAS et al., 2011; SILVA, 2012). É o procedimento mais empregado, pois há uma maior facilidade de acompanhamento dos parâmetros de controle durante o processo fermentativo, como a quantidade de nutrientes presentes na solução, temperatura, pH e outras modificações químicas que podem ocorrer durante a fermentação (MESSIAS et al., 2011; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; SILVA, 2012).

**Figura 2.** Processo Fermentativo em Substrato Líquido: (A) Início do Processo Fermentativo (B) Término do Processo Fermentativo. Fonte: Autoria Própria.



O processo fermentativo em substrato sólido (Figura 3) é caracterizado pela ausência ou baixa concentração de água ou outro líquido no meio fermentativo (DANTAS; AQUINO, 2010; MESSIAS et al., 2011). Esse procedimento é complexo devido à baixa homogeneidade do meio de cultura e pela dificuldade de monitoramento dos parâmetros fermentativos, como mudanças de pH e produção de massa micelial (RAMOS et al., 2011).

**Figura 3.** Processo Fermentativo em Substrato Sólido: (A) Início do Processo Fermentativo (B) Término do Processo Fermentativo. Fonte: Autoria Própria.



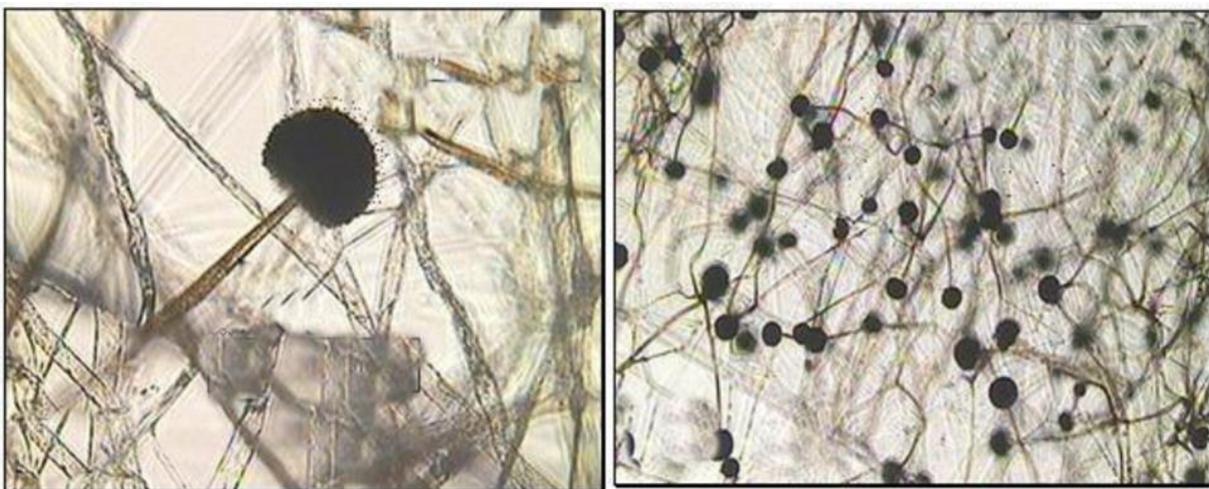
O processo fermentativo em substrato sólido apresenta uma grande vantagem em relação aos substratos líquidos, que é a possibilidade de utilização de massas fermentativas de baixo custo, podendo ser materiais provenientes de resíduos agroindustriais como farelos de alimentos de origem vegetal e animal (SUN; XU, 2008; DANTAS; AQUINO, 2010; MESSIAS et al., 2011).

O Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA) em parceria com o Laboratório de Biodiesel e Materiais, ambos da Universidade Federal do Piauí (UFPI), estão desenvolvendo pesquisas para elaboração de patentes que facilitem o processo de obtenção de lipases por meio do processo fermentativo em substrato sólido, utilizando resíduos de sementes de espécies vegetais locais e espécies de fungos isoladas do solo e de alimentos.

### 3. FUNGO RHIZOPUS

O fungo do gênero *Rhizopus* é um sapróbio encontrado geralmente no solo e alimentos em decomposição, como frutas e pães. Apresenta forma de filamentos ramificados, chamados de hifas que se desenvolvem formando redes complexas algodonosas de cor marrom (RIBES; SAMS; BAKER, 2000; SANTANA, 2012; MOTA, 2013).

**Figura 4.** Imagem do Fungo *Rhizopus* sp Visto ao Microscópio Óptico (SANTANA, 2012)



Atualmente tem-se buscado desenvolver pesquisas que possibilitem novas aplicações para o fungo *Rhizopus*, pois o mesmo apresenta grande potencial para ser aplicado em processos fermentativos para obtenção de alimentos e geração de metabólitos extracelulares importantes como as lipases (LÓPEZ et al., 2010; KE et al., 2015).

### 4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A identificação de lipase e a determinação da atividade lipásica de extratos enzimáticos é realizada pela quantificação dos ácidos graxos liberados durante a hidrólise, proporcionada pelo biocatalisador, ou pelo desaparecimento dos substratos utilizados durante o processo reacional (MESSIAS et al., 2011).

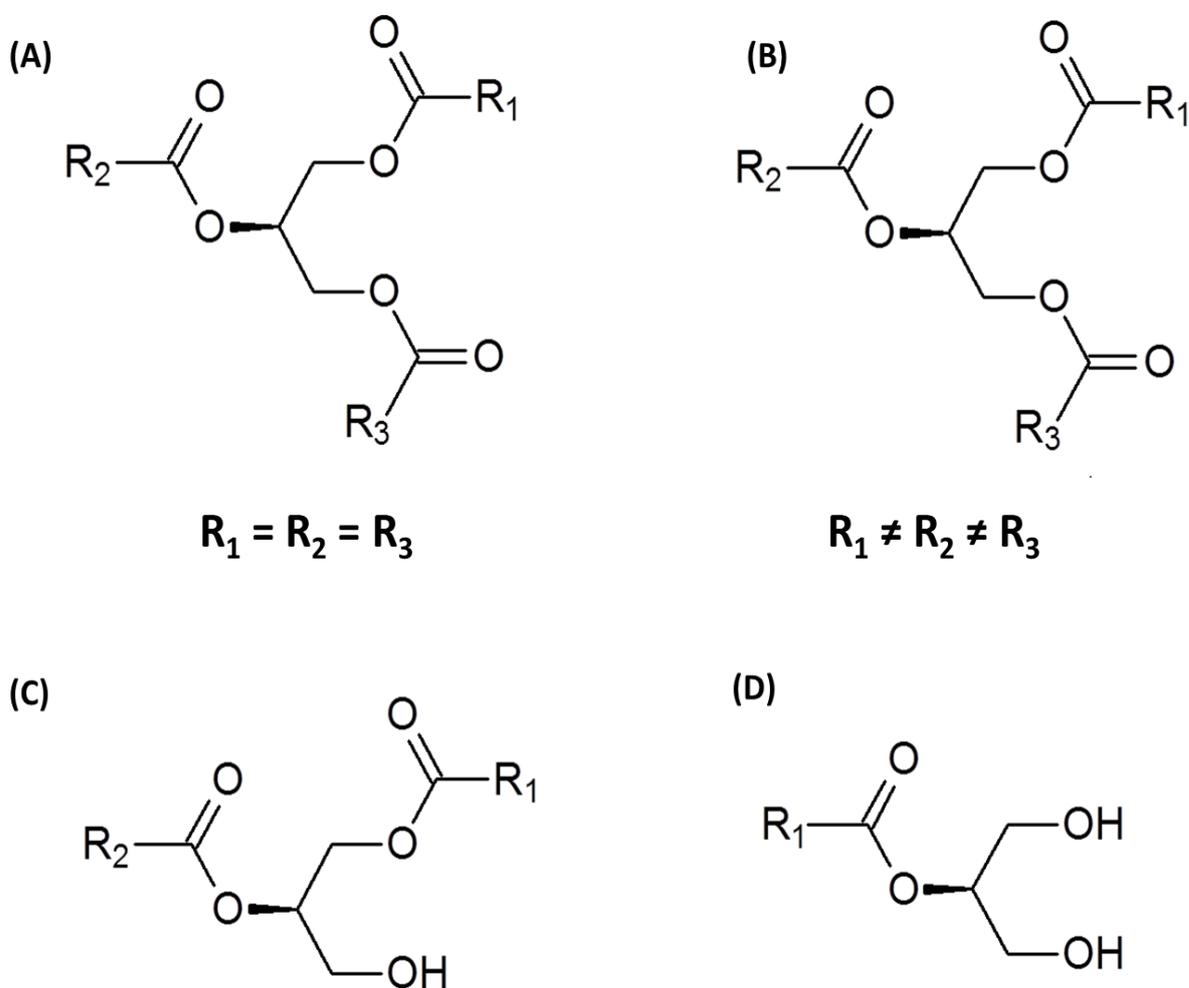
Dentre os diversos meios que identificam o desaparecimento de substratos pode-se citar a nefelometria, turbidimetria, tensiometria interfacial, microscopia de força atômica e espectroscopia na região do infravermelho. No entanto, o meio mais utilizado consiste na identificação dos produtos formados por meio da titulação ácido-base (MESSIAS et al., 2011).

A determinação da atividade lipolítica de extratos enzimáticos por titulação ácido-base consiste na realização de uma reação contendo a enzima e o triacilglicerol em meio aquoso, em que os reagentes mais utilizados são os óleos de oliva e soja (CORADI et al., 2013). O meio reacional é mantido a uma determinada temperatura e o pH é controlado durante o tempo de hidrólise e em seguida é realizada a quantificação dos ácidos liberados (ALMEIDA; TORNISIELO; CARMONA, 2013). Os extratos enzimáticos podem apresentar atividades diferentes em substratos diversos, devido à variedade de ácidos graxos dos triacilgliceróis de cada óleo (CORADI et al., 2013). Dessa forma é importante estudar as atividades enzimáticas de lipases em outros substratos, dentre os quais pode-se destacar o óleo de faveleira.

## **5. ÓLEOS VEGETAIS**

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente por moléculas de triacilgliceróis e pequenas concentrações de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, portanto, são insolúveis em água e apresentam alta solubilidade em solventes orgânicos apolares (SOARES, 2013; MANHÃES, 2014; RODRIGUES, 2014). Esses triacilgliceróis são formados pelas ligações ésteres entre três ácidos graxos a uma molécula de glicerol, e suas propriedades físico-químicas são determinadas principalmente por esses ácidos constituintes (JORGE, 2009; CARVALHO, 2011; SILVA, 2013).

**Figura 5.** (A) Triacilglicerol Simples; (B) Triacilglicerol Misto (C) Diacilglicerol (D) Monoacilglicerol. Fonte: Autoria Própria.



Triacilgliceróis simples são aqueles que apresentam em sua estrutura os três ácidos graxos formadores da molécula iguais, enquanto que os mistos são aqueles que apresentam dois ou mais ácidos graxos diferentes (BRUM, 2010; SILVA, 2013). A grande maioria dos óleos vegetais é formada por triacilgliceróis mistos, apresentando ácidos de cadeia longa, insaturada ou saturada (BRUM, 2010).

A determinação das propriedades físicas e químicas de um óleo vegetal é importante para deliberar sobre sua aplicação em algum processo industrial (LIMA et al., 2007; BROCK et al., 2008; MANHÃES, 2014). Dessa forma, técnicas químicas, como a Espectroscopia na Região do Infravermelho, Ressonância Magnética

Nuclear e Análises Termogravimétricas determinam diversas características do óleo vegetal, possibilitando principalmente verificar o grau de pureza do óleo e conseqüentemente avaliar o seu processamento durante o beneficiamento (LOPES; FASCIO, 2004; ARAÚJO; MOURA; CHAVES, 2010).

Propriedades como viscosidade, densidade, índice de iodo e peróxido estão fortemente ligadas com a presença de insaturações dos ácidos constituintes do óleo. Os ácidos graxos insaturados da molécula de triacilglicerol proporcionam ao óleo uma menor viscosidade e densidade, geralmente possibilitando melhores propriedades de escoamento e facilitando a sua aplicação em alguns processos como na obtenção de biodiesel. No entanto, ácidos insaturados são mais susceptíveis à oxidação, proporcionando elevados índices de iodo e de peróxidos, ou seja, a presença de ácidos graxos saturados também é importante para garantir ao óleo vegetal maior estabilidade à oxidação (REDA; CARNEIRO, 2007; CARVALHO, 2011).

O índice de saponificação corresponde ao número de miligramas de hidróxido de potássio requerido para saponificar um grama do óleo vegetal e quanto maior o índice menor o tamanho dos ácidos formadores da molécula de triacilglicerol, conseqüentemente melhor a qualidade do óleo vegetal para fins alimentícios. Já o índice de acidez revela a quantidade de álcali em miligramas requerida para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em um grama de óleo e é um indicador de sementes de baixa qualidade, de manuseio e armazenamento impróprios ou de um processamento insatisfatório (AMARAL, 2007; SOUZA, 2007; CARVALHO, 2011).

Os óleos vegetais são substratos naturais de lipases, portanto, podem ser utilizados em processos de identificação desses biocatalisadores por meio da hidrólise de suas moléculas de triacilgliceróis e também em reações de transesterificação para obtenção de biodiesel. Portanto, é importante a caracterização de novas fontes oleaginosas para ampliar o leque de aplicações desses biocatalisadores e conseqüentemente contribuir para o desenvolvimento de novos produtos e processos.

## 6. MATÉRIA PRIMA DE ÓLEOS VEGETAIS

O Brasil, devido à sua grande extensão territorial e excelentes condições climáticas, é um dos poucos países com amplo potencial para explorar diversas matérias primas de óleos vegetais (FROEHNER; LEITHOLD; LIMA, 2007; NERES, 2011). A principal fonte de óleo vegetal no Brasil é a soja, seguida de algodão, palma e girassol. Apesar dessa grande variabilidade brasileira, é muito importante a busca de novas fontes alternativas para fins de utilização na alimentação e na composição de outros produtos industriais, pois a demanda vem crescendo cada vez mais no mercado interno e externo (CONCEIÇÃO et al., 2005; BROCK et al., 2008; SOARES, 2013; MANHÃES, 2014).

**Figura 6.** Representação Regional dos Potenciais Produtores de Óleos Vegetais (NERES, 2011)



A região Nordeste apresenta uma grande produção de sementes de soja, mamona, palma e algodão, no entanto, espécies nativas como o babaçu estão ganhando cada vez mais espaço em processos de beneficiamento, devido às suas qualidades nutricionais e potencialidades para aplicações em diversos produtos como cosméticos, medicamentos e produção de energia (BALDEZ et al., 2006; LIMA et al., 2007; CALAND et al., 2009; NERES, 2011; SILVA et al., 2012).

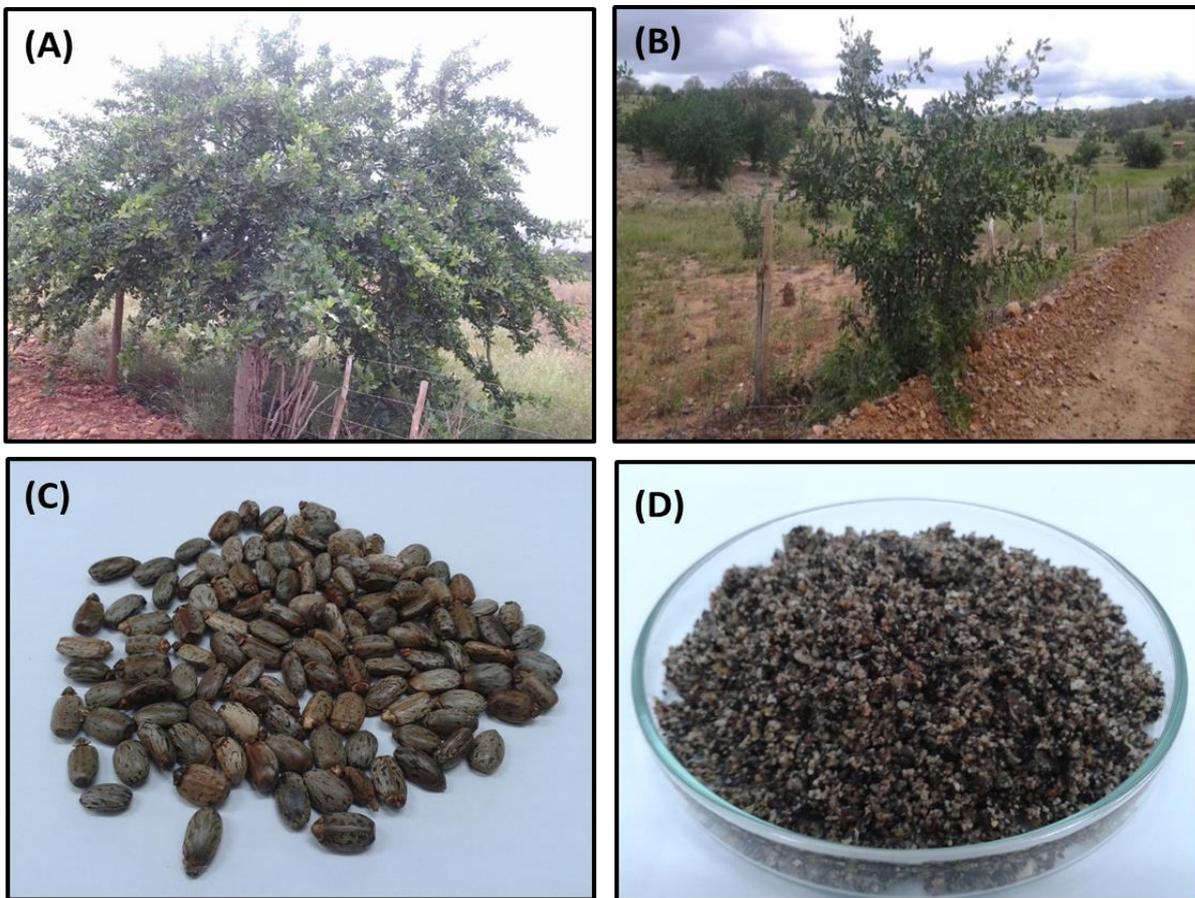
No Piauí e Maranhão há diversos estudos, em importantes instituições de pesquisas, que visam explorar toda a cadeia produtiva do babaçu, e isso tem proporcionando desenvolvimento socioeconômico para regiões que cultivam essa espécie vegetal (BALDEZ et al., 2006; CALAND et al., 2009; NERES, 2011; SILVA et al., 2012; LUCENA et al., 2014; MOURA et al., 2015). No entanto, têm-se poucos registros de pesquisas que visem o desenvolvimento da cadeia produtiva da faveleira, que é uma espécie abundante na região do sertão nordestino e que poderia gerar renda para aquela que é considerada umas das mais carentes regiões do Brasil.

## **7. FAVELEIRA**

A faveleira, de nome científico *Cnidoscolus phyllacantus* é uma espécie vegetal pertencente à família *Euphorbiaceae*, encontrada principalmente no sertão seco da região nordeste do Brasil. É bastante resistente às condições climáticas adversas, apresentando um rápido crescimento, portanto, com potencial para utilização em processos de reflorestamento de áreas degradadas (PEREIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

A árvore de faveleira apresenta tamanho variável de 3 a 5 metros, com galhos irregulares, com uma copa longa e arredondada. Suas raízes são tuberculadas e apresenta tronco curto com diâmetro de até 35 cm. Apresenta folhas longas e grossas com flores alvas e hermafroditas. O fruto é formado por uma cápsula tricoca esquizocárpica e sementes duras com superfícies lisas (CAVALCANTI, 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

**Figura 7.** (A) Árvore de Faveleira; (B) Faveleiras Distribuídas em Área Rural de Paulistana-PI; (C) Sementes de Faveleira; (D) Sementes Trituradas para Pesquisa. Fonte: Autoria Própria.



A região de Paulistana-Piauí apresenta uma grande concentração de árvores de faveleira distribuídas em todo o seu território e com características morfológicas semelhantes. A sua utilização ainda é muito restrita e artesanal, sendo empregada principalmente na alimentação animal e para extração do óleo de forma rudimentar para ser aplicado na alimentação humana.

O potencial biotecnológico da faveleira da região piauiense é muito grande, sendo importante o desenvolvimento de pesquisas que explorem essa espécie vegetal e proporcionem o desenvolvimento de pequenos agricultores que poderão trabalhar com mais uma fonte alternativa e adaptável ao clima daquela região.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALI, S.; REN, S.; HUANG, Z. Extracellular Lipase of an Entomopathogenic Fungus Effecting Larvae of a Scale Insect. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1148–1159, 2014.
- ALMEIDA, A. F.; TORNISIELO, S. M. T.; CARMONA, E. C. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Lipase Production by a Newly Isolated *Candida viswanathii* Strain. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1225–1234, 2013.
- AMARAL, F. P. **Estudo das Características Físico-Químicas dos Óleos da Amêndoa e Polpa da Macaúba [*Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. ex Mart]**. 2007. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP, 2007.
- AN, D.; ZHAO, X.; YE, Z. Enzymatic Synthesis and Characterization of Galactosyl Monoesters. **Carbohydrate research**, v. 414, p. 32–38, 2015.
- ARAÚJO, C. S. T.; ALVES, V. N.; REZENDE, H. C.; ALMEIDA, I. L. S.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; TARLEY, C. R. T.; SEGATELLI, M. G.; COELHO, N. M. M. Characterization and Use of Moringa oleifera Seeds as Biosorbent for Removing Metal Ions from Aqueous Effluents. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 9, p. 2198–2203, 2010.
- BALDEZ, R. N.; MALAFAIA, O.; CZECZKO, N. G.; MARTINS, N. L. P.; FERREIRA, L. M.; RIBAS, C. A. P. M.; SALLES JÚNIOR, G.; CLARO, R. P.; SANTOS, L. de O. M.; GRAÇA NETO, L.; ARAÚJO, L. R. R. Healing of Colonic Anastomosis with the Use of Extract Aqueous of *Orbignya phalerata* (Babassu) in Rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 31–38, 2006.
- BROCK, J.; NOGUEIRA, M. R.; ZAKRZEWSKI, C.; CORAZZA, F. D.; CORAZZA, M. L.; DE OLIVEIRA, J. V. Experimental Measurements of Viscosity and Thermal Conductivity of Vegetable Oils. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 564–570, 2008.
- BRUM, S. S. **Catalisadores de Zircônia Sulfatada e Compósitos de Carvão Ativado/Zircônia Sulfatada para Produção de Biodiesel e Etanol**. 2010. 156f. Tese (Doutorado em Agroquímica e Agrobioquímica), Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2010.

CALAND, L. B.; SANTOS, L. S. S.; MOURA, C. V. R.; MOURA, E. M. Preparation and Study of Bimetallic Compounds Efficiency in the Synthesis of Biodiesel Fuel. **Catalysis Letters**, v. 128, n. 3-4, p. 392–400, 2009.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de Enzimas na Alimentação Animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259–272, 2005.

CARVALHO, C. O. **Comparação entre Métodos de Extração do Óleo de *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae - Buriti) para o Uso Sustentável na Reserva de Desenvolvimento Tupé: Rendimento e Atividade Antimicrobiana**. 2011. 109f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade do Estado do Amazonas, Manaus - AM, 2011.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Application of Microbial Lipases to Concentrate Polyunsaturated Fatty Acids. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CAVALCANTI, M. T. **Utilização das Sementes da Faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus* (Mart.) Pax et K. Hoffm.) em Produtos Alimentícios**. 2011. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal De Campina Grande, Campina Grande - PB, 2011.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Applications And Production of Microbial Lipases. **Revista Ciatec**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2012.

CONCEIÇÃO, M. M.; CANDEIA, R. A.; DANTAS, H. J.; SOLEDADE, L. E. B.; FERNANDES, V. J.; SOUZA, A. G. Rheological Behavior of Castor Oil Biodiesel. **Energy and Fuels**, v. 19, n. 5, p. 2185–2188, 2005.

CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatalysis: Recent Advances. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 672–675, 2001.

CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Comparing Submerged and Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Residues for the Production and Characterization of Lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 533–540, 2013.

DANTAS, É. M.; AQUINO, L. C. L. Solid State Fermentation of Different Residues to Obtain Microbial Lipase. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 81–87, 2010.

FERREIRA, R. C. **Efeito das Enzimas Fitase e Xilanase sobre a Disponibilidade de Fósforo em Dietas para Suínos dos 63 aos 103 Dias de Idade**. 2015. 138f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2015.

FROEHLER, S.; LEITHOLD, J.; LIMA, L. F. Transesterification Of Vegetable Oils: Characterization by Thin-layer Chromatography and Density. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2016–2019, 2007.

GRIEBELER, N.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHET, J. L.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO, E.; NINOW, J. L. Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 578–586, 2011.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial Applications of Microbial Lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1, p. 155–170, 2004.

JORGE, N. **Química e tecnologia de óleos vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009.

KE, W.; CHANG, S.; CHEN, X.; LUO, S.; JIANG, S.; YANG, P.; WU, X.; ZHENG, Z. Metabolic Control Analysis of L-lactate Synthesis Pathway in *Rhizopus oryzae* As 3.2686. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 11, p. 2189–2199, 2015.

KHASANOV, K. T.; DAVRANOV, K.; RAKHIMOV, M. M. State of Fungal Lipases of *Rhizopus microsporus*, *Penicillium* sp. and *Oospora lactis* in Border Layers Water—solid Phase and Factors Affecting Catalytic Properties of Enzymes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 600–607, 2015.

LIMA, B. F.; AMORIM, H. S.; NASCIMENTO, A. E.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A. Selection of Media of Production Lipase Samples by *Aspergillus* sp Isolated from Caatinga in Pernambuco. **E-xacta**, v. 7, n. 1, p. 147–157, 2014.

LIMA, J. R. D.; SILVA, R. B.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS, J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel from Babassu (*Orbignya* sp.) Synthesized Via Ethanol Route. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 600–603, 2007.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Flow Chart for Infrared Spectra Interpretation of Organic Compounds. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

LÓPEZ, E.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Strategies for Utilisation of Food-Processing Wastes to Produce Lipases in Solid-state Cultures of *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 8, p. 929–935, 2010.

LUCENA, L. U.; LOPES, J. B.; FIGUEIREDO, A. V.; ALMENDRA, S. N. O.; COSTA, E. M. S.; CARVALHO, G. B. Performance and Nutrient Digestibility of Diets Containing Babassu (*Orbignya speciosa*) Products for Agoutis (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831) in Captivity. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 1, p. 39–47, 2014.

MANHÃES, L. R. T. **Avaliação do Potencial Nutricional , Funcional e Sensorial de Óleo de Buriti ( *Mauritia flexuosa* , Mart .)**. 2014. 105f. Tese (Doutrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2014.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO, A. Application of Lipases for Wastewater Treatment Containing High Levels of Lipids. **Quimica Nova**, v. 28, n. 2, p. 296–305, 2005.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. Application of Chitosan as Support for Immobilization of Enzymes of Industrial Interest. **Quimica Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Microbial Lipases: Production, Properties and Biotechnological Applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

MOHAMMADI, M.; SEPEHRIZADEH, Z.; HABIBI, A. E.; REZA SHAHVERDI, A.; FARAMARZI, M. A.; SETAYESH, N. Bacterial Expression and Characterization of an Active Recombinant Lipase A from *Serratia marcescens* with Truncated C-terminal Region. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 84–92, 2015.

MOTA, K. S. L. M. **Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Thymus vulgaris* L. e Fitoconstituíntes Contra *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*: Interação com Ergosterol**. 2013. 128f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, 2013.

MOURA, C. V. R.; NERES, H. L. S.; LIMA, M. G.; MOURA, E. M.; NETO, J. M. M.; OLIVEIRA, J. E.; LIMA, J. R. O.; STTOLIN, I. M.; ARAÚJO, E. C. E. Cr/Al Oxide as Solid Acid Catalyst to Afford Babassu Biodiesel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 1–11, 2015.

NAGARAJAN, S. New Tools for Exploring Old Friends-Microbial Lipases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 5, p. 1163-1196, 2012.

NERES, H. L. S. N. **Síntese de Catalisadores Heterogêneos para Aplicação em Reação de Transesterificação do Óleo de Orbignya phalerata**. 2011. 66f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI 2011.

OLIVEIRA, M. D. M.; BEZERRA, L. L.; DANTAS, C. V. S.; VOIGT, E. L.; MAIA, J. M.; MACÊDO, C. E. C. The Role of Xylopodium in Na<sup>+</sup> Exclusion and Osmolyte Accumulation in Faveleira [*Cnidocolus phyllacanthus* (d. arg.) Pax et K. Hoffm] Under Salt Stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 11, p. 2871–2882, 2014.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of Aroma Esters by Immobilized *Candida rugosa* and Porcine Pancreatic Lipase into Calcium Alginate Gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 3-4, p. 140–145, 2010.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

PEREIRA, V. L. A.; ALVES, F. A. L.; SILVA, V. M.; OLIVEIRA, J. C. V. Nutritive Value and Voluntary Intake of Faveleira Hay Supply to Sheep in the Semiarid Pernambuco State Brazil. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 96–101, 2012.

RAMOS, E. Z.; JÚNIOR, R. H. M.; CASTRO, P. F.; TARDIOLI, P. W.; MENDES, A. A.; LAFUENTE, R. F.; HIRATA, D. B. Production and Immobilization of *Geotrichum candidum* Lipase Via Physical Adsorption on Eco-Friendly Support: Characterization of the Catalytic Properties in Hydrolysis and Esterification Reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43–51, 2015.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Biodiesel Production Technologies. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 385–405, 2011.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e Gorduras: Aplicações e Implicações. **Revista Analytica**, v. 27, p. 60–67, 2007.

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Production of Lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* Through Solid State Fermentation: Evaluation of Substrate Specificity And Use in Esterification and Alcoholysis Reactions. **Quimica Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.

RIBES, J. A.; SAMS, C. L. V.; BAKER, D. J. Zygomycetes in Human Disease Clinical. **Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 236-301, 2000.

RODRIGUES, G. **Otimização da Síntese do Alsba-15 para Produção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Coco**. 2014. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2014.

SANTANA, R. S. M. **Produção de Enzimas Amilolíticas Através da Fermentação em Estado Sólido**. 2012. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - BA, 2012.

SETH, S.; CHAKRAVORTY, D.; DUBEY, V. K.; PATRA, S. An Insight into Plant Lipase Research - Challenges Encountered. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 13-21, 2014.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic Solvent Tolerant Lipases and ApplicationsThe Scientific. **World Journal**, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2014.

SHUKLA, P.; GUPTA, K. Ecological Screening for Lipolytic Molds and Process Optimization for Lipase Production from *Rhizopus oryzae* KG-5. **Journal of Applied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 35–42, 2007.

SILVA, A. P. S.; CERQUEIRA, G. S.; NUNES, L. C. C.; FREITAS, R. M. Effects of an Aqueous Extract of *Orbignya phalerata* Mart on Locomotor Activity and Motor Coordination in Mice and as Antioxidant in Vitro. **Pharmazie**, v. 67, n. 3, p. 260–263, 2012.

SILVA, G. S. S. **Imobilização de Lipase em Matriz Polimérica para Produção de Bioaroma**. 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, 2012.

SILVA, L. L. **Envelhecimento Acelerado Comparativo de Papéis Kraft Neutro e Termoestabilizado em Óleo Mineral e Éster Natural Isolantes**. 2013. 143 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Tecnologia), Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento, Curitiba - Paraná, 2013.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SIQUEIRA, P. B. **Caracterização Bioquímica de Compostos Bioativos de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. ex Mart.)**. 2012. 148f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2012.

SOARES, N. R. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Caracterização Físico-Química de Sabonete Líquido à Base de Óleo de Baru, Buriti e Pequi**. 2013. 158f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, 2013.

SOUZA, E. C. **Estudo da Oxidação do Óleo de Soja com Diferentes Concentrações de Aditivos Anti-Oxidantes, para Uso em Tratamentos Térmicos de Têmpera**. 2007. 160f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais), Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2007.

SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-State Fermentation for “Whole-Cell Synthetic Lipase” Production from *Rhizopus chinensis* and Identification of the Functional Enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 219–224, 2008.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M. Di; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

UNLU, A.; TANRISEVEN, A.; SEZEN, I. Y.; ÇELIK, A. A New Lipase as a Pharmaceutical Target for Battling Infections Caused by *Staphylococcus aureus*: Gene Cloning and Biochemical Characterization. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 642–651, 2015.

## **CAPÍTULO II**

**CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DAS SEMENTES DE FAVELEIRA  
(*Cnidocolus phyllacanthus*) PARA DETERMINAÇÃO DA  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO DO FUNGO *Rhizopus* sp.**

## RESUMO

A busca por novas matérias primas e o desenvolvimento de tecnologias para utilização em processos de obtenção de biomassa e bioenergia tem tido um grande crescimento no mundo científico-tecnológico. Portanto, este trabalho tem como meta principal, caracterizar o óleo e os resíduos provenientes das sementes de faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus*), além de obter um extrato enzimático a partir do fungo *Rhizopus* sp. (IOC 2291) em meio peptonado e avaliar sua atividade em triacilgliceróis do óleo extraído. As sementes de faveleira apresentaram um alto teor de óleo (33,73%), o que caracteriza essa espécie vegetal como uma típica oleaginosa, possibilitando sua exploração para utilização como biomassa em diversos setores industriais, pois o óleo, após processo de degomagem com  $H_3PO_4$ , resultou em excelentes propriedades físico-químicas. O óleo também foi caracterizado por Espectroscopia na Região do Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, Termogravimetria e Calorimetria. O fungo *Rhizopus* sp. foi utilizado em processo fermentativo em substrato líquido peptonado e verificada sua atividade de crescimento e liberação de metabólitos por meio de medidas de pH e formação de massa micelial. O extrato filtrado após o processo fermentativo foi liofilizado e caracterizado por Infravermelho e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para identificação da lipase. A morfologia do composto foi determinada por meio de Difração de Raios X e Microscopia Eletrônica de Varredura. O poder catalítico do extrato foi testado em óleo de faveleira, apresentando atividade de  $277,49 \text{ U.g}^{-1}$ , maior que o valor encontrado para substratos convencionais como o óleo de oliva ( $220,41 \text{ U.g}^{-1}$ ).

Palavras-chave: Faveleira, Lipase, *Rhizopus* sp.

## ABSTRACT

The search for new raw materials and the development of technologies for use in obtaining biomass and bioenergy processes has had great growth in the scientific-technological world. Therefore, this work has as a main goal to characterize oil and waste from faveleira seeds (*Cnidocolus phyllacanthus*), in addition to obtaining an enzymatic extract from fungus *Rhizopus* sp. (IOC 2291) in peptonated means and evaluate its activity in triacylglycerols of the extracted oil. The faveleira seeds showed a high oil content (33,73%), which characterizes this plant species as a typical oleaginous, enabling their exploitation for use as biomass in many industrial sectors, because the oil after degumming process with  $H_3PO_4$  displayed excellent physico-chemical properties. The oil was also characterized by Spectroscopy Infrared, Proton Nuclear Magnetic Resonance, Thermogravimetry and Calorimetry. The fungus *Rhizopus* sp. was used in fermentative process in liquid substrate peptonated and its growth activity and release of metabolites was checked through pH measurements and mycelial mass formation. The extract filtered after fermentation was lyophilized and characterized by Espectroscopy Infrared and High Performance Liquid Chromatography for the lipase identification. The morphology of the compound was determined by X-ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy. The catalytic power of extract was tested in faveleira oil, presenting activity  $277,49 \text{ U.g}^{-1}$  greater than the value found for conventional substrates such as olive oil ( $220,41 \text{ U.g}^{-1}$ ).

Keywords: Faveleira, Lipase, *Rhizopus* sp.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias e a busca de matérias primas para usar como biomassa tem se tornado, nos últimos anos, um dos grandes desafios das indústrias e instituições de pesquisas (BASSEGODA; CESARINI; DIAZ, 2012; MONTIEL et al., 2014; SU et al., 2014). Portanto, a obtenção e caracterização de lipases e de seus substratos reacionais (triacilgliceróis), para avaliação da atividade catalítica, tem sido muito vasta e de grande importância para o mundo científico-tecnológico (HUANG et al., 2015; JAIN; MISHRA, 2015; UNLU et al., 2015).

As lipases ou triacilglicerol acil-hidrolases são uma classe de enzimas capazes de hidrolisar óleos e gorduras de cadeias longas, proporcionando a formação de ácidos graxos livres e glicerol, podendo haver também a formação de diacilgliceróis e monoacilgliceróis (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; ALI; REN; HUANG, 2014; MOHAMMADI et al., 2015). Essas enzimas são capazes ainda de catalisar reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e lactonização em meios restritos de água e com ambientação adequada de seus reagentes e solventes, além do controle de outros parâmetros reacionais importantes como temperatura e pressão (AN; ZHAO; YE, 2015; KHASANOV; DAVRANOV; RAKHIMOV, 2015; RAMOS et al., 2015).

As lipases são frequentemente utilizadas na indústria de detergentes, um dos setores de maior aplicação dessas enzimas, pois o poder de limpeza desses produtos é aumentado pela adição desses catalisadores (YAN; ZHANG; CHEN, 2013; SU et al., 2014). A indústria alimentícia também ganha com uso das lipases, sendo utilizadas principalmente no setor de derivados do leite, panificação e bebidas (LÓPEZ et al., 2010). Além disso, tem-se observado muitas pesquisas na busca de utilização das lipases no tratamento de efluentes e na produção de energia a partir das reações de transesterificação para obtenção de biodiesel (JAEGER; EGGERT, 2002; SILVA et al., 2009; ARUMUGAM; PONNUSAMI, 2014).

As lipases podem ser obtidas por fonte de origem vegetal, animal ou microbiana (LÓPEZ et al., 2010). A preferência para utilização no meio industrial incide sobre as lipases de origem microbiana, pois são geralmente mais úteis que as de origem vegetal ou animal. Isso pode ser justificado pela grande variedade de

microrganismos que as produzem, pela possibilidade de manipulação genética e pelo rápido crescimento dos microrganismos em meios de baixo custo (MOHAMMADI et al., 2015; UNLU et al., 2015).

Os fungos do gênero *Rhizopus* são bastante utilizados em processos biotecnológicos para produção de substâncias importantes, como o ácido fumárico e láctico (LÓPEZ et al., 2010; KE et al., 2015). No entanto, atualmente há uma grande busca para o desenvolvimento de processos fermentativos que possibilitem a obtenção de extratos enzimáticos a partir desse fungo.

A determinação da atividade lipolítica de extratos enzimáticos é realizada em meio contendo a enzima e o triacilglicerol, e os substratos mais estudados e difundidos nos meios de pesquisa são o óleo de oliva e o óleo de soja (CORADI et al., 2013). O meio reacional é mantido a uma determinada temperatura e o pH é controlado durante o tempo de hidrólise e posteriormente é feita a quantificação dos ácidos liberados (ALMEIDA; TORNISIELO; CARMONA, 2013). Os extratos enzimáticos podem apresentar atividades diferentes em substratos diversos, devido a especificidade das lipases presentes e a variedade de ácidos dos triacilgliceróis de cada óleo (CORADI et al., 2013). Dessa forma é importante estudar as atividades enzimáticas de lipases em outros substratos, dentre os quais pode-se destacar o óleo de faveleira

A faveleira, de nome científico *Cnidocolus phyllacantus* é uma oleaginosa encontrada no Nordeste do Brasil, distribuída principalmente na área do sertão nordestino, com destaque para região de Paulistana-Piauí, que apresenta concentração abundante dessa espécie vegetal (PEREIRA et al., 2012). A utilização da faveleira ainda é muito restrita, no entanto, essa espécie vegetal tem grande potencial biotecnológico, podendo ser importante em diversos setores da indústria, como biomassa para obtenção de energia e também como substrato para determinação de atividade enzimática utilizando lipases (OLIVEIRA et al., 2014).

Portanto, este estudo tem como objetivo extrair o óleo de faveleira a partir de sementes coletadas na região do sertão brasileiro, em Paulistana-Piauí, determinar sua composição química, propriedades físico-químicas e aplicar no processo de determinação de atividade enzimática de extrato enzimático, obtido do processo de fermentação em substrato líquido com fungo *Rhizopus* sp.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS SEMENTES DE FAVELEIRA**

As sementes de faveleira foram coletadas em uma área rural de Paulistana-Piauí, região do sertão nordestino do Brasil. Os grãos posteriormente foram lavados e secos em estufa por 60 °C durante 24 h. Em seguida as sementes foram trituradas e realizada a determinação da composição centesimal (teor de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas) de acordo com os métodos descritos na Association of Official Analytical Chemists: 31.1.02 (AOAC), 31.1.04 (AOAC), 31.4.02 (AOAC), 31.1.08 (AOAC). O teor de carboidratos totais foram calculados por diferença de 100%.

### **2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE FAVELEIRA E DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

O óleo de faveleira extraído foi purificado pelo processo de degomagem com  $H_3PO_4$  e determinada a constituição química pelo processo de transesterificação e posterior análise em cromatógrafo gasoso, segundo metodologia da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), com algumas modificações (ARAÚJO et al., 2014). O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a gás modelo GC17A, com detector de massas (CG-EM) QP5000, Shimadzu, coluna: SP 2560, SUPELCO. Também foram determinados para o óleo de faveleira os valores de viscosidade a 40 °C e densidade a 25 °C. Os índices de acidez, peróxido, saponificação e iodo foram determinados pelas normas analíticas da American Oil Chemical Society (AOCS): Cd 3D-63, Cd 8-53, Cd 8B-90 e Tg 1-64.

### **2.3. ANÁLISE DE INFRAVERMELHO, RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO E ANÁLISES TÉRMICAS DO ÓLEO DE FAVELEIRA**

A análise de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi realizada em espectrômetro Spectrum 100 (Perkin Elmer) com transformada de Fourier com a amostra de óleo em partículas de KBr, fazendo 32 varreduras entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise de RMN  $^1\text{H}$  foi realizada em um espectrômetro Varian Inova de 400 MHz, tendo como solvente o  $\text{CDCl}_3$  que serviu de padrão interno.

Na análise termogravimétrica utilizou-se equipamento TG-DTG, SHIMADZU, modelo DTG-60 na razão de aquecimento de 10  $^\circ\text{C min}^{-1}$  e corrida até 500  $^\circ\text{C}$ .

A análise de Calorimetria foi realizada em equipamento DSC Shimadzu, modelo DSC-60 com razão de aquecimento de 10  $^\circ\text{C min}^{-1}$  e corrida até 500  $^\circ\text{C}$ .

### **2.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO UTILIZANDO FUNGOS *RHIZOPUS* sp. POR MEIO DO PROCESSO FERMENTATIVO EM SUBSTRATO LÍQUIDO**

As cepas do microorganismo *Rhizopus* sp.(IOC 2291) foram fornecidas pelo Instituto Osvaldo Cruz e mantidas sob refrigeração em tubos de ensaio contendo 5 mL de ágar batata dextrose. Para realização do processo fermentativo em substrato líquido foi realizado o processo de extração dos esporos adicionando 2 mL de água autoclavada no tubo de ensaio e agitação em vortex, posteriormente colocou-se 2 mL da solução em 100 mL do meio peptonado. O meio peptonado foi preparado com 25 g de peptona bacteriológica, 0,25 de  $\text{NaNO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,6g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , diluído em água até 500 mL e autoclavado. Posteriormente a mistura constituída por esporos e meio peptonado foi colocada em mesa agitadora com 125 rpm durante 3 dias e temperatura de 30  $^\circ\text{C}$  para que ocorresse o processo fermentativo e a consequente produção de lipases extracelulares. O material fermentado foi filtrado e liofilizado para o processo de caracterização. Foi verificada a variação do pH do meio durante o processo fermentativo e também determinada a quantidade de massa micelial formada.

## **2.5. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR INFRAVERMELHO, CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA, DIFRAÇÃO DE RAIOS X E MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA**

Os espectros de infravermelhos foram obtidos em espectrômetro Spectrum 100 (Perkin Elmer) com transformada de Fourier com a amostra de extrato enzimático diluída em partículas de KBr na razão de 1% em massa, fazendo 32 varreduras entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

A cromatografia Líquida foi realizada utilizando equipamento Agilent, modelo 1260, com detector de arranjo de diodos. A separação ocorreu utilizando a coluna Superdex®200. A fase móvel utilizada foi o tampão Tris/HCl a 0,05  $\text{mol.L}^{-1}$  pH 7,2. A corrida cromatográfica foi de modo isocrático, durante 55 min a um fluxo de 0,5  $\text{mL min}^{-1}$ . O volume de injeção da amostra foi 50  $\mu\text{L}$ . A coluna utilizada foi mantida durante toda corrida a uma temperatura de 25 °C. Por fim, a detecção foi realizada  $\lambda = 280 \text{ nm}$ .

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um difratômetro da marca Rigaku-Rotaflex com anodo rotatório, utilizando-se radiação monocromática  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ) e monocromador de grafite. Utilizou-se uma voltagem de aceleração do tubo de emissão de cobre de 40 kV e corrente de filamento de 150mA, onde utilizou-se uma variação de  $2\theta$  de 5 a 75°.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em microscópio Shimadzu, modelo SSX-550 Superscan. Para análise, as amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido para assim evitar sua deformação plástica. As amostras foram propagadas em uma fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro ("sputtering" - Metalizador Shimadzu-IC-50, utilizando uma corrente de 4 mA).

## **2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

A determinação de atividade enzimática do extrato liofilizado foi realizada através da mistura de 100 mg de extrato liofilizado, 1g de óleo de faveleira e 4 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6, mantendo-se sob agitação constante e a temperatura de 25 °C durante 60 min. Posteriormente a reação foi paralisada pela

adição de 15 mL de acetona:etanol (1:1 v/v) e a atividade foi medida pela titulação dos ácidos graxos liberados com solução de KOH 50 mM até pH 11. Em seguida um branco contendo o mesmo meio reacional sem extrato enzimático foi titulado para a determinação da quantidade pré-existente de ácidos graxos livres no substrato empregado. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto nas condições do ensaio. A atividade enzimática utilizando o óleo de oliva como substrato foi determinada nas mesmas condições.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS SEMENTES DE FAVELEIRA

De acordo com a Tabela 3.1, o teor de óleo das sementes de faveleira provenientes do sertão piauiense é de 33,73%, o que caracteriza a espécie como oleaginosa, ou seja, uma espécie vegetal com alto teor de óleo. Dessa forma, isso poderá proporcionar diversas aplicações, como em processos de obtenção de produtos de limpeza, cosméticos, tintas, vernizes, medicamentos, plásticos e lubrificantes, diminuindo assim, a dependência de outras fontes oleaginosas e possibilitando o desenvolvimento de regiões que cultivam a faveleira (LIMA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014). Além do alto teor de óleo, as sementes de faveleira apresentaram um relevante teor de proteínas e carboidratos, o que pode possibilitar sua utilização na dieta humana, desde que seja comprovada a ausência de substâncias tóxicas ou alergênicas. Além disso, a torta de faveleira, que é o resíduo proveniente do processo de extração do óleo das sementes, pode ser uma excelente fonte de substrato para microrganismos, como o fungo *Rhizopus* sp., para obtenção de extratos enzimáticos a partir da fermentação em substrato sólido, devido ao seu alto teor de proteínas (22,14%) e carboidratos (35,58%).

**Tabela 3.1.** Composição Centesimal das Sementes de Faveleira

| <b>Componente Centesimal</b> | <b>Concentração (%)</b> |
|------------------------------|-------------------------|
| Umidade                      | 4,72 ± 0,01             |
| Lipídio                      | 33,73 ± 0,27            |
| Proteína (N x 6,25)          | 22,14 ± 0,17            |
| Cinza                        | 3,81 ± 0,03             |
| Carboidrato                  | 35,58                   |

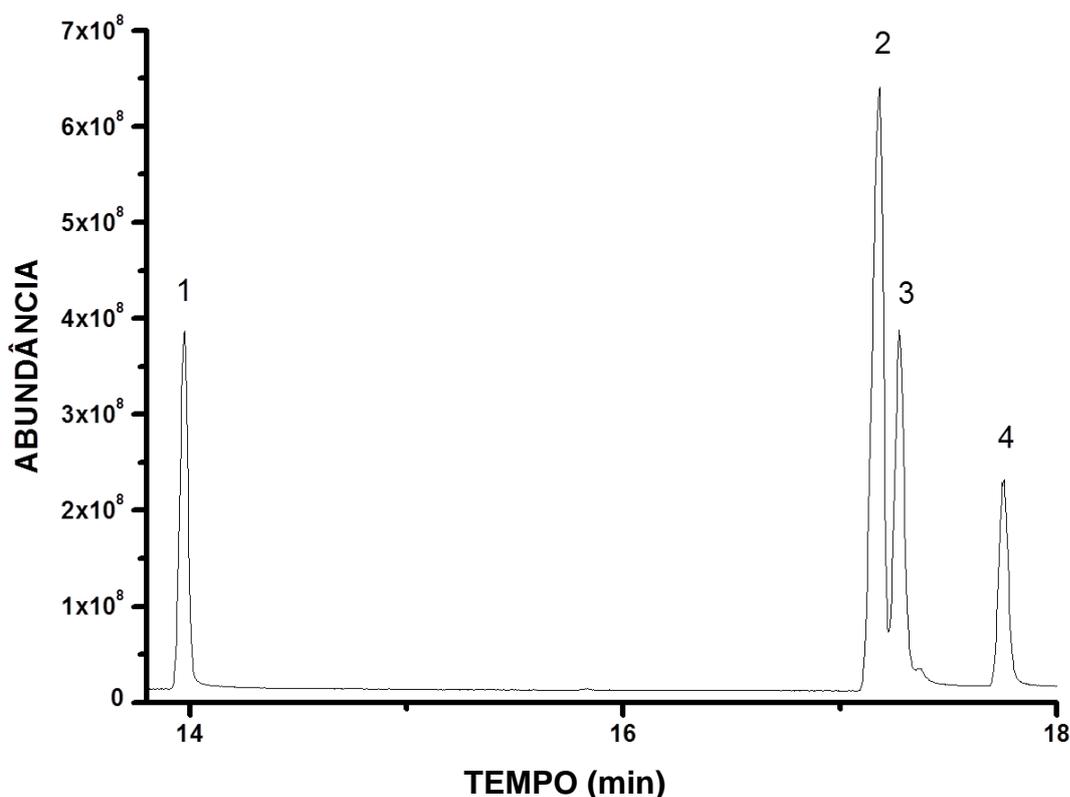
#### 3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE FAVELEIRA

O cromatograma obtido do óleo de faveleira (Figura 3.1), após o processo de transesterificação com hidróxido de potássio apresentou 19,83% de ácido palmítico (pico 1), 41,71% de ácido linoleico (pico 2), 22,94% de ácido oleico (pico 3) e

15,50% de ácido esteárico (pico 4). Pode-se observar uma predominância de ácidos insaturados correspondendo a 64,65% (picos 2 e 3), o que pode ser importante para indústria de diversos setores, pois a presença de ácidos insaturados representa excelentes propriedades físico-químicas e biológicas, e na dieta humana a presença de ácidos insaturados provenientes de óleos vegetais proporcionam benefícios na regulação de diversos processos fisiológicos do corpo humano.

As enzimas podem ser classificadas em lipases e esterases e uma diferença importante entre as duas está no tipo de moléculas que as mesmas podem catalisar. Enquanto as esterases hidrolisam triacilgliceróis com ácidos de cadeia carbônica curta, menor que 10 átomos de carbono, as lipases se caracterizam por hidrolisar moléculas de triacilgliceróis de ácido de cadeia maior que 10 átomos de carbono (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; BAUR et al., 2015; CAO et al., 2015; CHEN et al., 2015). Portanto, observando a constituição do óleo de faveleira (formado por ácidos acima de 10 átomos de carbono) pode-se inferir que o seu triacilglicerol pode ser utilizado em processos de hidrólise utilizando lipases e conseqüentemente em outros processos reacionais que envolvem esses biocatalisadores.

**Figura 3.1.** Cromatograma do Óleo de Faveleira



### 3.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE FAVELEIRA

A qualidade de óleos vegetais e conseqüentemente a sua aplicação como biomassa em processos industriais está totalmente ligada às suas propriedades físico-químicas, que são condicionadas pela sua composição química.

Nas indústrias de alimentos, as propriedades fluidodinâmicas, como viscosidade e densidade, são fundamentais e determinantes para sua aceitação no mercado consumidor, assim como são importantes para a execução de projetos de equipamentos e de processos de manejo do óleo (LIMA et al., 2007). Portanto, de acordo com a Tabela 3.2, os valores de viscosidade ( $30,07 \pm 0,012 \text{ mm}^2.\text{s}^{-1}$ ) e densidade ( $0,9092 \pm 0,0003 \text{ g.cm}^{-3}$ ) para o óleo de faveleira estão dentro da faixa de valores encontrados para outros óleos utilizados no mercado, como os óleos de soja, milho e algodão (BROCK et al., 2008).

A Agência de Vigilância Sanitária, órgão regulador da qualidade de óleos vegetais consumidos no Brasil, determina que o limite máximo para os índices de acidez e peróxido sejam de  $4,0 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $12,0 \text{ mEq.Kg}^{-1}$  (MUNIZ et al., 2015), respectivamente, portanto os valores encontrados para o óleo de faveleira estão dentro dos parâmetros estabelecidos pelo órgão.

O índice de iodo é representado pela quantidade de iodo que reage com 100 gramas de óleo e determina o grau de insaturações presentes nos óleos vegetais (MUNIZ et al., 2015), ou seja, quanto maior o número de ligações duplas ou triplas nos constituintes do triacilglicerol de um óleo, maior o índice de iodo. Já o índice de saponificação é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessários para saponificar os ácidos graxos (MUNIZ et al., 2015) e indica o tamanho da massa molecular dos ácidos formadores do triacilglicerol, ou seja, quanto maior o índice de saponificação menor é a massa molecular dos ácidos formadores do éster (LIMA et al., 2007; ARAÚJO; MOURA; CHAVES, 2010). Portanto, o óleo de faveleira apresentou índice de iodo e de saponificação muito próximos de outros óleos vegetais (GOMES et al., 2003; KOBORI; JORGE, 2005; SHIMAMOTO; FAVARO; TUBINO, 2015).

Dessa forma, os resultados para as propriedades físico-químicas do óleo de faveleira estão dentro dos limites estabelecidos pela agência reguladora brasileira e ou próximos dos valores constatados para outros óleos vegetais, possibilitando assim sua inserção no mercado de consumo e o conseqüente desenvolvimento de regiões que cultivam essa espécie oleaginosa.

**Tabela 3.2.** Propriedades Físico-Químicas do Óleo de Faveleira

| <b>Propriedades Físico-Químicas</b>                     | <b>Óleo de Faveleira</b> |
|---|--------------------------|
| Viscosidade a 40 °C (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> ) | 30,07 ± 0,012            |
| Densidade a 25 °C (g.cm <sup>-3</sup> )                 | 0,9092 ± 0,0003          |
| Índice de Acidez (mg.g <sup>-1</sup> )                  | 0,48 ± 0,002             |
| Índice de Peróxido (mEq.Kg <sup>-1</sup> )              | 1,94 ± 0,125             |
| Índice de Iodo (g.100g <sup>-1</sup> )                  | 114,18 ± 0,421           |
| Índice de Saponificação (mg.g <sup>-1</sup> )           | 199,16 ± 0362            |

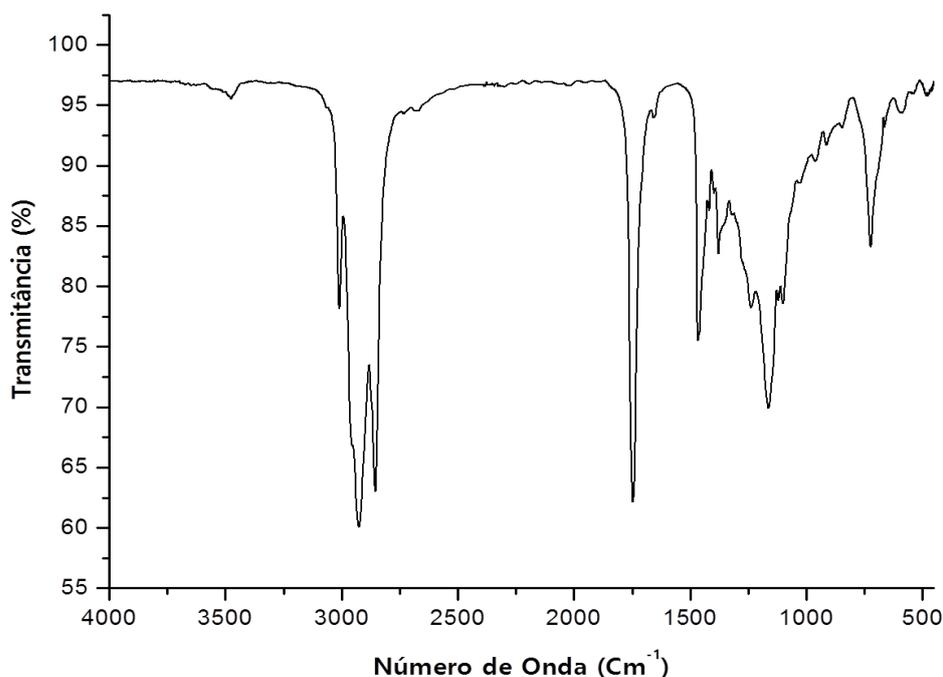
### **3.4. CARACTERIZAÇÃO POR INFRAVERMELHO, RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO E ANÁLISE TÉRMICA DO ÓLEO DE FAVELEIRA**

O controle de qualidade de óleos vegetais, como a pureza, o processo de refinamento, o teor de água podem ser determinados por diversas técnicas químicas, dentre elas destacam-se as análises por infravermelho e a ressonância magnética nuclear (LOPES; FASCIO, 2004).

No espectro de infravermelho do óleo de faveleira (Figura 3.2) podem-se destacar os picos característicos de triacilgliceróis. Em 1745 cm<sup>-1</sup> há um pico que se refere à carbonila do ésteres (ARAÚJO; MOURA; CHAVES, 2010). Em 1237 cm<sup>-1</sup>, 1163 cm<sup>-1</sup> e 1101 cm<sup>-1</sup> os picos referentes às ligações C-O. Em 3009 cm<sup>-1</sup>, observa-se também, em menor intensidade, os estiramentos das ligações duplas presentes nas insaturações dos ácidos oléicos e linoleicos. Enquanto que em 2924 cm<sup>-1</sup> e 2854 cm<sup>-1</sup>, com maior intensidade, observa-se os estiramentos das ligações simples dos carbonos presentes em grande maioria em todos os ácidos que constituem o óleo de faveleira. Não há presença significativa de água, pela falta de uma banda larga em

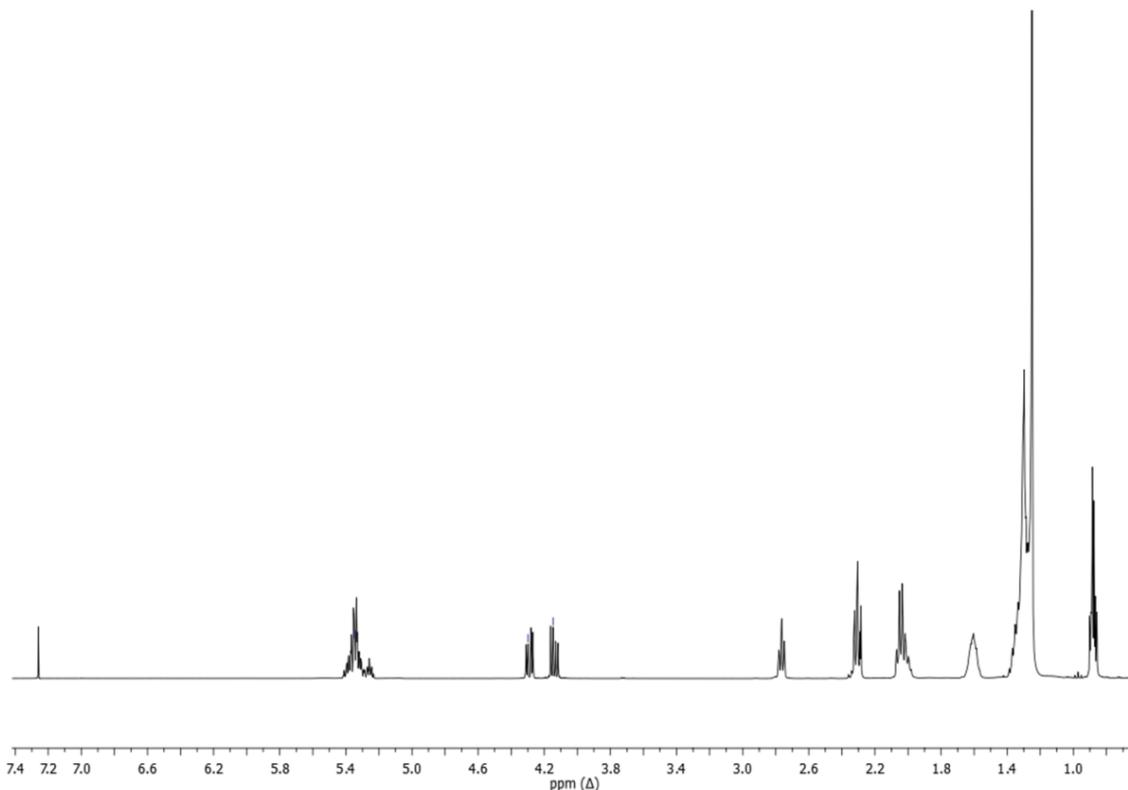
aproximadamente  $3400\text{ cm}^{-1}$  e também não foi constatada a presença de outros estiramentos que caracterizem a presença de contaminantes no óleo, confirmando a eficácia do processo de degomagem do óleo com ácido fosfórico.

**Figura 3.2.** Espectro de Infravermelho do Óleo de Faveleira



O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 3.3) apresenta picos bem definidos e característicos de triacilgliceróis. Pode-se destacar a presença de sinais consistentes  $\delta$  0,88 dos hidrogênios metilênicos terminais da cadeia hidrocarbônica; um sinal largo em  $\delta$  1,25 referente aos hidrogênios da cadeia metilênica; um multipeto em  $\delta$  1,61 dos grupos metilênicos  $\beta$ -carbonílicos; um multipeto em  $\delta$  2,03 dos hidrogênios metilênicos alílicos; dois tripletos em  $\delta$  2,30 e 2,76 dos grupos metilênicos  $\alpha$ -carbonílicos e *bis*-alílicos, respectivamente; dois sinais em  $\delta$  4,16 e 4,28 dos hidrogênios oximetilênicos do resíduo de glicerol; um multipeto entre  $\delta$  5,33 referente aos hidrogênios olefínicos da cadeia e oximetínico do glicerol (ARAÚJO et al., 2014).

**Figura 3.3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Óleo de Faveleira

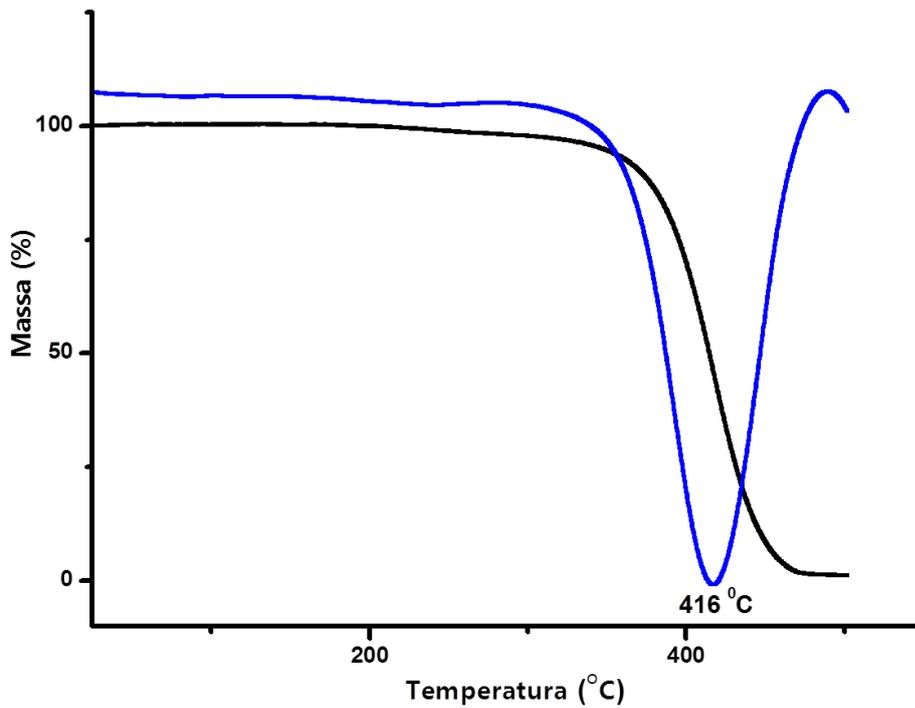


A estabilidade térmica e oxidativa do óleo é um fator determinante para processos de conservação e também para utilização do mesmo em diversos setores industriais. Essa estabilidade pode ser verificada por meio das análises térmicas como a termogravimetria (TG) e calorimetria (DSC).

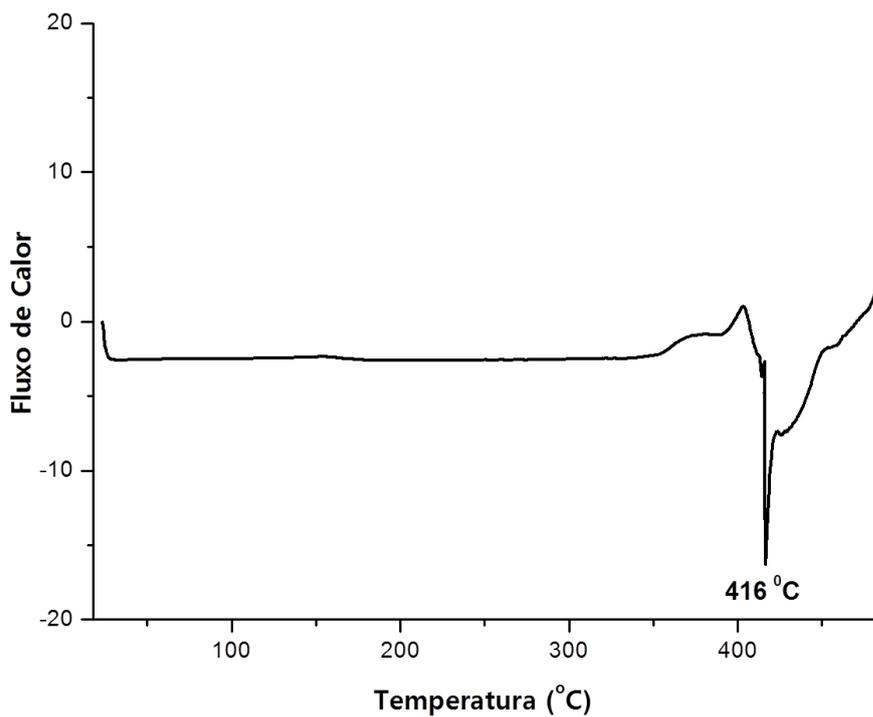
A curva de TG (Figura 3.4) mostra um único pico de perda de massa em 416 °C que corresponde ao processo de decomposição dos triacilgliceróis do óleo de faveleira (ARAÚJO et al., 2014; MUNIZ et al., 2015). Isso demonstra que o óleo de faveleira tem uma alta estabilidade térmica, maior que óleos de outras espécies oleaginosas bastante utilizadas em setores industriais como soja, algodão, babaçu dentre outros (SANTOS et al., 2002; SOUZA et al., 2007). Também pode-se observar que não há outra perda de massa ou formação de resíduo significativo, apenas 1,2%, o que indica que o processo de degomagem com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  foi eficaz para retirada de gomas e resíduos presentes.

Essa alta estabilidade térmica verificada pela perda de massa pode ser corroborada pelo perfil calorimétrico (Figura 5.5), em que se observa uma transição exotérmica em 416 °C referentes à combustão dos triacilgliceróis presentes no óleo.

**Figura 3.4.** Perfil Termogravimétrico do Óleo de Faveleira



**Figura 3.5.** Perfil Calorimétrico do Óleo de Faveleira



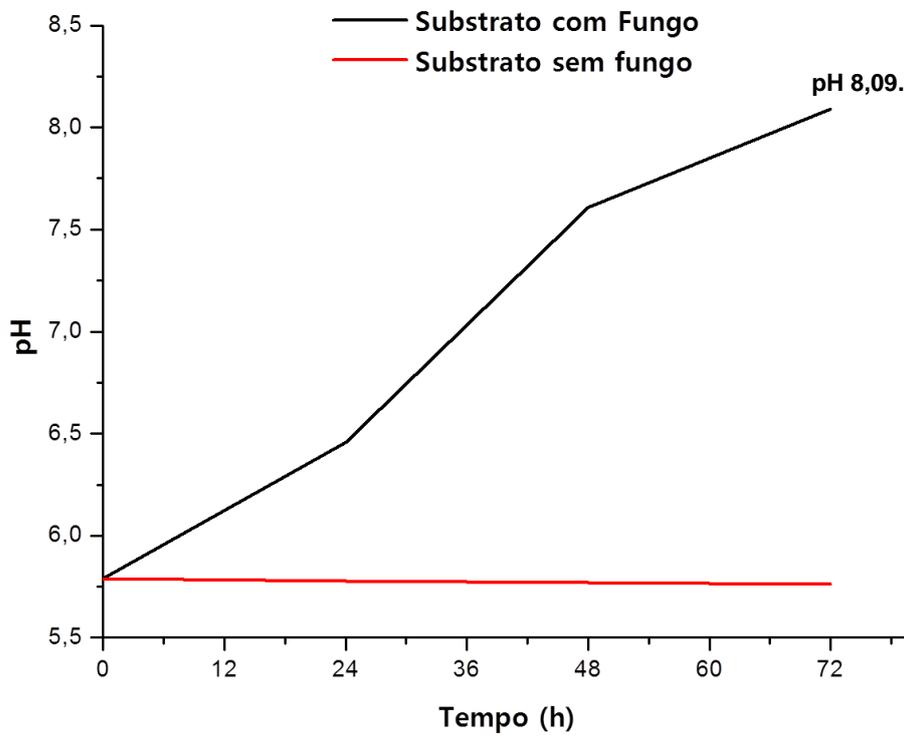
Dessa forma, levando em consideração todas as propriedades estudadas para o óleo de sementes de faveleira coletadas na região do semi-árido brasileiro, pode-se considerar que o potencial biotecnológico do mesmo é muito vasto, podendo ser aplicado em diversos setores da cadeia produtiva e gerar renda para as comunidades que produzem essa espécie oleaginosa, pois atualmente é pouco explorada. Portanto, uma das aplicações estudadas nesse trabalho para esse óleo vegetal foi no processo de hidrólise utilizando extrato enzimático provenientes do fungo *Rhizopus*. Em trabalhos futuros poderão ser utilizados os resíduos do processo de extração do óleo de faveleira em fermentações com microrganismos para obtenção de compostos enzimáticos.

### **3.5. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DO FUNGO *Rhizopus* sp.**

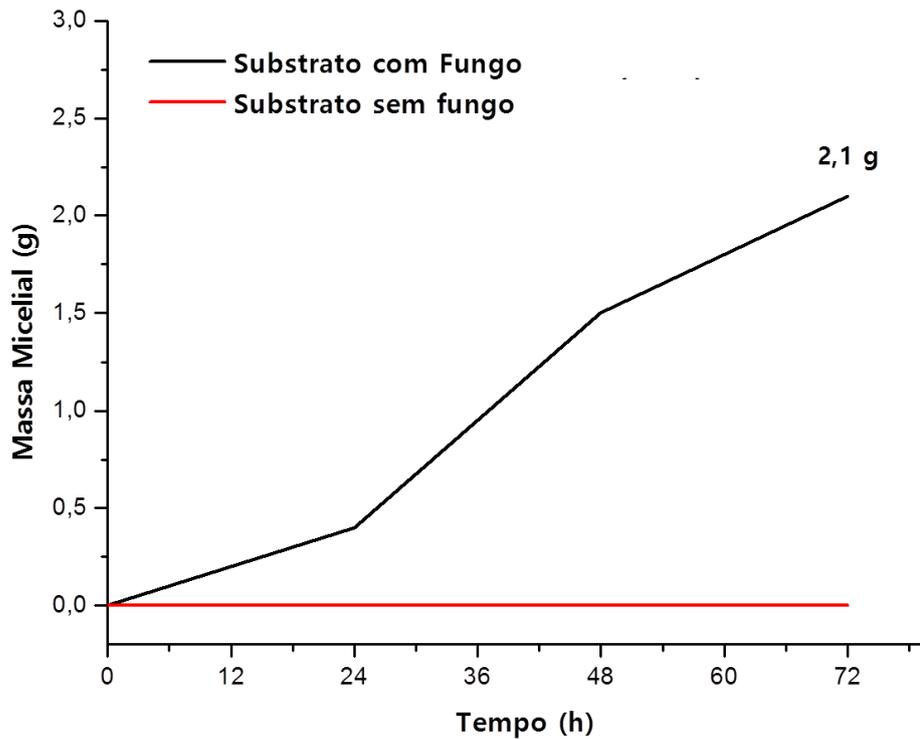
Para avaliação das mudanças químicas e conseqüentemente da atividade do microrganismo durante o processo fermentativo no substrato líquido peptonado com o fungo *Rhizopus* sp., foi realizada a determinação de pH a cada 24 h, pois o metabolismo do fungo, ao crescer, consome e libera diversas substâncias, dentre elas as lipases, que proporcionam alterações químicas no sistema (DAR et al., 2015; MULDER et al., 2015). Diversos trabalhos de obtenção de lipases em substratos líquidos tem demonstrado um aumento de pH durante o processo fermentativo (TAN et al., 2004; BROZZOLI et al., 2009; ALI; RAFI; HAQ, 2010; KIM et al., 2011; ALMEIDA; TORNISIELO; CARMONA, 2013; LIMA et al., 2014; RAMESH et al., 2014). Portanto, pode-se observar pela Figura 3.6 que durante os 3 dias de fermentação do meio peptonado com o fungo *Rhizopus* sp., houve um significativo aumento do pH, indicando uma grande atividade do microrganismo no meio e a possível formação de lipases.

Outro fator para determinação da atividade do microrganismo em determinados meios de fermentação consiste na formação de massa micelial do microrganismo utilizado (PAPAGIANNI, 2014), dessa forma, houve uma formação total de 2,1 g (Figura 5.7) de micélio por 100 mL do meio fermentativo utilizado, o que sugere que o meio continha nutrientes que proporcionaram o crescimento do fungo e conseqüentemente a formação de lipase.

**Figura 3.6.** Variação de pH Durante o Processo Fermentativo com Fungo *Rhizopus* sp.



**Figura 3.7.** Produção de Massa Micelial Durante o Processo Fermentativo com Fungo *Rhizopus* sp.

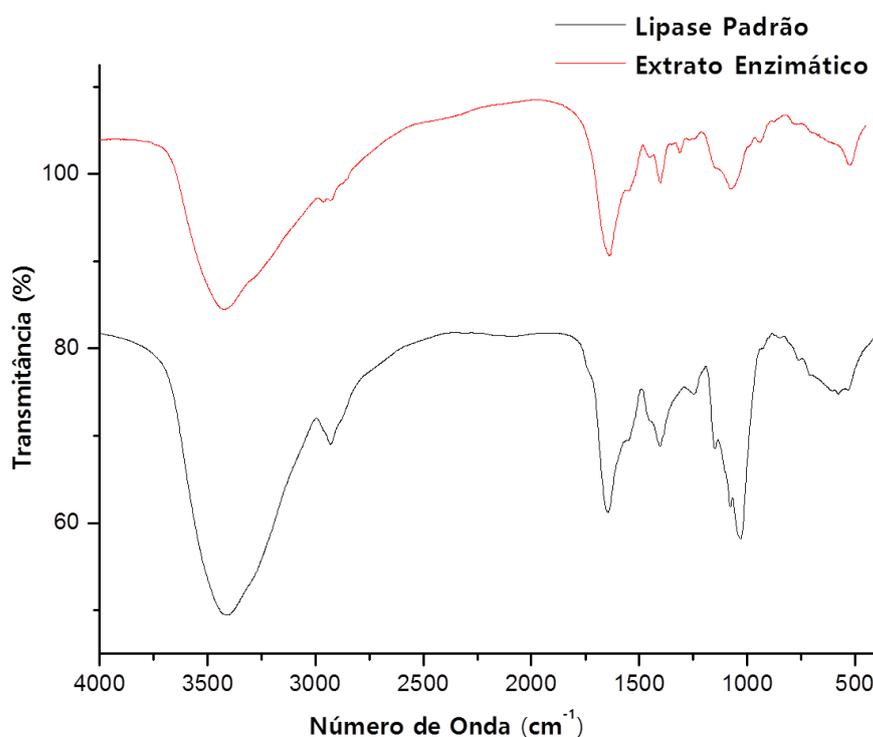


Após o processo fermentativo e a filtração para retirada da massa micelial e de outros compostos indesejados maiores e obter apenas substâncias que se encontram dentro da faixa de tamanho encontrados para enzimas, o filtrado foi liofilizado e caracterizado por infravermelho, cromatografia gasosa, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura.

As enzimas são constituídas de cadeias de polímeros formadas por aminoácidos que estão unidos entre si por ligações peptídicas. As forças intermoleculares e intramoleculares, como as ligações de hidrogênio e forças de Van Der Walls, determinam a conformação e a estabilidade da estrutura molecular.

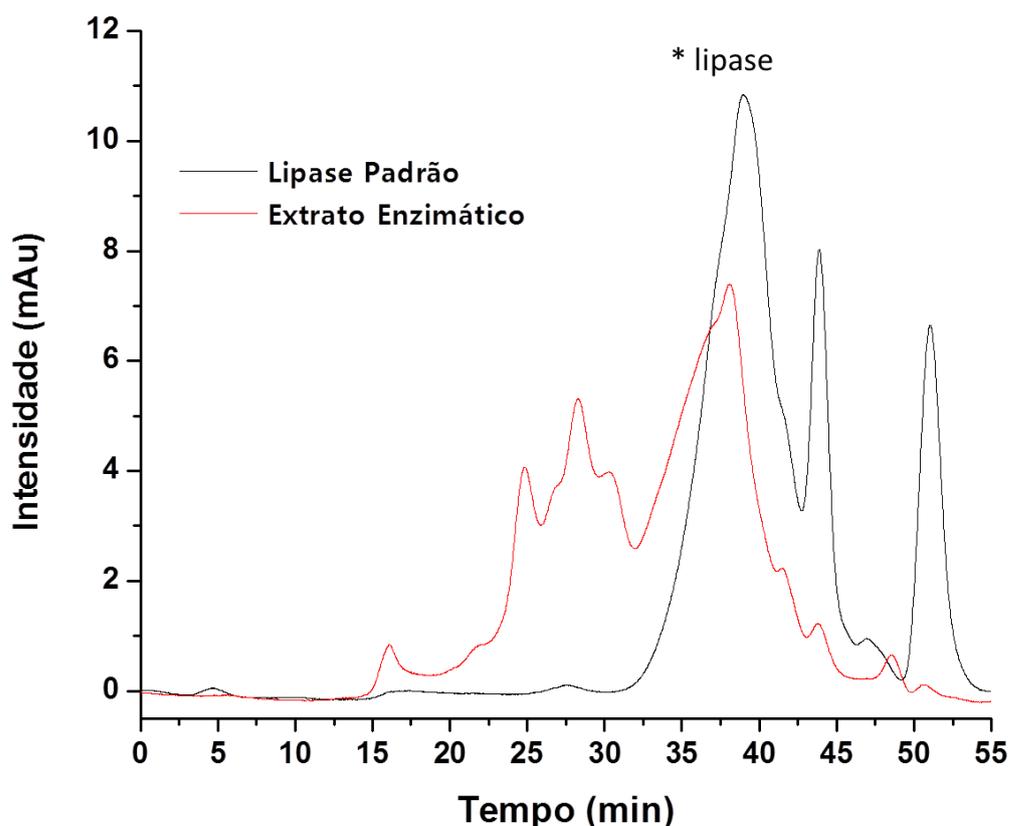
O espectro de infravermelho do extrato enzimático obtido é semelhante ao espectro de uma lipase purificada (Figura 3.8), em que pode-se observar as bandas típicas de lipases que estão associadas ao grupamento amino. Dessa forma, no comprimento de onda situada entre  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$  estão exibidos as vibrações dos grupamentos amino primários e secundários e a região formada por uma banda larga com ponto máxima em torno de  $3420\text{ cm}^{-1}$  corresponde à região atribuída aos aminoácidos terminais presentes na enzima (PAULA et al., 2008).

**Figura 3.8.** Espectro de Infravermelho do Extrato Enzimático e de Lipase Padrão



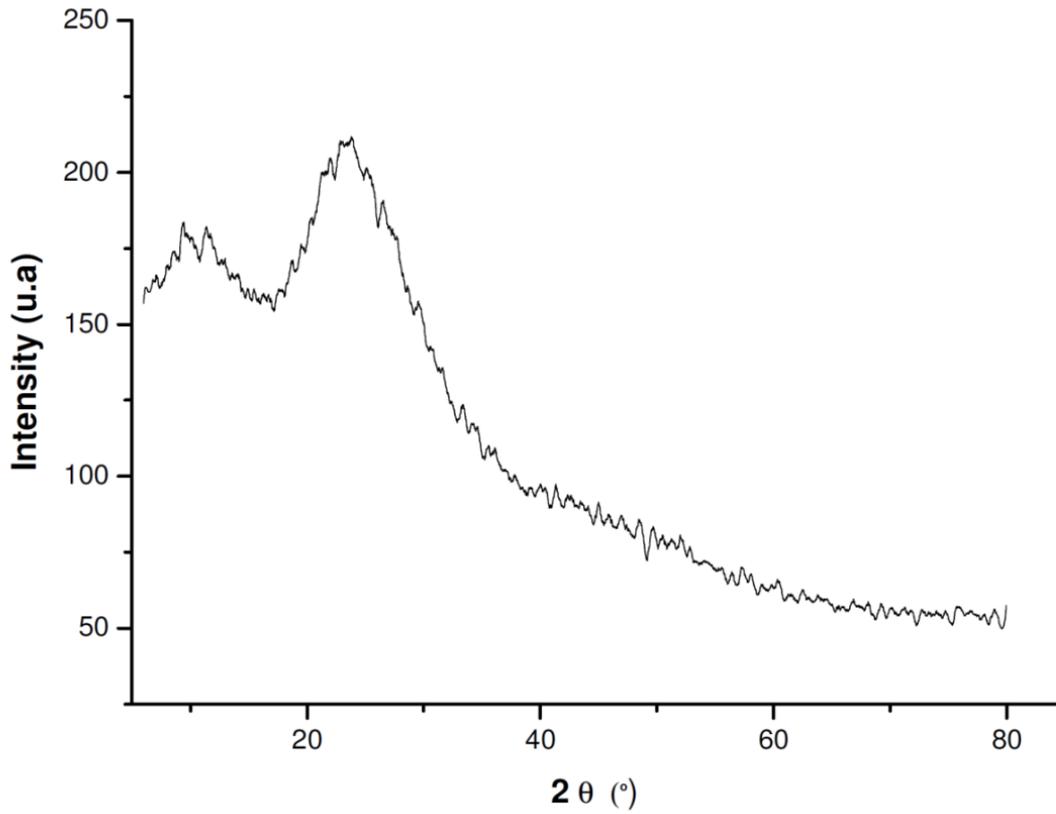
No cromatograma do extrato enzimático, pode-se observar um pico largo atribuído à lipase, identificado por meio de um padrão inserido nas mesmas condições de análise. Dessa forma pode-se ratificar a presença de lipase no extrato enzimático obtido e, portanto, confirmar a atuação do microrganismo no processo fermentativo para obtenção desses catalisadores biológicos.

**Figura 3.9.** Cromatograma do Extrato Enzimático e Lipase Padrão



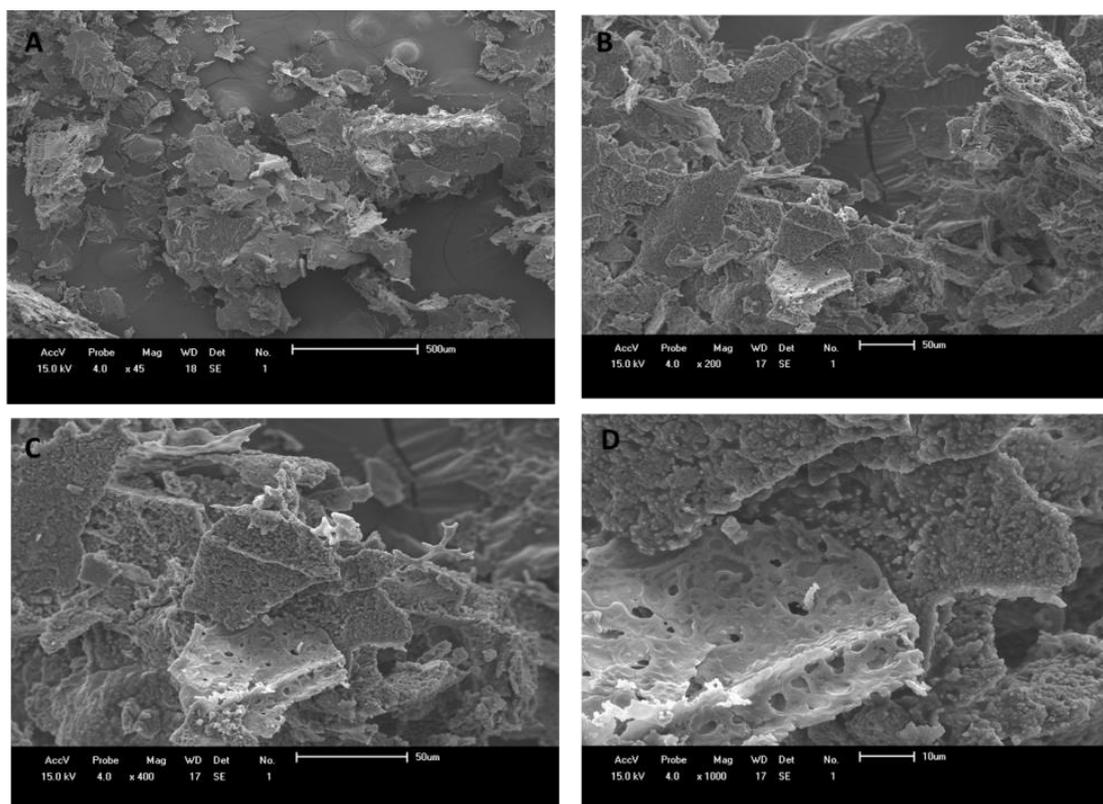
Para determinação do grau de cristalinidade e da morfologia do extrato enzimático foram realizadas análises de difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura. Pode-se observar pela análise de DRX (Figura 3.10) que se trata de um material essencialmente amorfo, pois o gráfico apresenta picos largos, dispersos e poucos intensos, isso é esperado para materiais orgânicos formados essencialmente por enzimas (ARAÚJO et al., 2010).

**Figura 3.10.** Difratoograma do Extrato Enzimático



Essa não cristalinidade do material é confirmada pela microscopia eletrônica de varredura (Figura 5.11), pois as imagens demonstram um material não uniforme, ou seja, partículas dispersas e com tamanhos diferentes (CALLIARI; MAGNANI; GÓMEZ, 2011). Essa característica é importante, pois a ausência de cristalinidade apresenta uma relação direta com a obtenção de uma matriz íntegra e mais eficiente na proteção de compostos bioativos, além de apresentarem uma maior solubilidade do que os compostos cristalinos (CALLIARI; MAGNANI; GÓMEZ, 2011).

**Figura 3.11.** Microscopia Eletrônica de Varredura do Extrato Enzimático



### **3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Um outro método para identificação de lipase em extratos provenientes de microorganismos, e também quantificar a atividade enzimática em determinado substrato (triacilglicerol) se dá por meio da titulação após a reação de hidrólise pela liberação do ácidos graxos (FENDRI et al., 2012; ALMEIDA; TORNISIELO; CARMONA, 2013). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de extrato enzimático que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio, e pode ser quantificada através da equação 1:

$$UA = \frac{(V_a - V_b) * 1000 * M_{KOH}}{t \text{ (min)} * m_{\text{Extrato Enzimático}}} \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que **V<sub>a</sub>** refere-se ao volume de KOH utilizado na titulação após a reação de hidrólise; **V<sub>b</sub>** é o volume para titulação do branco; **M<sub>NaOH</sub>** é a concentração molar do hidróxido de potássio; **t (min)** é o tempo da reação em minutos e **m<sub>extrato enzimático</sub>** refere-se à massa de extrato enzimático utilizado em gramas.

O triacilglicerol bastante utilizado para determinação de atividade enzimática é proveniente do óleo de oliva, no entanto, a busca de novas alternativas para determinação de atividade enzimática é necessária e importante para divulgação científica, pois abre maiores perspectivas para o desenvolvimento de enzimas e substratos analíticos, portanto a atividade enzimática com o óleo de faveleira foi de  $277,49 \pm 0,54 \text{ U.g}^{-1}$ , enquanto que a atividade encontrada para o óleo de oliva foi de  $220,41 \pm 0,90 \text{ U.g}^{-1}$ , indicando que o óleo de faveleira pode ser uma alternativa importante para utilização em processos de determinação de atividade enzimática de lipases provenientes de *Rhizopus* sp, além disso, todos os resultados deste trabalho demonstram que o óleo de faveleira é uma excelente fonte alternativa não só para determinação de atividade enzimática, como também para sua utilização em diversos setores da indústria, devido às suas excelentes propriedades físicas e químicas.

#### 4. CONCLUSÕES

As sementes de faveleira da região do sertão piauiense apresentaram um alto teor de óleo e excelentes propriedades físico-químicas, o que pode proporcionar sua utilização como biomassa em diversos setores da indústria.

A torta de faveleira apresentou um grande teor de proteínas e carboidratos sendo uma alternativa para os processos de fermentação em substrato sólido de microrganismos.

O óleo de faveleira é composto essencialmente por ácidos de cadeia longa (mais de 10 átomos de carbono), o que proporciona sua utilização como substrato em processos de determinação de atividade enzimática e em outros processos reacionais que envolvem lipases como catalisadores.

O processo de degomagem utilizado resultou em um óleo de alta pureza, confirmado pelas análises de infravermelho e ressonância magnética nuclear, além de apresentar alta estabilidade térmica, confirmada pelas análises termogravimétrica e calorimétrica.

O processo fermentativo em substrato líquido peptonado com fungo *Rhizopus* sp. resultou em significativas alterações do pH e formação de massa micelial, determinando uma boa interação do fungo com o meio.

A lipase do extrato enzimático liofilizado foi identificada por meio de Espectroscopia na Região do Infravermelho e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, e sua morfologia foi definida como amorfa, segundo princípios estabelecidos por Difração de Raios X e Microscopia Eletrônica de Varredura.

A atividade enzimática do extrato obtido foi maior em óleo de faveleira do que em substrato convencionalmente utilizado como o óleo de oliva.

## 5. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelo financiamento da bolsa em nível de doutorado ao autor principal. Ao Laboratório de Biodiesel e Materiais (LBM) e ao Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA), ambos pertencentes à Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela disponibilização da estrutura que permitiu a realização deste trabalho e ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz pelo fornecimento das cepas de fungo *Rhizopus* sp. (IOC 2291).

## 6. REFERÊNCIAS

- ALI, S.; RAFI, H.; HAQ, I. U. Production of an Extracellular Lipase from *Candida Lipolytica* and Parameter Significance Analysis by Plackett-Burman Design. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 5, p. 465–473, 2010.
- ALI, S.; REN, S.; HUANG, Z. Extracellular Lipase of an Entomopathogenic Fungus Effecting Larvae of a Scale Insect. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1148–1159, 2014.
- ALMEIDA, A. F.; TORNISIELO, S. M. T.; CARMONA, E. C. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Lipase Production by a Newly Isolated *Candida viswanathii* Strain. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1225–1234, 2013.
- ALMEIDA, A. F.; TORNISIELO, S. M. T.; CARMONA, E. C. Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties and Potential Application. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1–10, 2013.
- AN, D.; ZHAO, X.; YE, Z. Enzymatic Synthesis and Characterization of Galactosyl Monoesters. **Carbohydrate research**, v. 414, p. 32–38, 2015.
- ARAÚJO, C. S. T.; ALVES, V. N.; REZENDE, H. C.; ALMEIDA, I. L. S.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; TARLEY, C. R. T.; SEGATELLI, M. G.; COELHO, N. M. M. Characterization and Use of *Moringa oleifera* Seeds as Biosorbent for Removing Metal Ions from Aqueous Effluents. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 9, p. 2198–2203, 2010.
- ARAÚJO, F. D. S.; ARAÚJO, I. C.; COSTA, I. C. G.; MOURA, C. V. R.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, E. C. E. Study of Degumming Process and Evaluation of Oxidative Stability of Methyl and Ethyl Biodiesel of *Jatropha curcas* L. Oil from Three Different Brazilian States. **Renewable Energy**, v. 71, p. 495–501, 2014.
- ARAÚJO, F. D. S.; MOURA, C. V. R.; CHAVES, M. H. Methyl Biodiesel from *Dipteryx lacunifera*: Preparation, Characterization and Effect of Antioxidant on the Oxidation Stability. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1671–1676, 2010.
- ARUMUGAM, A.; PONNUSAMI, V. Biodiesel Production from *Calophyllum inophyllum* Oil Using Lipase Producing *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized within Reticulated Foams. **Renewable Energy**, v. 64, p. 276–282, 2014.

BASSEGODA, A.; CESARINI, S.; DIAZ, P. Lipase Improvement: Goals and Strategies. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–8, 2012.

BAUR, C.; KREWINKEL, M.; KRANZ, B.; VON NEUBECK, M.; WENNING, M.; SCHERER, S.; STOECKEL, M.; HINRICHS, J.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Quantification of the Proteolytic and Lipolytic Activity of Microorganisms Isolated from Raw Milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 23–29, 2015.

BROCK, J.; NOGUEIRA, M. R.; ZAKRZEWSKI, C.; CORAZZA, F. D.; CORAZZA, M. L.; DE OLIVEIRA, J. V. Experimental Measurements of Viscosity and Thermal Conductivity of Vegetable Oils. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 564–570, 2008.

BROZZOLI, V.; CROGNALE, S.; SAMPEDRO, I.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A.; PETRUCCIOLI, M. Assessment of Olive-mill Wastewater as a Growth Medium for Lipase Production by *Candida cylindracea* in Bench-top Reactor. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3395–3402, 2009.

CALLIARI, C. M.; MAGNANI, M.; GÓMEZ, R. J. H. C. Production, Characterization and Technological Properties of Biopolymer Produced by *Agrobacterium radiobacter* k84. **Semina: Ciencias Agrarias**, v. 32, n. 2, p. 633–644, 2011.

CAO, J.; DANG, G.; LI, H.; LI, T.; YUE, Z.; LI, N.; LIU, Y.; LIU, S.; CHEN, L. Identification and Characterization of Lipase Activity and Immunogenicity of LipL from *Mycobacterium tuberculosis*. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. 1–20, 2015.

CHEN, H.; ZHANG, T.; JIA, J.; VASTERMARK, A.; TIAN, R.; NI, Z.; CHEN, Z.; CHEN, K.; YANG, S. Expression and Display of a Novel Thermostable Esterase from *Clostridium thermocellum* on the Surface of *Bacillus subtilis* Using the CotB Anchor Protein. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 11, p. 1439–1448, 2015.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and Impact of Protease and Lipase Activities in Milk and Milk Powders. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p.255-275, 2003.

CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Comparing Submerged and Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Residues for the Production and Characterization of Lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 533–540, 2013.

DAR, G. H.; KAMILI, A. N.; NAZIR, R.; BANDH, S. a; JAN, T. R.; CHISHTI, M. Z. Enhanced Production of  $\alpha$ -amylase by *Penicillium chrysogenum* in Liquid Culture by Modifying the Process Parameters. **Microbial pathogenesis**, v. 88, p. 10–15, 2015.

FENDRI, A.; LOUATI, H.; SELLAMI, M.; GARGOURI, H.; SMICHI, N.; ZARAI, Z.; AISSA, I.; MILED, N.; GARGOURI, Y. A Thermoactive Uropygial Esterase from Chicken: Purification, Characterisation and Synthesis of Flavour Esters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 5, p. 1238–1244, 2012.

GOMES, J. C.; SOARES, L. F.; ANGELINA, C.; PEREIRA, C. A. S.; JHAM, G. N. Effects of Paraquat on the Quality of Lipidic Fraction of Soybean. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 178–184, 2003.

HUANG, S.; LI, X.; XU, L.; KE, C.; ZHANG, R.; YAN, Y. Protein-Coated Microcrystals from *Candida rugosa* Lipase: Its Immobilization, Characterization, and Application in Resolution of Racemic Ibuprofen. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 1, p. 36–47, 2015.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for Biotechnology Current Opinion in Biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAIN, D.; MISHRA, S. Multifunctional Solvent Stable *Bacillus* Lipase Mediated Biotransformations in the Context of Food and Fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 117, p. 21–30, 2015.

KE, W.; CHANG, S.; CHEN, X.; LUO, S.; JIANG, S.; YANG, P.; WU, X.; ZHENG, Z. Metabolic Control Analysis of L-lactate Synthesis Pathway in *Rhizopus oryzae* As 3.2686. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 11, p. 2189–2199, 2015.

KHASANOV, K. T.; DAVRANOV, K.; RAKHIMOV, M. M. State of Fungal Lipases of *Rhizopus microsporus*, *Penicillium* sp. and *Oospora lactis* in Border Layers Water—solid Phase and Factors Affecting Catalytic Properties of Enzymes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 600–607, 2015.

KIM, H. R.; KIM, I. H.; HOU, C. T.; KWON, K. II; SHIN, B. S. Production of a Novel Cold-Active Lipase from *Pichia lynnferdii* Y-7723. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1322–1326, 2011.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Characterization of Some Seed Oils of Fruits for Utilization of Industrial Residues. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1008–1014, 2005.

LIMA, B. F.; AMORIM, H. S.; NASCIMENTO, A. E.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A. Selection of Media of Production Lipase Samples by *Aspergillus* sp Isolated from Caatinga in Pernambuco. **E-xacta**, v. 7, n. 1, p. 147–157, 2014.

LIMA, J. R. D.; SILVA, R. B.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS, J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel from Babassu (*Orbignya* sp.) Synthesized Via Ethanol Route. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 600–603, 2007.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Flow Chart for Infrared Spectra Interpretation of Organic Compounds. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

LÓPEZ, E.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Strategies for Utilisation of Food-Processing Wastes to Produce Lipases in Solid-state Cultures of *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 8, p. 929–935, 2010.

MOHAMMADI, M.; SEPEHRIZADEH, Z.; HABIBI, A. E.; REZA SHAHVERDI, A.; FARAMARZI, M. A.; SETAYESH, N. Bacterial Expression and Characterization of an Active Recombinant Lipase A from *Serratia marcescens* with Truncated C-terminal Region. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 84–92, 2015.

MONTIEL, M. C.; SERRANO, M.; MÁXIMO, M. F.; GÓMEZ, M.; REQUENA, S. O.; BASTIDA, J. Synthesis of Cetyl Ricinoleate Catalyzed by Immobilized Lipozyme CalB Lipase in a Solvent-Free System. **Catalysis Today**, v. 255, p. 49–53, 2014.

MULDER, K. C. L.; MULINARI, F.; FRANCO, O. L.; SOARES, M. S. F.; MAGALHÃES, B. S.; PARACHIN, N. S. Lovastatin Production: From Molecular Basis to Industrial Process Optimization. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 648–665, 2015.

MUNIZ, M. A. P.; FERREIRA DOS SANTOS, M. N.; COSTA, C. E.; MORAIS, L.; LAMARÃO, M. L.; COSTA, R. M. R.; SILVA-JÚNIOR, J. O. Physicochemical Characterization, Fatty Acid Composition and Thermal Analysis of *Bertholletia excelsa* HBK Oil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 147–151, 2015.

OLIVEIRA, M. D. M.; BEZERRA, L. L.; DANTAS, C. V. S.; VOIGT, E. L.; MAIA, J. M.; MACÊDO, C. E. C. The Role of Xylopodium in Na<sup>+</sup> Exclusion and Osmolyte Accumulation in Faveleira [*Cnidoscolus phyllacanthus* (d. arg.) Pax et K. Hoffm] Under Salt Stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 11, p. 2871–2882, 2014.

PAPAGIANNI, M. An Evaluation of the Proteolytic and Lipolytic Potential of *Penicillium* spp. Isolated from Traditional Greek Sausages in Submerged Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 767–775, 2014.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F.; BRUNO, L. M. Comparative Performance of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Polysiloxane Polyvinyl Alcohol Hybrid Support Using Different Methodologies. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, p. 35–40, 2008.

PEREIRA, V. L. A.; ALVES, F. A. L.; SILVA, V. M.; OLIVEIRA, J. C. V. Nutritive Value and Voluntary Intake of Faveleira Hay Supply to Sheep in the Semiarid Pernambuco State Brazil. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 96–101, 2012.

RAMESH, S.; KUMAR, R.; DEVI, R. A.; BALAKRISHNAN, K. Isolation of a Lipase Producing Bacteria for Enzyme Synthesis in Shake Flask Cultivation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 712–719, 2014.

RAMOS, E. Z.; JÚNIOR, R. H. M.; CASTRO, P. F.; TARDIOLI, P. W.; MENDES, A. A.; LAFUENTE, R. F.; HIRATA, D. B. Production and Immobilization of *Geotrichum candidum* Lipase Via Physical Adsorption on Eco-Friendly Support: Characterization of the Catalytic Properties in Hydrolysis and Esterification Reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43–51, 2015.

SANTOS, J. C. O.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G.; PRASAD, S.; SANTOS, A. V. Thermal Stability and Kinetic Study on Thermal Decomposition of Commercial Edible Oils by Thermogravimetry. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 4, p. 1393–1398, 2002.

SHIMAMOTO, G. G.; FAVARO, M. M. A.; TUBINO, M. Simple Methods via Mid-IR or <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy for the Determination of the Iodine Value of Vegetable Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 7, p. 1431–1437, 2015.

SILVA, W. O. B.; SANTI, L.; BERGER, M.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES, J. A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Characterization of a Spore Surface Lipase from the Biocontrol Agent *Metarhizium Anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. 829–834, 2009.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SOUZA, A. G.; DANTA, H. J.; SILVA, M. C. D.; SANTOS, I. M. G.; FERNANDES, V. J.; SINFRÔNIO, F. S. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; NOVÁK, C. Thermal and Kinetic Evaluation of Cotton Oil Biodiesel. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 90, n. 3, p. 945–949, 2007.

SU, F.; LI, G. L.; FAN, Y. L.; YAN, Y. J. Enhancing Biodiesel Production Via a Synergic Effect Between Immobilized *Rhizopus oryzae* Lipase and Novozym 435. **Fuel Processing Technology**, v. 137, p. 298–304, 2014.

TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of Culture Conditions and Properties of Lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1495–1502, 2004.

UNLU, A.; TANRISEVEN, A.; SEZEN, I. Y.; ÇELİK, A. A New Lipase as a Pharmaceutical Target for Battling Infections Caused by *Staphylococcus aureus*: Gene Cloning and Biochemical Characterization. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 642–651, 2015.

YAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, D. Enhanced Catalysis of *Yarrowia lipolytica* Lipase LIP2 Immobilized on Macroporous Resin and its Application in Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 179–187, 2013.