

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DENISE SANDE SANTOS

**POTENCIAL DE USO BIOTECNOLÓGICO DE LIPASE DE *Colletotrichum*
gloeosporioides E ANTIOXIDANTES DE *Morus alba***

**Belo Horizonte
2015**

DENISE SANDE SANTOS

**POTENCIAL DE USO BIOTECNOLÓGICO DE LIPASE DE *Colletotrichum
gloeosporioides* E ANTIOXIDANTES DE *Morus alba***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutora em
Ciência de Alimentos

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Prof. Dra. Jacqueline A. Takahashi

Co-orientador: Prof. Dr. Gecernir Colen

Colaborador: Prof. Dr. Marcelo M. Santoro (*in memoriam*)

**Belo Horizonte
2015**

Dedico este trabalho a
Kindo,
Mainha, Dam e Painho
pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Gilberto Gil diz em sua música “Aquele Abraço” que o caminho pelo mundo somos nós mesmos quem traçamos e lembra, em seguida, que para tanto, recebemos o apoio e as ferramentas necessárias! Agradeço e mando “aquele abraço” a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos, órgão que financiou o intercâmbio acadêmico durante o doutorado sanduíche. O trabalho contou também com o financiamento da FAPEMIG e do CNPQ, aos quais eu gostaria de registrar o meu agradecimento.

Agradeço também aos professores do Departamento de Alimentos pelo acolhimento na UFMG, aos meus professores orientadores, à Jacqueline Takahashi “Jac” pelo carinho e dedicação, ao Gecernir Colen por todo o suporte, sabedoria e “causos”, ao memorável Marcelo Santoro a quem eu admirava desde os tempos da graduação, à Maykelis Solares e à Estación Experimental de Pastos e Forrajes Indio Hatuey pelo acolhimento e parceria em Cuba e à professora Inayara Lacerda pela parceria e, sobretudo, incentivo de sempre. Agradeço também a todos os técnicos-orientadores de todos os departamentos que eu passei e sem os quais eu teria perdido muito tempo em protocolos tortos, a Vanny, o Jamil, a Ana e a Elaine Cris. Agradeço a todos os colegas-orientadores que as vezes sabiam muito sobre o meu tema e a aqueles que não sabiam muito sobre o tema mas ajudavam de tantas outras maneiras. Agradeço aos inúmeros amigos cientistas que fiz nesta jornada que certamente ajudaram a direcionar os rumos da minha pesquisa. Agradeço aos meus queridos familiares baianos e mineiros que pacientemente entenderam as minhas ausências nestes quatro anos e que ajudaram nas revisões da minha tese, em especial a Dulcinea, Lili e tia Lindy.

Em especial, agradeço a Deus pela força e coragem, à Maria de Lourdes Sande (minha mainha) pelo exemplo de sabedoria, a Danilo Sande (irmão acadêmico com que compartilho o prazer por pesquisar e lecionar) pelo apoio incondicional, a Iuri Oliveira Carvalho (meu *personal career*, tradutor, dicionário de sinônimos, revisor de referências, o meu amor e o meu Kindo há 10 anos...) pelo amor e compreensão.

A todos que me deram “régua e compasso”, aquele abraço!

“Senhores, escrever é sinônimo de liberdade
exteriorizar a alma,
alegria, tristeza, angústia ou maldade,
que a vida em sua longevidade nos crava.
Sem isso, senhores, de nada vale a palavra.”

RESUMO

Este trabalho visou o estudo do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e da planta *Morus alba* quanto ao seu potencial biotecnológico. Para isto, foram realizadas a produção, purificação parcial, caracterização e teste de aplicação da lipase de *C. gloeosporioides* bem como avaliação da capacidade antioxidante de raízes de 12 variedades de *Morus alba*. A atividade lipásica máxima ($0,742 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) do preparado enzimático contendo lipase foi obtida após fermentação de *C. gloeosporioides* em substrato líquido por 48 h. A proteína lipolítica no preparado enzimático apresentou massa molecular de aproximadamente 18 kDa, mostrou-se estável em pH 5- 8, retendo 40 % de sua atividade em pH 9 e cerca de 30 e 25 % em pH 10 e 11, com pH 10 sendo seu ótimo de reação. Apresentou ainda estabilidade de 5 h na temperatura ótima ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), estabilidade frente a alguns sais (NH_4^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Sn^{+2}) e solventes (metanol, etanol, isopropanol, butan-1-ol, acetonitrila, heptano e hexano) em diferentes concentrações. A lipase apresentou atividade de esterificação (70 % de rendimento na formação de butirato de butila) e transesterificação (rendendo $5,4\cdot 10^{-3} \text{ U/kg}\cdot\text{min}$ com a reação entre propanol e *p*-nitrofenilpalmitato). A enzima foi capaz de gerar concentrados de ácidos graxos livres e na forma de acilglicerois a partir de todas as matérias primas testadas, com maiores graus de hidrólise sobre óleo de oliva (18,0 U), soja (17,8 U) e canola (15,9 U). Uma sequência de ultrafiltração com corte de 10 kDa, filtração em gel e cromatografia de afinidade com benzamidina possibilitou a obtenção de sete frações parcialmente purificadas. A fração 1, proveniente da filtração em gel seguida da cromatografia de afinidade alcançou a melhor combinação rendimento/fator de purificação, com recuperação de 27,15 % da atividade lipolítica, fator de purificação alto (20,51) e temperatura ótima em torno de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. As características físico-químicas e catalíticas da enzima demonstraram sua aplicabilidade na indústria alimentícia, na produção de ácidos graxos e ésteres aromáticos empregados como *flavor*, bem como na indústria de detergente. Para a avaliação do potencial biotecnológico de *M. alba*, extratos aquosos, etanólicos e hexânicos de 12 variedades naturais e híbridas de raízes de *M. alba* foram utilizados. Verificaram-se diferenças entre as variedades como o conteúdo fenólico entre extratos hexânicos (0,55 – 1,59), aquoso (2,72 – 6,61) e etanólicos (5,09 – 9,84 g de ácido gálico /100 g de extrato). A ação antioxidante de *M. alba* foi comprovada por diferentes ensaios, como 47 % de atividade antioxidante (poder redutor férrico) comparado com o padrão de ácido ascórbico. A capacidade de sequestro de radicais livres também foi observada em extratos de *M. alba*. O etanol foi muito eficiente na extração de compostos fenólicos e flavonoides e os extratos etanólicos apresentaram as maiores

atividades antioxidantes. Na variedade IZ 64 detectaram-se alto conteúdo fenólico e de flavonoides, bem como melhor capacidade de captura de radicais livres e redução do ferro. Essa variedade foi a melhor para exploração econômica e uso como antioxidante na preservação de alimentos ou na formulação de nutracêuticos. Esse trabalho permitiu verificar o potencial de uso de lipase de *C. gloeosporioides* na hidrólise de diferentes óleos para produção de concentrados de ácidos graxos bem como na produção de butirato de butila, aromatizante da indústria de alimentos com aroma de abacaxi. Além disso, foi observado o potencial antioxidante das raízes de *M. alba* com a variedade IZ 64 demonstrando maior potencial para exploração econômica.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, lipase, esterificação, hidrólise, *Morus alba*, antioxidante, alimentos funcionais.

ABSTRACT

This work aimed to study biotechnological potential of the fungal species *Colletotrichum gloeosporioides* and the plant *Morus alba*. Production, partial purification, characterization and application tests for *Colletotrichum gloeosporioides* lipase as well as evaluation of the difference in antioxidant capacity in 12 varieties of *Morus alba* roots were screened. Maximum activity ($0.742 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) of the preparation containing lipase was obtained after fermentation of *C. gloeosporioides* in liquid substrate for 48 h. The lipolytic protein presented molecular mass of approximately 18 kDa, was stable at pH 5-8, holding 40% of its activity at pH 9 and about 30 and 25% at pH 10 and 11, with pH 10 being optimum pH. The enzyme was stable for five hours on optimum temperature ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), stable in salts solutions (NH_4^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Sn^{+2}) and solvents (methanol, ethanol, isopropyl alcohol, butyl alcohol, acetonitrile, heptane e hexane) in different concentrations. The lipase presented esterification activity (70 % yield in the formation of butyl butyrate) and transesterification (yielding $5.4\cdot 10^{-3} \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ with the reaction between isopropyl alcohol and *p*-nitrophenylpalmitate). The enzyme generated free fatty acids and glycerides concentrates from all raw materials tested, with greater degrees of hydrolysis on olive oil (18.0 U), soybeans (17.8 U) and canola (15.9 U). A sequence of ultrafiltration with 10 kDa, gel filtration, and affinity chromatography with benzamidine allowed obtaining fractions partially purified. Fraction "1", obtained from affinity chromatography, reached the best combination of activity recovery (%)/purification factor (27.15/20.51) and optimum temperature around $40 \text{ }^\circ\text{C}$. The physico-chemical and catalytic characteristics demonstrated applicability of this enzyme in the food industry, in the production of essential fatty acids and aromatic esters employed as flavor, as well as in detergent industry. To evaluate the biotechnological potential of *M. alba*, aqueous, ethanol and hexane extracts of 12 natural and hybrid varieties of *M. alba* roots were used. Differences between the varieties were observed, such as the phenolic content of the hexane (0.55-1.59), aqueous (2.72-6.61) and ethanol extracts (5.09 – 9.84 g of Gallic acid/100 g of extract). The antioxidant action of *M. alba* was proven by different tests, finding, for instance, 47 % of iron reduction compared to ascorbic acid. The ability of free radicals sequestration was also observed in extracts of *M. alba*. Ethanol was very efficient in extracting phenolic compounds and flavonoids, then ethanol extracts demonstrated the greatest antioxidant activities. The variety IZ 64 showed high phenolic content and flavonoids, as well as better ability to capture free radicals and iron reduction, showing to be the best variety for economic exploitation and use as antioxidants for food

preservation or as a nutraceutical. This work has shown the potential use of lipase from *C. gloeosporioides* on hydrolysis of different oils for the production of fatty acids as well as in the production of butyl butyrate, flavouring the food industry with flavor of pineapple. In addition, it was observed the antioxidant potential of the roots of *M. alba* with IZ 64 demonstrating great potential for economic exploitation.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, lipase, esterification, hydrolysis, *Morus alba*, antioxidant, functional food.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Reação de transesterificação com metanol, etanol e hidrólise catalisadas por lipase	11
Figura 2 - Lista de reações catalisadas por lipases	Erro! Indicador não definido.
Figura 3 - Mecanismo de estabilização do radical DPPH.....	36
Figura 4 Mecanismo de estabilização do radical ABTS.	Erro! Indicador não definido.
Figura 5 - Monitoramento do crescimento do fungo por fermentação submersa e da produção enzimática.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 6 - Foto do gel do zimograma comparada com a foto do gel do SDS-PAGE do preparado enzimático contendo a enzima lipolítica produzida por <i>C. gloeosporioides</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 7 - Atividade residual do preparado enzimático de <i>C. gloeosporioides</i> armazenados em diferentes temperaturas	Erro! Indicador não definido.
Figura 8 - Efeito da temperatura na estabilidade do preparado enzimático de <i>C. gloeosporioides</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 9 - Determinação do valor ótimo de temperatura da lipase de <i>C. gloeosporioides</i> no preparado enzimático	Erro! Indicador não definido.
Figura 10 - Efeito da temperatura na estabilidade da lipase de <i>C. gloeosporioides</i> no preparado enzimático por 24 h, a 37 °C.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 11 - efeito do pH na estabilidade da lipase de <i>C. gloeosporioides</i> no preparado enzimático	Erro! Indicador não definido.
Figura 12 - Determinação do valor ótimo de pH da lipase de <i>C. gloeosporioides</i> no preparado enzimático	Erro! Indicador não definido.
Figura 13 - Avaliação da estabilidade do preparado enzimático de <i>C. gloeosporioides</i> frente a diferentes íons.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 14 Cromatografia em coluna resource Q em equipamento FPLC ..	Erro! Indicador não definido.
Figura 15 Cromatografia em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC ...	Erro! Indicador não definido.
Figura 16 Cromatografia em coluna de benzamidina em equipamento FPLC	63
Figura 17 - Etapas da purificação parcial da lipase por SDS-PAGE com coloração de prata .	64
Figura 18 - Caracterização do valor ótimo de pH das frações parcialmente purificadas (1, 2, 11-15) da lipase de <i>C. gloeosporioides</i>	65
Figura 19 - Caracterização do valor ótimo de temperatura das frações parcialmente purificadas da lipase de <i>C. gloeosporioides</i>	65
Figura 20 Perfil de ácidos graxos do óleo de soja obtidos após hidrólise química (a) e enzimática (b) com lipase de <i>C. gloeosporioides</i>	68
Figura 21 - Concentração de C18:1 (ômega 9, ácido oleico) gerada por hidrólise química e enzimática usando lipase de <i>C. gloeosporioides</i> , em diferentes óleos	71
Figura 22 - Análise da concentração de C18:2 (ômega 6, ácido linoleico) gerada por hidrólise química e enzimática usando lipase de <i>C. gloeosporioides</i> , em diferentes óleos	71
Figura 23 - Atividade de transesterificação da lipase de <i>C. gloeosporioides</i> com álcoois	72
Figura 24 - Atividade de esterificação lipase de <i>C. gloeosporioides</i>	73
Figura 25 - Atividade antioxidante total dos extratos das raízes de <i>M. alba</i> obtidos em diferentes solventes	91
Figura 26- Inibição do radical ABTS demonstrada pelos extratos etanólicos de raízes de <i>M. alba</i>	93

Figura 27 - Concentração de fenois totais dos extratos das variedades de <i>M. alba</i> obtidos em diferentes solventes.....	
Figura 28 - Conteúdo de flavonoides totais de raízes de <i>M. alba</i> obtidos em diferentes solventes.....	04
Figura 29 - Correlação entre fenois totais e I ₅₀ ABTS e poder redutor férrico dos extratos etanólicos de variedades de <i>M. alba</i>	05

LISTA DE ABREVIACOES

*p*NPP *para*-nitrofenil palmitato
*p*NP *para*-nitrofenol
FSL Fermentaco em substrato líquido
DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfnico)
sn Numerao estereoespecífica (do inglês stereospecific numbering)
t.a⁻¹ Toneladas por ano
U.g⁻¹ Unidades de atividade enzimática por grama
µg.L⁻¹ Micrograma por litro
BHT Butil-hidroxi-tolueno
BHA Butil-hidroxi-anisol
TBHQ Terc-butil-hidroquinina
GP Propil galato
FSL Fermentaco em substrato líquido
SOD Superxido dismutase
CAT catalase
GPx Glutaciona peroxidase
GSH Glutaciona reduzida
Aw Atividade de gua

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da estabilidade do preparado enzimático de <i>C. gloeosporioides</i> frente a diferentes solventes.....	59
Tabela 2 - Comparação entre a ultrafiltração e a precipitação com sulfato de amônio	61
Tabela 3 - Eficiência da purificação parcial da lipase	63
Tabela 4 - Atividade hidrolítica de lipase de <i>C. gloeosporioides</i> sobre diferentes substratos lipídicos.....	66
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos dos substratos lipídicos obtidos após hidrólise química (Q) ou enzimática (E) com lipase de <i>C. gloeosporioides</i>	69
Tabela 6 - Poder redutor férrico de raízes de variedades de <i>M. alba</i> obtidos em diferentes solventes.....	91
Tabela 7 - Atividade de captura de radicais livres (ABTS/DPPH) de extratos das variedades de <i>M. alba</i> obtidos em diferentes solventes	92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	21
2.2 Enzimas	21
2.3 Lipases	23
2.3.1 Fatores que influenciam a produção e atividade de lipases microbianas	23
2.3.2 Caracterizações de lipases	25
2.3.3 Aplicações de lipases	28
2.3.3.1 Aplicações de lipases em indústria alimentícia	29
2.3.3.2 Aplicações farmacêuticas	31
2.4 <i>Morus alba</i> : características gerais	32
2.5 Composição química da amoreira e suas aplicações	33
2.6 Alimentos funcionais	34
2.7 A oxidação e suas consequências biológicas em tecidos vivos e em alimentos	35
2.8 Atividade antioxidante	37
3. OBJETIVO	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
CAPÍTULO I PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÕES DE LIPASE PRODUZIDA POR <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES</i>	40
4. INTRODUÇÃO	40
5. METODOLOGIA	43
5.1 Produção de lipase por <i>C. gloeosporioides</i> em fermentação por substrato líquido	44
5.1.1 Manutenção da cepa de estudo	44
5.1.2 Pré-inóculo	44
5.1.3 Produção da enzima	45
5.1.4 Determinação de pH	45

5.1.5	Determinação de biomassa (peso seco)	45
5.1.6	Determinação de proteínas totais	45
5.1.7	Determinação de atividade enzimática	46
5.1.8	Obtenção do preparado enzimático.....	46
5.2	Caracterização do preparado enzimático	46
5.2.1	Estimativa da massa molecular	46
5.2.2	Estabilidade da enzima ao longo do tempo.....	47
5.2.3	Estabilidade enzimática	47
5.2.4	Temperatura e pH ótimos de reação usando o preparado enzimático.....	48
5.3	Purificação.....	48
5.3.1	Purificação de baixa resolução	48
5.3.2	Purificação de alta resolução	48
5.3.3	Monitoramento da purificação	49
5.4	Caracterização.....	49
5.4.1	Determinação do pH e temperatura ótimas da lipase nas frações parcialmente purificadas	49
5.5	Aplicações da lipase produzida por <i>C. gloeosporioides</i>	49
5.5.1	Atividade hidrolítica de lipase produzida por <i>C. gloeosporioides</i>	49
5.5.1.1	Hidrólise enzimática dos óleos	50
5.5.1.2	Hidrólise química dos óleos	50
5.5.1.3	Preparação das amostras para cromatografia.....	50
5.5.1.3.1	Extração dos ácidos graxos	51
5.5.1.3.2	Metilação dos ácidos graxos	51
5.5.1.4	Análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia a gás	51
5.5.2	Atividade de transesterificação de lipase produzida por <i>C. gloeosporioides</i>	51
5.5.3	Atividade de esterificação de lipase produzida por <i>C. gloeosporioides</i>	52
6	RESULTADOS	53
6.1	Produção de lipase por <i>C. gloeosporioides</i> em FSL.....	53
6.2	Caracterização da enzima	53
6.2.1	Estimativa da massa molecular	54

6.2.2	Estabilidade da enzima por dois meses.....	54
6.2.3	Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima.....	55
6.2.4	Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da enzima	57
6.2.5	Estabilidade em solventes	58
6.2.6	Estabilidade em íons e EDTA	59
6.3	Purificação parcial da lipase produzida.....	60
6.3.1	Purificação de baixa resolução	60
6.3.2	Purificação de alta resolução	61
6.3.3	Caracterização das frações parcialmente purificadas.....	65
6.4	Aplicações da lipase produzida por <i>C. gloeosporioides</i>	66
6.4.1	Atividade hidrolítica de lipase produzida por <i>C. gloeosporioides</i>	66
6.4.2	Atividade de transesterificação.....	72
6.4.3	Atividade de esterificação	72
7.	DISCUSSÃO	73
8.	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
	CAPÍTULO II CONTEÚDO DE FENOIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE MORUS ALBA	86
9.	INTRODUÇÃO	86
10.	METODOLOGIA	87
10.1	Materiais	87
10.2	Obtenção das plantas e extratos	88
10.3	Atividade antioxidante total (método do fosfomolibdênio)	88
10.4	Poder redutor férrico (método do ferrocianeto).....	88
10.5	Capacidade antioxidante de sequestro de radicais ABTS e DPPH	89
10.6	Fenois totais	89
10.7	Flavonoides totais.....	89
10.8	Análise estatística.....	90
11.	RESULTADOS	90
12.	DISCUSSÃO	96
13.	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	99
14.	CONCLUSÕES GERAIS DA TESE	102
	REFERÊNCIAS DA TESE	103

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade, fonte de recursos naturais (vegetais, microbianas e animais) terrestres, vem sendo explorada desde os primórdios da humanidade para alimentação (caça, pesca, extrativismo), medicação, construção de abrigos e roupas (GARCIA, 1995). Nos últimos anos, a biotecnologia tem se apresentado como uma das vertentes que possibilitam o uso sustentável da biodiversidade pela espécie humana (SHENBERG, 2010). As fontes naturais são exploradas biotecnologicamente de distintas maneiras e um levantamento de seu potencial como na produção de enzimas e de componentes químicos com atividade antioxidante faz-se imprescindível para seu emprego nas diferentes vertentes da indústria biotecnológica.

O grande interesse industrial na produção de enzimas, catalisadores biológicos, advém do fato de derivarem de fontes renováveis, serem biodegradáveis, gerarem poucos resíduos, funcionarem em condições relativamente brandas de temperatura e pH e oferecerem boa seletividade sobre substratos e sobre a estereoquímica dos produtos obtidos (HOUDE *et al.*, 2004, PAQUES e MACEDO 2006; GOSWAMI *et al.*, 2013).

As enzimas podem metabolizar uma grande variedade de fontes de carbono, facilitando a sobrevivência microbiana até nos ambientes mais inóspitos (ABRANCHES *et al.*, 1997). Enzimas microbianas são muito competitivas porque podem ser produzidas com rapidez em processos que podem ser escalonados para produção industrial (NAGARAJAN, 2012).

Dentre as enzimas produzidas industrialmente, as lipases têm recebido muito interesse na última década pela diversidade de reações que catalisam. São muito flexíveis e capazes de agir na hidrólise de triglicerídeos a ácidos graxos livres e glicerol, na esterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (em meio não aquoso) (DAIHA *et al.*, 2015). Sua função natural é atuar na ciclagem de lipídeos e, portanto, agem sobre vários substratos, como óleos naturais, triglicerídeos sintéticos e ésteres de ácidos graxos (HOUDE *et al.*, 2004; ARAVIDAN *et al.*, 2007; TORRES-SALAS *et al.*, 2014).

Devido a esta diversidade de ações catalíticas, as lipases possuem várias aplicações na indústria, tais como, na modificação de lipídeos consumidos como alimentos (AKIMOTO *et*

al.,1999; GOSWAMI *et al.*, 2013), síntese de intensificadores de sabor ou flavorizantes (PANDEY *et al.*,1999; SILVA *et al.*, 2014), oleoquímica (SAXENA *et al.*, 1999), produção de detergentes (BRIZZIO *et al.*, 2007; SU *et al.*, 2015), de couro (PANDEY *et al.*,1999), de papel (KIRK *et al.*, 2002), agroquímica (SAXENA *et al.*, 1999), cosmética com a síntese de substituintes da manteiga de cacau (JAEGER *et al.*, 1999), remoção de lipídeos (SALIHU *et al.*, 2012), processamento farmacêutico com a resolução de fármacos quirais (KIM *et al.*, 2007), além de aplicações em testes diagnósticos para detecção de triglicerídeos no soro (GURUNG *et al.*, 2013) e em biosensores (PANDEY *et al.*,1999) .

A ação de lipases em triglicerídeos permite a obtenção de lipídeos estruturados com melhor qualidade nutricional (HOUDE *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006).

A lipólise de gorduras em carnes magras, como peixe, por lipases, reduz o teor de gorduras presentes nesses insumos. Quando se utilizam resíduos de peixe como substrato para a ação de lipase pode-se produzir farinha para a nutrição de gados e o cultivo de peixes para consumo humano (YANO *et al.*, 2008).

A produção de biodiesel a partir de reações de transesterificação de triglicerídeos de óleos vegetais na presença de álcool também tem sido uma aplicação muito valorizada das lipases (JAIN e MISHRA, 2015).

Quanto às aplicações na indústria farmacêutica, a resolução de misturas racêmicas por lipases é muito bem explorada. Pode-se citar, como exemplo, a obtenção do isômero *S*-Ibuprofeno, a partir da mistura racêmica, o qual é 160 vezes mais potente do que o isômero *R* (HOUDE *et al.*, 2004, LEE *et al.*, 2008). Pode-se ainda citar, a conversão de epoxiesteres na formação de um intermediário essencial para a síntese do Diltiazem. Esse vasodilatador coronariano, também bloqueador de canal de cálcio, movimentou U\$ 273 milhões em 2002, quando a introdução de lipases em sua síntese aumentou o rendimento de sua produção (MEIER *et al.*, 2007).

Uma limitação do uso de lipases na indústria é o custo de produção, determinado pelas condições experimentais e pela estabilidade final das enzimas. Por isso, é interessante desenvolver estratégias para alavancar a produtividade dessas enzimas a partir de novos micro-organismos, sendo interessante otimizar o processo produtivo por meio da manipulação das principais variáveis que afetam o rendimento da lipase obtida (SILVA *et al.*, 2011).

Lipases fúngicas têm mostrado especificidade por diversos substratos utilizados como fonte de carbono para os micro-organismos produtores (TAN *et al.*, 2003). Fungos filamentosos são naturalmente bons secretores de enzima devido ao seu papel ecológico de decompositores de matéria orgânica. Além do uso direto de fungos para produção enzimática

via fermentação, alguns estudos têm enfatizado sua funcionalidade como hospedeiros para a superexpressão heteróloga de enzimas (CORREA *et al.*, 2013).

Os fatores que afetam a produção de lipases por fungos incluem as fontes de carbono e nitrogênio, nível de oxigênio dissolvido, atividade de água e temperatura utilizados para o crescimento dos fungos (FICKERS *et al.*, 2004; ALONSO *et al.*, 2005). O pH do meio de reação e a concentração de substrato por área de superfície micelar também devem ser observados para gerar um meio de cultivo mais adequado para se alcançar a condição ótima de produção (KAR *et al.*, 2008; KEMPKA *et al.*, 2008).

A caracterização das lipases permite compreender a estrutura proteica pela revelação dos domínios superficiais e da sequência e interação de resíduos de aminoácidos. O conhecimento da estrutura tridimensional e das condições de produção e reação otimizadas permite projetar formas mais eficientes, ecologicamente corretas e mais rentáveis de produção de lipases em escala industrial (CHI *et al.*, 2009).

A disponibilidade de lipases com características apropriadas para aplicações específicas é outro fator limitante para a exploração biotecnológica dessas enzimas. Assim, faz-se imprescindível a procura de novas lipases que atendam à demanda industrial para determinados processos fermentativos, bem como é necessário melhorar a produção e dispor de lipases mais ativas.

O potencial de exploração biotecnológico das plantas também é muito vasto. Por exemplo, a amoreira, *Morus alba*, é uma planta cosmopolita que pertence à família Moraceae e tem todas as partes da sua planta (raiz, folhas, frutos e tronco) usadas na medicina alternativa (KIM *et al.*, 2014). O extrato do tronco possui atividade antioxidante (NAM *et al.*, 2012) e anti-inflamatória (RIVIERE *et al.*, 2014); o extrato das folhas tem efeito vasodilatador, (KURNIATI *et al.*, 2014) e antiglicemiante (JESZKA-SKOWRON *et al.*, 2014); o extrato de galhos possui atividade antitirozinase (CHANG *et al.*, 2011), frutas tem atividade antioxidante (DONNO *et al.*, 2015) e o extrato da casca da raiz possui propriedades hipocolesterolêmica e antioxidante (EL-BESHBISHY *et al.*, 2006).

Flavonoides, antocianinas e polifenóis são recorrentes na composição de *M. alba* e esses fitocomponentes levam à indicação dessa espécie como tônus para a longevidade (KIM *et al.*, 2014).

Substâncias como vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), polifenóis e flavonoides são antioxidantes naturais encontrados em plantas que podem ser aplicados na indústria de alimentos enquanto substitutos naturais dos antioxidantes sintéticos (NAM *et al.*, 2012).

A concentração de metabólitos antioxidantes em plantas pode ser influenciada por diferentes características genéticas e agronômicas (DONNO *et al.*, 2015). Desta forma, neste trabalho avaliou-se o potencial biotecnológico de duas fontes naturais: *C. gloeosporioides* para a produção de lipase e raízes de *M. alba* como fonte de extratos com atividade antioxidante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

O fungo filamentoso *C. gloeosporioides* é um importante fitopatógeno causador da antracnose em diferentes frutas tropicais brasileiras como manga, abacate, acerola, mamão, caju e maracujá (SERRA *et al.*, 2011). Atualmente sabe-se que o complexo *Colletotrichum* conta com 22 espécies e uma subespécie e sua identificação por análises multigênicas tem sido estimulada em função da importância de algumas dessas espécies para a biossegurança, especialmente por sua fitopatogenicidade (WEIR *et al.*, 2012).

A caracterização desta espécie (LUBBE *et al.*, 2004; WEIR *et al.*, 2012), o processo de infecção e patogênese (AFANADOR-KAFURI *et al.*, 2003; RAMPERSAD, 2013; SHNAIDERMAN *et al.*, 2013), e a busca por antifúngicos que atuem contra o *C. gloeosporioides*, visando desenvolver mecanismos para seu biocontrole têm sido descritos (WANG *et al.*, 2013).

Metabólitos de *C. gloeosporioides* têm sido avaliados quanto ao seu potencial biotecnológico. Chapla *et al.* (2014) purificaram oito substâncias produzidas por este fungo com atividade antifúngica e anticolinesterase. Zhang *et al.* (2015) descreveram uma linhagem de *C. gloeosporioides* endofítica de *Huperzia serrata*, produtora do alcaloide huperzina, um agente anticolinesterásico útil no tratamento de Alzheimer.

Enzimas descritas na literatura associadas à patogenicidade deste fungo podem apresentar interesse industrial. Souza *et al.* (2003) demonstraram a síntese de quitinase por *C. gloeosporioides*, a qual pode ser usada para o controle do próprio patógeno. Outras enzimas secretadas por *Colletotrichum* descritas na literatura são: pectatoliase (DRORI *et al.*, 2003; KRAMER-HAIMOVICH *et al.*, 2006), proteinases (DUNAEVSKY *et al.*, 2007), cutinase (CHEN *et al.*, 2007; WAN SEMAN *et al.*, 2014), lipase (COLEN *et al.*, 2006; BALAJI e EBENEZER, 2008; FARIA, 2010; ABRIL, 2012) celulase, amilase, protease e esterase (VENKATESAGOWDA *et al.*, 2012). A aplicação das enzimas de *C. gloeosporioides* permanece ainda como um campo aberto para exploração.

2.2 Enzimas

Enzimas são proteínas com a função específica de acelerar reações químicas. Catalisam a conversão de substratos a produtos de forma bastante específica (ADRIO e DEMAIN, 2014).

O metabolismo é o conjunto de reações envolvidas com o balanço energético dos seres vivos, a partir do qual a energia necessária para a realização das funções vitais, bem como para formação das estruturas e regulação fisiológica, é obtida. O metabolismo é composto por milhares de reações químicas, nas quais as enzimas participam ativamente (GURUNG *et al.*, 2013).

Enzimas secretadas espontaneamente por micro-organismos ou presente em preparação de rúmen de bezerros (coagulantes do leite) têm sido aplicadas na produção de alimentos há milhares de anos, ainda que sem o conhecimento sobre a existência das mesmas (KIRK *et al.*, 2002). Ainda hoje essas enzimas são aplicadas em diferentes setores da indústria de alimentos como na produção de queijo (renina), cerveja, vinho (enzimas da fermentação alcoólica) e vinagre (enzimas da fermentação acética) (ADRIO e DEMAIN, 2014).

Segundo Cherry e Fidantsef (2003), a substituição da ação química pela atuação biológica tem se mostrado marcante em alguns setores como, por exemplo, na indústria de detergentes (troca do uso de fosfatos por proteases e celulases), na fabricação do pão (mudança de emulsificadores químicos por lipases) e na indústria têxtil (uso de amilases e pectinases em substituição do hidróxido de sódio).

As enzimas podem ser obtidas de fontes animais, vegetais ou microbianas (BARROS *et al.*, 2010). Tripsina e quimiotripsina (provenientes da mucosa do estômago de suínos; pancreatina (mistura de enzimas extraídas do pâncreas de suínos); renina ou coalho (extraído do quarto estômago de bezerros) e a catalase (extraída do fígado e sangue de animais), são exemplos de enzimas de fonte animal com interesse na indústria (GONÇALVES, 2007). Outros exemplos compreendem a papaína, protease extraída do látex do fruto verde do mamão (*Carica papaya*); bromelina, protease extraída do pedúnculo do abacaxi (*Ananas comosus*); ficina, protease extraída do látex da figueira (*Ficus carica*) e o malte, variedade de enzimas originárias da germinação de cereais (PAQUES E MACEDO, 2006).

Embora algumas enzimas animais como as pancreáticas tenham uso industrial, as enzimas microbianas sucederam àquelas provenientes de fontes animais por causa da pequena produção e dificuldade de coleta e extração das enzimas animais (HASAN *et al.*, 2006).

Segundo Kirk *et al.* (2002) avanços advindos da tecnologia do DNA recombinante, de melhoramentos no processo fermentativo e nos meios de cultivo de baixo custo, têm possibilitado a criação de enzimas modeladas, adaptadas aos processos industriais. Isso resulta na expansão de uma indústria diversificada em tamanho e complexidade.

2.3 Lipases

Lipases pertencem às classes das hidrolases e atuam sobre ligações éster de ésteres carboxílicos. Sua principal importância na natureza consiste na ciclagem de nutrientes insolúveis em água, os quais são decompostos por lipases, esterases e cutinases e representam uma grande parcela da matéria orgânica terrestre (HASAN *et al.*, 2006). Normalmente exibem boa quimio, regio e enantiosseletividade, além de possuírem vasta especificidade sobre substratos e atuarem em diversas temperaturas (JOSEPH *et al.*, 2008; GURUNG *et al.*, 2013).

Devido à gama de aplicações, o mercado para enzimas alcançou a cifra de U\$ 1,5 bilhões em 2000 (KIRK *et al.* 2002; HOUDE *et al.*, 2004) e não parou desde então. O aumento do interesse por enzimas lipolíticas, logo atrás das proteases e amilases, tem sido claramente refletido na literatura com cerca de 2620 publicações por ano (2010-2014), de acordo com consulta realizada no *Web of knowledge* em setembro de 2015. Isso representa um incentivo considerável para se continuar buscando enzimas lipolíticas com características especiais, haja vista que as lipases representam uma proeminente fatia desse mercado.

A maioria das lipases provenientes de micro-organismos descritas na literatura é gerada por fermentação submersa, embora a fermentação em substrato sólido represente uma alternativa interessante, principalmente quando se usam resíduos agroindustriais como meio de cultivo, gerando economia devido ao baixo custo desses subprodutos (ANDUALEMA e GESSESSE, 2012).

2.3.1 Fatores que influenciam a produção e atividade de lipases microbianas

O papel do oxigênio no metabolismo de lipídeos e no crescimento celular é bem conhecido, entretanto, a disponibilidade desse componente na produção de lipases tem relevância pouco conhecida. Estudos têm tentado desvendar essa influência e, de acordo com experimentos de Alonso *et al.* (2005), o aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio promove aumento da atividade enzimática, logo, há aumento de produtividade, até um

limite ótimo. Estes autores detectaram atividade enzimática máxima sob agitação ótima de 200 rpm em fermentadores de bancada de 2 L contendo 1,2 L de meio de cultivo de *Yarrowia lipolytica*. Agitação além desse valor (300 a 400 rpm) pode gerar estresse oxidativo, redução de contagem celular e, conseqüentemente, redução de atividade lipolítica.

Em escalas um pouco maiores (fermentadores de 20 L), a agitação também é um fator preponderante sobre a produtividade enzimática. Há áreas dentro do reator onde há baixa aeração que gera dispersão irregular de nutrientes e problemas na taxa de transferência de oxigênio dissolvido, levando à diminuição da concentração celular e baixa atividade enzimática (KAR *et al.*, 2008).

A umidade inicial dos substratos em torno de 55% (farinha de soja sob condições de fermentação semi-sólida) e temperatura de processo de 27,5 °C aumentaram o rendimento enzimático (40 U/g), em um trabalho usando metodologia de superfície de resposta (KEMPKA *et al.*, 2008).

Quanto à fonte de carbono, muitos micro-organismos crescem sobre vários hidrocarbonetos e a atividade lipolítica é estimulada em meios contendo ácidos graxos de cadeias longa, sendo pequena em meios contendo glicose e somente após a depleção desta no meio (FICKERS *et al.*, 2004).

Óleos vegetais podem ser usados como fonte de carbono suplementar em fermentações para obtenção de enzimas lipolíticas, uma vez que são constituídos basicamente por lipídeos (KEMPKA *et al.*, 2008). Alguns estudos têm mostrado a capacidade lipolítica de micro-organismos sobre diferentes substratos lipídicos como óleo de oliva, soja, gergelim, milho (COLEN *et al.*, 2006), coco, amendoim, nim (VENKATESAGOWDA *et al.*, 2012) óleo de palma, da semente de algodão, canola, sebo bovino e caprino (TAN *et al.*, 2003) e óleo de girassol (COELHO *et al.*, 2013).

Alguns resíduos agro-industriais, como glicerol, parafina, óleo cru (MAFAKHER *et al.*, 2010), águas residuais de fábrica de óleo de oliva e querosene (SILVA *et al.*, 2011) também têm sido estudados como fonte de carbono por serem geralmente abundantes e de baixo custo, implicando na redução do custo de produção de enzimas. A otimização da produção de lipases por *C. gloeosporioides* utilizando diferentes substratos oleicos demonstrou que as melhores produções enzimáticas ocorriam quando se utilizavam óleo de pondamia e coco, indicando o uso industrial desses materiais na produção de lipases (BALAJI e EBENEZER, 2008). Segundo Salihu *et al.* (2012) e Abdelmoez *et al.* (2013) a bioconversão de resíduos agroindustriais, para a produção de lipase e outros produtos será cada vez mais uma prioridade dentro da biotecnologia.

A concentração de nitrogênio influencia o crescimento celular e o rendimento das enzimas tanto em fermentação semi-sólida como em fermentação submersa (FICKERS *et al.*, 2004). Extrato de levedura, água de maceração de milho e melão de cana podem ser usados como suplemento de nitrogênio nos meios de cultivo (KEMPKA *et al.*, 2008).

O pH também influencia no crescimento e atividade lipolítica dos micro-organismos. A adição de ácidos ou bases nos sistemas de produção de enzimas, a fim de corrigir o pH do meio de cultivo deve ser efetuada ao longo da fermentação (KAR *et al.*, 2008).

A quantidade de óleo disponível na interface óleo-água, local de ação das enzimas lipolíticas, também é um aspecto determinante da atividade catalítica dessas proteínas. A área da interface óleo-água pode ser aumentada pelo uso de emulsificantes e por agitação (SAXENA *et al.*, 1999). Devido a esse comportamento peculiar das lipases de catálise interfacial, algumas enzimas lipolíticas parecem não seguir o comportamento Michaelis-Menten, como demonstrado por Moran *et al.* (1989).

Uma pequena de água disponível ($a_w = 0,11 - 0,43$) associada à alta concentração de substratos lipídicos, por exemplo, tem sido relatada na literatura como essencial para garantir alta atividade enzimática de transesterificação das lipases produzidas por micro-organismos (KAKI e ADLERCREUTZ, 2011).

Aumento da atividade lipásica em micro-organismos mesófilos, na presença de íons cálcio, tem sido descrito na literatura. Embora os mecanismos moleculares de ativação não sejam bem conhecidos, essa indução de aumento de produtividade, mediada pelos íons cálcio, parece estar associada à forma como o cálcio liga-se à estrutura da enzima, auxiliando na manutenção da sua estabilidade térmica em altas temperaturas (KIM *et al.*, 2000).

Lipases extracelulares de diferentes leveduras têm sido purificadas, caracterizadas e os genes têm sido clonados e superexpressados em *Candida*, *Geotrichum*, *Trichosporon* e *Y. lipolytica* (CHI *et al.*, 2009).

A exposição de células leveduriformes a agentes mutagênicos (como luz UV e mutagênicos químicos) para aumentar as taxas de mutação e criar organismos com alta produtividade também tem sido testados em processos fermentativos (DARVISHI *et al.*, 2011).

2.3.2 Caracterizações de lipases

Devido ao seu grande potencial biotecnológico, muitas enzimas têm sido frequentemente isoladas, identificadas, clonadas, caracterizadas e purificadas (ALONSO *et*

al., 2005; CORREA *et al.*, 2013), visto que preparações específicas são necessárias para cada tipo de aplicação (SAXENA *et al.*, 2003; GURUNG *et al.*, 2013).

Estudos sobre a caracterização de lipases microbianas têm ajudado a compreender características de regulação e ação catalítica dessas enzimas. Analisando diversos trabalhos com o emprego de lipases purificadas de *Staphylococcus aureus* e *S. hyicus*, Saxena *et al.* (1999) relataram as massas moleculares (34-46 kDa), pH ótimo (7,5 – 9,0), inibidores (EDTA) e estimuladores (Ca^{+2}) dessas enzimas. Chen *et al.* (2007), trabalhando *C. gloeosporioides* e *C. cahawae*, ambos fungos fitopatógenos, também conseguiram determinar as massas moleculares (21 e 41 kDa) das enzimas lipolíticas produzidas por esses microorganismos.

Fickers *et al.* (2011) publicaram uma revisão sobre aspectos de caracterização bioquímica de lipases provenientes de *Y. lipolytica* como temperatura e pH ótimos, bem como sua dependência específica ao substrato. Segundo os autores, a enzima pode permanecer estável e funcional em uma grande faixa de pH (3,5 a 9,0), entretanto, isso dependerá do substrato que será utilizado na reação.

A caracterização de uma lipase produzida por *Cryptococcus albidus* foi mostrada por Tiwari *et al.* (2011). Nesse trabalho, os autores encontraram o pH ótimo (6,5), o melhor óleo vegetal como substrato para a lipase (óleo de soja), a inibição da enzima frente a alguns solventes (β -mercaptoetanol), a ampliação de sua atividade frente a íons (Ba^+ , Ca^+ , Mg^{+2} e NH_4^+) e a sua estabilidade térmica a 50 °C. Essa caracterização permitiu observar diferentes aspectos da enzima, como sua notável termotolerância e sugerir que a melhor aplicação dessas enzimas seria na indústria de processamento de alimentos.

A caracterização de enzimas para conhecer seus diferentes aspectos e comportamentos moleculares, além de ser útil para definir o meio de reação a ser utilizado no reator e em aplicações desses catalisadores, permite indicar condutas mais apropriadas para sua purificação, facilitando também aplicações que demandem preparados enzimáticos mais purificados.

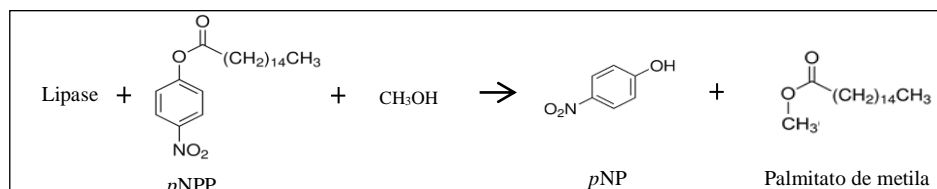
Uma estratégia para a determinação de parâmetros catalíticos das enzimas consiste em fazer otimização conjunta de fatores mediante o uso do planejamento fatorial e análise de superfície de resposta. Um exemplo interessante foi mostrado por Han *et al.* (2011) trabalhando com lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*. No trabalho foram otimizadas as condições de tempo (6,52 h), quantidade de enzima (10,34%) e a concentração dos substratos (1,77 de estearato de metila: 1,00 de tributirina) na temperatura de 65 °C da reação de

esterificação entre a tributirina com estearato de metila para a formação de um lipídeo estruturado (com a cadeia longa na posição 2).

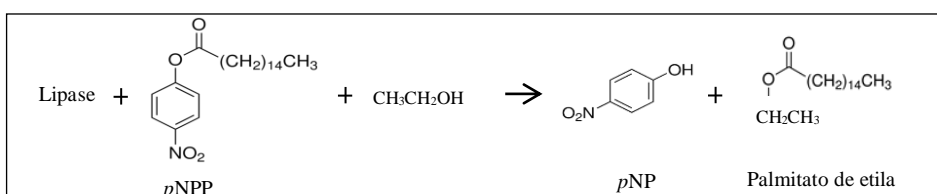
A metodologia de otimização conjunta considera a influência das variáveis em associação e isso reflete em condição mais real do que a avaliação de cada variável individualmente, uma vez que as variáveis podem ser interdependentes. Além disso, fornece uma faixa ótima ao invés de pontos ótimos das variáveis que influenciam na ação catalítica. As faixas ótimas são importantes na aplicação industrial, quando uma situação pontual de pH ou temperatura nem sempre é possível. Assim, uma faixa de condições traduz-se em maior viabilidade e facilidade de implantação de um processo industrial usando uma enzima específica (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

A metodologia, utilizada no presente trabalho, de dosagem do *p*NP pôde ser aplicada para a quantificação da reação de transesterificação porque o produto dosado é o mesmo liberado nas reações de hidrólise, como pode ser observado na Figura 1. O que vai diferenciar o tipo de reação é o meio reacional (orgânico ou aquoso) e a quantidade de água presente neste. Este experimento foi realizado com o preparado enzimático liofilizado, com o substrato dissolvido em solvente orgânico e o álcool foi adicionado à mistura para iniciar a reação, o meio reacional orgânico, com o mínimo teor de água possível. Nessas condições a enzima realiza atividade de esterificação e o *p*NP liberado representa uma dosagem indireta dessa reação química.

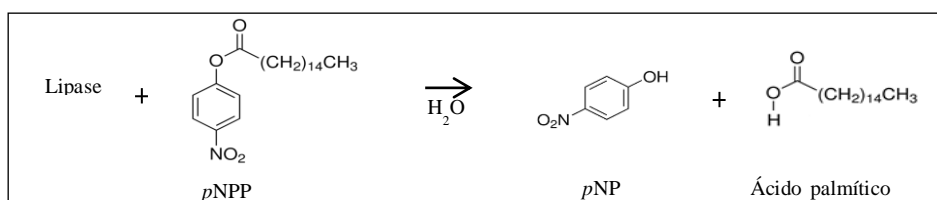
Reação de transesterificação entre o ácido palmítico e metanol



Reação de transesterificação entre o ácido palmítico e etanol



Reação de hidrólise do *para*-nitrofenil palmitato



*p*NPP – *para*-nitrofenil palmitato; *p*NP – *para*-nitrofenol.

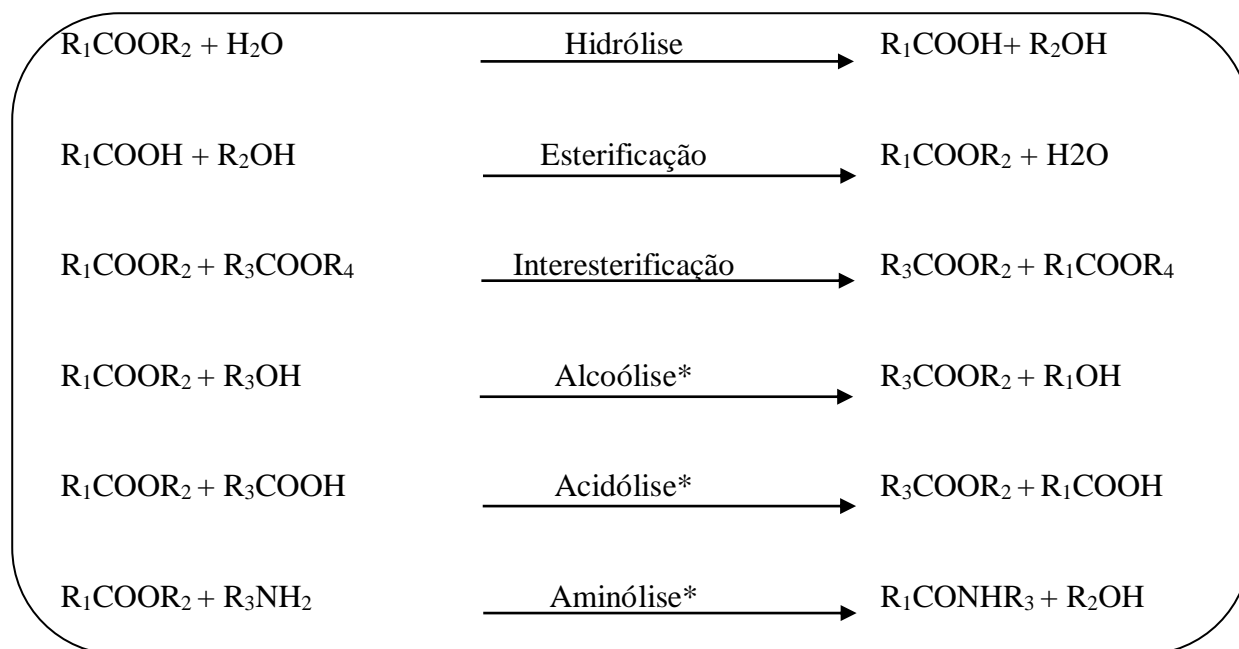
Figura 1- Reações de transesterificação com metanol e etanol e de hidrólise catalisadas por lipase

2.3.3 Aplicações de lipases

Segundo Daiha *et al.* (2015), as lipases têm recebido muita atenção com o rápido desempenho da tecnologia de enzimas, por possuírem propriedades peculiares, e por constituírem o mais importante grupo de agentes catalíticos para aplicações biotecnológicas.

O uso das lipases em diferentes áreas é possível devido à sua grande diversidade catalítica. Segundo Gurung *et al.* (2013), essas enzimas atuam com atividade hidrolítica sobre triglicerídeos gerando ácidos livres, monoacil ou diacilgliceróis, assim como podem catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (acidólise, alcoólise e aminólise), como pode ser observado na Figura 2. Como hidrolases, as lipases não precisam de cofator e agem preferencialmente nas ligações éster nas posições 1 e 3 da cadeia do triglicerídeo (NAGARAJAN, 2012).

Segundo Oliveira (2000), as reações de transesterificação consistem em uma combinação sequencial das reações de hidrólise e síntese com transferência de grupos acila dando origem a um novo éster e uma nova molécula.



* Reações de transesterificação.

Figura 2 - Lista de reações catalisadas por lipase

O comércio de lipases movimentava bilhões de dólares e envolve suas múltiplas aplicações dos produtos de valor agregado gerados a partir de sua ação catalítica sobre diferentes substratos. A maioria das enzimas em uso industrial corrente é proveniente de origem microbiana e é produzida por fermentação em substrato líquido (FSL) (HASAN *et al.*, 2006).

Apesar do grande número de lipases comercialmente disponíveis fabricadas por empresas como Amano, Gist-Brocades, Biocatalysts, Novozymes, Meito Sangyo e Lyven, aplicações industriais continuam limitadas devido ao alto custo e à pequena variedade de lipases disponíveis em quantidade para uso industrial (HOUDE *et al.*, 2004; ABDELMOEZ *et al.*, 2013). Assim, as principais aplicações efetivas de lipases são principalmente na indústria de detergentes, alimentícia e farmacêutica.

2.3.3.1 Aplicações de lipases em indústria alimentícia

Dependendo do tipo de reação catalisada pela lipase (hidrólise, esterificação ou transesterificação) pode haver uma aplicação diferente na indústria de alimentos.

Em relação à ação hidrolítica, Sharma *et al.* (2013) relataram que a atividade lipásica depende de sua estrutura tridimensional e dos aminoácidos no sítio ativo que fará a ligação com os substratos graxos. Assim, testes da ação catalítica de lipases sobre diferentes substratos podem gerar ácidos graxos aplicáveis na manufatura de diferentes produtos com alto valor agregado como revestimentos, adesivos (MURTY *et al.*, 2002), surfactantes (HANSAN *et al.*, 2006) bem como concentrados de ácidos graxos úteis na nutrição (BARROS *et al.*, 2010). Podem ainda ser utilizadas em alimentos a fim de hidrolisar ácidos graxos diversos, os quais, de acordo com a insaturação e comprimento de cadeia podem interferir nas propriedades sensoriais do alimento como aroma, cor e sabor (BARROS *et al.*, 2010).

A ação da lipase sobre triglicerídeos pode ocorrer de maneira parcial ou total dependendo de sua especificidade. Sharma *et al.* (2013) mostraram ação hidrolítica de lipases de *Candida cylindracea* e *C. rugosa* sobre óleo de fígado de bacalhau gerando concentrados de ácidos graxos com diferentes composições.

Lipases podem ser utilizadas para a retirada da gordura de carnes magras (HASAN *et al.*, 2006). Desta mesma forma, a ação hidrolítica das lipases sobre resíduos de peixe, proveniente da indústria pesqueira, permite a obtenção de uma farinha, com baixo teor de gordura e grande valor proteico (YANO *et al.*, 2008).

Penci *et al.* (2010), mostraram que fosfolipases de pâncreas de porco e de *Aspergillus oryzae* hidrolisam óleo de girassol e lecitina de soja para liberar fosfolipídeos que podem ser utilizados como emulsificantes na indústria de alimentos, uma vez que possuem caráter anfifílico.

A esterificação é uma reação típica catalisada por lipases em meios com baixo teor de água e produtos importantes para a indústria alimentícia como ésteres de *flavor* podem ser produzidos por essas reações (TENG e XU, 2007). Ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e álcoois são os principais responsáveis pelo *flavor*. Devido a essa propriedade, lipases tem sido usadas para refinar o *flavor* do arroz, do suco de maçã e modificar o leite de soja (HASAN *et al.*, 2006). Atualmente, lipases têm sido usadas em processos fermentativos de fabricação de salsicha, pois esterificam o etanol e os ácidos graxos de cadeia longa liberados durante a maturação, melhorando o aroma de salsichas (HORCHANI *et al.*, 2012). Jain e Mishra (2015) utilizaram uma lipase de *Bacillus licheniformis* para produzir acetato de isobutila, um reconhecido componente com aroma de abacaxi. Silva *et al.* (2014) usaram lipase de pâncreas

de porco também para esterificar butan-1-ol e ácido butírico para a produção de aroma de abacaxi (butirato de butila).

Os produtos da hidrólise de óleos vegetais contendo ácidos graxos essenciais (como oleico, linoleico ou α linolenico) podem ser interesterificados com outros óleos vegetais para criar lipídeos estruturados com ácidos graxos essenciais em posições estratégicas (*Sn*-1,3 ou *Sn*-2), úteis como nutracêuticos (CARVALHO *et al.*, 2009). Betapol™ (Loders Croklaan) é a primeira fórmula de lipídeo modificado por lipase 1,3 – específica para nutrição de crianças como substituto do leite materno (HOUDE *et al.*, 2004). Nessa fórmula, a lipase foi usada sobre tripalmitoil glicerol e óleo de girassol (fonte de ácidos graxos insaturados), convertendo as tripalmitinas em novos triglicerídeos com ácidos graxos insaturados na posição 1,3 e saturados na posição 2 da cadeia do triglicerídeo, similar aos triglicerídeos presentes no leite materno (SILVA *et al.*, 2007). Essa interesterificação produziu um triglicerídeo (1,3-insaturado, 2-saturado) mais assimilável pelos bebês do que as tripalmitinas usadas nas fórmulas infantis uma vez que no intestino delgado, as lipases humanas clivam o triglicerídeo na posição 1,3 liberando dois ácidos graxos insaturados os quais são mais facilmente absorvidos do que os ácidos graxos saturados. A dificuldade de absorção aumenta à medida que aumenta o comprimento da cadeia e a sua saturação (AKOH, 2002).

Um dos benefícios da produção de triglicerídeos estruturados é alteração da temperatura de fusão dos triglicerídeos, que pode ocorrer de acordo com o ácido graxo adicionado e essa propriedade pode ser útil na produção de margarinas. Nesses alimentos, os óleos vegetais são saturados com hidrogênio e em seguida é realizada uma etapa de interesterificação em que se adicionam alguns ácidos graxos insaturados até alcançar a textura (cremosidade) ideal do alimento. Nesse contexto, De e Patel (2010) interesterificaram azeite de dendê com diferentes lipases comerciais, obtendo aumento da temperatura de fusão de 32 para 38 °C.

2.3.3.2 Aplicações farmacêuticas

Dentro da indústria farmacêutica, a propriedade mais explorada das lipases é a resolução de misturas racêmicas. Um exemplo disto é o mercado financeiro de aproximadamente U\$ 273 milhões, em 2002, elicitado por Diltiazem, um bloqueador de canal de cálcio que também é vasodilatador coronariano com produção mundial de 100 t.a⁻¹. A resolução enzimática de epoxiesteres gera um intermediário essencial para a síntese de

Diltiazem, encurtando de nove para quatro etapas a rota sintética, com maior rendimento (HOUDE *et al.*, 2004, MEIER *et al.*, 2007).

Segundo Adrio e Demain (2014) os principais mercados consumidores de enzimas industriais são a Europa e a América do Norte, seguidos por China, Japão e Índia.

2.4 *Morus alba*: características gerais

M. alba L., amoreira, é uma planta lenhosa pertencente à ordem *Urticales* e à família *Moraceae* que possui cerca de 10 a 16 gêneros encontrados em climas subtropicais e temperados da Europa, Ásia, África e América do Norte (KURNIATI *et al.*, 2014). Apesar de ser originária da Ásia, a sua atual distribuição geográfica é mundial (NODA *et al.*, 2004).

Essa planta é de grande interesse econômico devido ao uso da sua folhagem na nutrição do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), que a converte fisiologicamente em casulos, os quais são feitos de finos fios de seda utilizados na tecelagem. Além da sericultura, a amoreira também é utilizada para a produção da fruta, a amora, usada em sucos, marmeladas e vinhos, como planta ornamental e a casca da raiz e folhas são usadas na forma de chá (MEDINA *et al.*, 2009).

Segundo Martín *et al.* (2014), a sericultura é o principal processo que levou aos estudos e melhoramento genético dessa planta, implicando na formação de variedades em diferentes continentes. No Brasil, segundo Gomes (2011), os primeiros cultivos de amoreira também foram impulsionados por tentativa de estabelecer a sericultura no país, com *M. alba* L. sendo o cultivar mais utilizado.

Segundo Miranda *et al.* (2002), a quantidade de folhas produzidas por planta bem como a quantidade e tipo de nutrientes por folhas podem influenciar o crescimento e desenvolvimento do bicho-da-seda e isso têm impulsionados estudos que buscam cultivares híbridos mais adaptados ao clima e solo brasileiros, bem como mais produtivos.

O Brasil contém uma coleção de amoreiras no Instituto Agrônomo do Paraná, em Londrina. Meneguim *et al.* (2007) cita que a variedade Miúra é a mais cultivada no estado do Paraná, o qual é responsável por 90 % da produção de casulo de bicho-da-seda do Brasil e demonstra o potencial de aumento de produtividade da sericultura usando outros cultivares como a híbrida SK4. Outras variedades naturais como calabresa (MIRANDA *et al.*, 2002), Korin e tailandesa (MENEGUIM *et al.*, 2010), e híbridas como a IZ 56/4, IZ 13/6 (FONSECA *et al.*, 1987) também têm sido estudadas no Brasil.

A criação de diferentes variedades de *M. alba* gera cultivares que crescem em diferentes condições de solo, clima, possuem resistência à pragas, melhor qualidade nutritiva e são úteis para produção de biomassa vegetal (MEDINA *et al.*, 2009).

2.5 Composição química da amoreira e suas aplicações

Os frutos da amoreira possuem notáveis quantidades de proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas ou seus precursores (BUTT *et al.*, 2008; RIVIERE *et al.*, 2014). Boschini *et al.* (1998) relataram um teor de proteínas entre 14 a 22 % em base seca e a digestibilidade *in vitro* entre 70 e 80. Esses fatores são importantes quando se usa essa planta na nutrição animal e humana.

Além de componentes nutricionais, o gênero *Morus* possui alguns metabólitos secundários que auxiliam na resistência a estresses ambientais e à pragas (fitopatógenos) (PAREDES-LOPEZ *et al.*, 2010). Esses compostos têm atividade biológica e são distribuídos em diferentes partes da planta, tais como no caule (NAM *et al.*, 2012), folhas (KURNIATI *et al.*, 2014) e frutos (DONNO *et al.*, 2015).

Nam *et al.* (2012) sugeriram que o consumo de bebidas preparadas a partir de extratos de caule de *M. alba* podem ser benéficas à saúde. Esses autores demonstraram que extratos de caule de *M. alba*, na concentração de 160 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, eram capazes de gerar aproximadamente 60% de atividade antioxidante em comparação com o padrão butil-hidroxi-tolueno (BHT), composto sintético usado como aditivo antioxidante em diversos alimentos. Substâncias isoladas de *M. alba* tais como eugenol e 2,5 di-hidroxiacetofenona apresentam menor atividade antioxidante do que o extrato da planta, provavelmente devido ao sinergismo que existe quando os componentes encontram-se todos no extrato (NAM *et al.*, 2012).

Ahmad *et al.* (2013) citam a importância do cultivo de *M. alba* como planta medicinal com cultivo em diferentes países asiáticos, tais como Índia, Coreia, China, Tailândia e Japão. Esses autores isolaram um esteroide (alboesterol) do extrato do tronco de *M. alba* ativo contra úlceras causadas por *Helicobacter pylori* em ratos, além de aumentar a concentração de marcadores do desequilíbrio redox tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona reduzida (GSH) nesse modelo animal.

Riviere *et al.* (2014) isolaram (*E*)-revesterol e muracina, também de extrato do caule de *M. alba* e avaliaram sua capacidade anti-inflamatória de inibir a produção de óxido nítrico em células de glias. Essas células participam da defesa do sistema nervoso central produzindo mediadores pro-inflamatórios mediante estímulo, que estão associadas a doenças

neurodegenerativas (como Alzheimer). Quando recebem estímulo anormal, são ativadas de forma crônica e produzem quantidades exacerbadas de substâncias pró-inflamatórias como o óxido nítrico. Esses autores relataram que (*E*)-revestero (15,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e muracina (21,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) são capazes de inibir 50% da produção de óxido nítrico das células gliais, comprovando o potencial anti-inflamatório desses componentes isolados de *M. alba*.

Atividades biológicas também têm sido descritas para extratos de folhas de *M. alba*. Kurniati *et al.* (2014), por exemplo, demonstraram a eficiência do extrato de folhas na vasodilatação dos vasos sanguíneos de orelha de coelhos e ratos, 30 minutos após a administração desses extratos. Isso reitera o potencial das folhas dessa planta no auxílio no controle da pressão arterial por meio de vasodilatação.

Jeszka-Skowron *et al.* (2014) comprovaram a capacidade de extratos etanólicos de folhas de *M. alba* em modular o metabolismo da glicose por aumento de secreção de insulina e controle da glicemia em ratos com diabetes do tipo 2 induzida.

Já extratos de galhos de *M. alba* (CHANG *et al.*, 2011) demonstraram, em ensaios *in vitro*, atividade anti-polifenol oxidase, ou antitirosinase. Isso reforça a presença de atividade antioxidante dos extratos dessa parte da planta e seu potencial para ser usada em alimentos, uma vez que a tirosinase provoca degradação de fenóis e reações de escurecimento enzimático em alimentos, o que reduz a atração sensorial e o valor nutricional durante a vida de prateleira.

Os frutos de *M. alba* também apresentaram grande concentração de ácidos orgânicos, monoterpenos, polifenóis e antocianinas (DONNO *et al.*, 2015). Kim *et al.* (2013) observaram, ainda em extratos de frutos de *M. alba*, atividade de ativação de macrófagos.

El-Beshbishy *et al.* (2006) demonstraram atividade antioxidante e hipocolesterolêmica de extratos de cascas de raízes de *M. alba*, enquanto Eo *et al.* (2014) demonstraram atividade anti-inflamatória e antitumoral. A composição bioquímica de uma planta está associada a vários fatores como a variedade utilizada, as condições geográficas e o clima (PAREDES-LOPEZ *et al.*, 2010).

2.6 Alimentos funcionais

Inúmeras pesquisas comprovam a associação dieta-saúde, e isso têm levado a alterações do comportamento das pessoas em relação à alimentação (BUTT *et al.*, 2008). Têm-se procurado alimentos de origem natural que, além de fornecer nutrientes e energia,

possam contribuir para um melhor funcionamento do corpo, reduzindo o aparecimento de doenças crônicas (MARTIN *et al.*, 2011).

A expectativa de vida da população brasileira vem aumentando e a busca por um envelhecimento mais saudável também tem direcionado o comportamento alimentar. Associado a esses fatores, têm-se observado mudanças na legislação de alimentos na busca por aditivos saudáveis que possam ser utilizados na indústria de alimentos (EGEA *et al.*, 2010). Nesse contexto, uma nova classe de alimentos derivados de plantas tem ganhado considerável relevância no mercado, os alimentos funcionais.

Por volta de 1980, o governo do Japão nomeou alimentos “funcionais” o grupo de alimentos processados que se assemelham a alimentos convencionais e trazem, além da função nutricional, um benefício fisiológico ou auxílio no combate às doenças crônicas (STRINGHETA *et al.*, 2007). Segundo resolução 18 de 30 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA), alimentos funcionais são aqueles ingredientes (nutriente ou não) ou alimentos que, em sua versão pronta para o consumo, produzem efeitos metabólicos, fisiológicos ou benéficos à saúde e, independente de supervisão médica, são seguros para o consumo (BRASIL, 1999).

Os ingredientes que compõem um alimento funcional aprovados pela ANVISA têm funções biológicas diversas como manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos (ômega 3) e colesterol (β -glicana), atividade antioxidante para proteger as células dos radicais livres (carotenoides como licopeno, zeaxantina e luteína), auxílio no funcionamento do intestino (fibras alimentares como dextrina resistente, goma guar, lactulose, polidextrose) e regulação da microbiota (fruto-oligossacarídeos, inulina, probióticos).

2.7 A oxidação e suas consequências biológicas em tecidos vivos e em alimentos

Os humanos são animais essencialmente aeróbicos, portanto, sua atividade metabólica normal induz a produção de radicais livres tais como oxigênio singlete, ânion superóxido, hidroxila, peroxila e radical óxido nítrico, que podem resultar em danos às moléculas e membranas (BUTT *et al.*, 2008). É imprescindível evitar os danos da oxidação nas estruturas celulares e, por isso, o corpo humano desenvolveu uma rede de mecanismos e efetores contra esses radicais livres tais como: vitaminas E e C, carotenoides e enzimas antioxidantes (super óxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase) (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Quando há um desequilíbrio entre a produção e a remoção de radicais livres, ocorre o estresse oxidativo (HUANG *et al.*, 2005). Isso pode ocorrer devido ao aumento de geração de radicais livres por fatores internos como envelhecimento, exercício físico, aumento de produção de enzimas (xantina oxidase, óxido nítrico sintase), ação de células de defesa (macrófago e neutrófilo) ou processos patológicos (diabetes, inflamação e câncer) (DAMODARAN *et al.*, 2010). Alguns fatores externos como poluição, exposição à fumaça de cigarro e carros, gases atmosféricos, produtos químicos e radiação também podem levar ao estresse oxidativo (KOHEN e NYSKA, 2002).

Várias doenças estão associadas com o estresse oxidativo como doenças cardiovasculares de uma forma geral e diabetes. Segundo Maritim *et al.* (2003) o diabetes, por exemplo, induz o aumento da produção de radicais livres por diferentes mecanismos metabólicos, tais como oxidação da glicose que gera ânion superóxido e produção de radicais hidroxila ou peroxinitritos, bem como provoca a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. O paciente diabético pode ter sérias complicações na patologia em função desses processos oxidativos.

A oxidação ocorre em alvos variados nos alimentos (macronutrientes e micronutrientes) provocando diferentes alterações como branqueamento de pigmentos, destruição de vitaminas e formação de aromas desagradáveis que levam a inúmeras perdas na indústria (ARAUJO, 2008).

O processo de oxidação de lipídeos em alimentos gera a rancificação e representa uma das mais importantes causas de perdas de produtos alimentícios, tendo por base dois mecanismos responsáveis pela sua formação: lipolítico e oxidativo (COULTATE *et al.*, 2013). Os principais alvos de oxidação nas moléculas lipídicas são: as ligações éster entre carboxila dos ácidos graxos e a hidroxila do glicerol e as insaturações. Os produtos de oxidação possuem odores e sabores indesejáveis, reduzindo o tempo de prateleira do alimento (OETTERER *et al.*, 2006).

Segundo Araujo *et al.* (2008), os aminoácidos metionina, cisteína, triptofano, histidina e tirosina são os mais suscetíveis à oxidação nas proteínas de alimentos e essa oxidação ocorre principalmente por meio dos radicais hidroxila e oxigênio singleto. Os principais subprodutos dessa oxidação, ao contrário da oxidação dos lipídeos, não estão tão relacionados com a formação de aromas desagradáveis, mas sim com a redução da biodisponibilidade desses nutrientes (DAMODARAM *et al.*, 2010).

Uma ação oxidativa nos alimentos que implica em perda de cerca de 50 % das frutas tropicais no mundo é o escurecimento enzimático provocado pela ação da enzima

polifenoloxidase ativada na presença de oxigênio, sobre os compostos fenólicos dos alimentos (ARAÚJO, 2008).

Os diferentes processos oxidativos que ocorrem em alimentos impactam sobre a biodisponibilidade dos nutrientes, no valor nutritivo, nas características físicas, na formação de compostos tóxicos bem como na redução da vida de prateleira (CHANG *et al.*, 2011). Assim, é necessário o uso de diferentes antioxidantes em alimentos para garantir a integridade de seus componentes.

2.8 Atividade antioxidante

Segundo Kohen e Nyska (2002), antioxidantes são compostos que, em concentração pequena, conseguem atrasar ou evitar a oxidação de moléculas e, para tanto, podem atuar por diferentes mecanismos, tais como doação de elétrons ou hidrogênio.

Segundo Araujo (2008), poucos tipos de antioxidantes fenólicos sintéticos têm uso permitido em alimentos, a saber, butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (GP). O uso de antioxidantes remonta a 1940, quando o BHA foi usado pela primeira vez para retardar a oxidação (SHAHIDI *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas, têm-se ressaltado a toxicidade dos antioxidantes sintéticos para humanos e suas propriedades carcinogênicas têm levado a severas restrições de uso desses compostos (EGEA *et al.*, 2010). Assim, a busca por compostos naturais, sobretudo de origem vegetal, que tenham atividade antioxidante *in vivo*, estão ganhando muito espaço na literatura e no mercado (CHANG *et al.*, 2011).

Muitas substâncias com alegação de propriedade funcional ou de saúde são na verdade fitonutrientes, metabólitos secundários que protegem as plantas contra danos de patógenos e estresse ambiental (PAREDES-LOPEZ *et al.*, 2010).

Inúmeras plantas têm sido investigadas quanto ao seu potencial antioxidante como, por exemplo, os galhos e casca de raiz (CHANG *et al.*, 2011), caule (NAM *et al.*, 2012), frutos (DONNO *et al.*, 2015) e folhas de *M. alba* (ARABSHAHI-DELOUEE e UROOJ, 2007), frutos da família *Rosaceae* (EGEA *et al.*, 2010), frutas dos gêneros *Rubus*, *Ribes* e *Aronia* (BENVENUTI *et al.*, 2004), raiz de *Cudrania tricuspidata* (Carr.) e de *Oenothera biennis* (AHMAD *et al.*, 2013) e flores de *Opuntia ficus-indica* L (AMMAR *et al.*, 2015).

Os mecanismos de ação antioxidante são muito complexos e distintos, como a captura de radicais livres (Figura 3 e 4) e complexação de íons metálicos (HUANG *et al.*, 2005).

Assim, o uso de diferentes técnicas de detecção de atividade antioxidante é importante no momento de avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais.

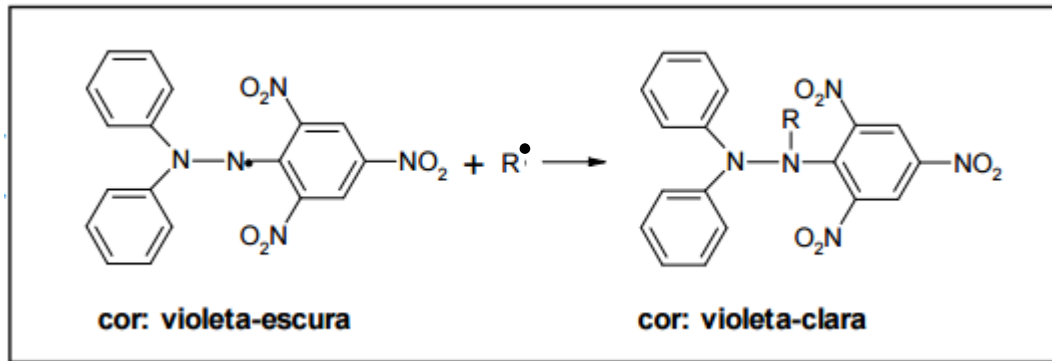


Figura 3 - Mecanismo de estabilização do radical DPPH.

FONTE: Huang *et al.* (2005).

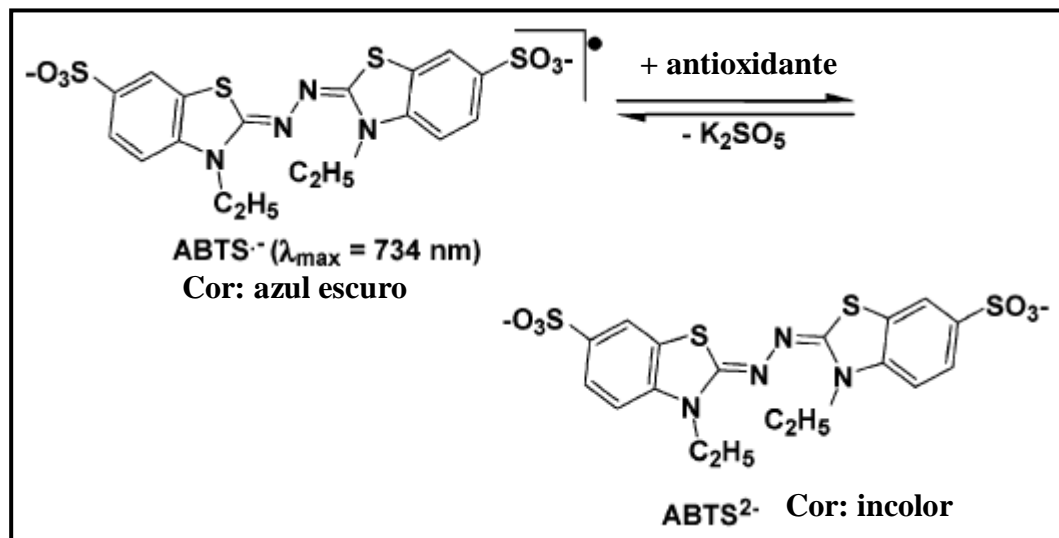


Figura 4 Mecanismo de estabilização do radical ABTS.

FONTE: Huang *et al.* (2005).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico de lipase produzida pelo fungo filamentosso *C. gloeosporioides* e da atividade antioxidante das raízes da planta *M. alba*.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir um preparado enzimático contendo lipase utilizando FSL a partir de *C. gloeosporioides*.
- Purificar parcialmente a lipase contida no preparado enzimático.
- Caracterizar a lipase de *C. gloeosporioides* no preparado enzimático e na fração parcialmente purificada.
- Avaliar as atividades de hidrólise, esterificação e transesterificação da lipase contida no preparado enzimático, utilizando substratos diferentes.
- Determinar a concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides em extratos etanólicos, hexânicos e aquosos de 12 variedades de *M. alba*
- Avaliar a capacidade antioxidante da raiz de *M. alba* por diferentes mecanismos.
- Correlacionar a concentração de compostos fenólicos dos extratos com sua atividade antioxidante para sugerir um cultivar mais eficiente na produção de compostos com atividade antioxidante.

CAPÍTULO I PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÕES DE LIPASE PRODUZIDA POR *Colletotrichum gloeosporioides*

4. INTRODUÇÃO

As lipases, EC 3.1.1.3, em associação com as cutinases e outras esterases, desempenham um papel importante na ciclagem dos lipídeos (TORRES-SALAS *et al.*, 2014) e portanto, estão amplamente distribuídas na natureza em fontes animais, vegetais e microbianas. Dentre estas, as enzimas microbianas são mais utilizadas industrialmente (COELHO *et al.*, 2013) devido às suas características, como menor custo de produção e de purificação, principalmente aquelas produzidas de maneira extracelular (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011), apresentam facilidade para expressar-se em hospedeiros mais adaptados à produção industrial de proteína heteróloga (HUANG *et al.*, 2015), além de atuação em diferentes condições de pH e temperatura.

As lipases são enzimas muito versáteis e podem catalisar diferentes reações em meio orgânico (como reações de esterificação, interesterificação e transesterificação) e em meio aquoso (como hidrólise de triglicerídeos em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol) (BOSE e KEHAIA, 2013). Podem agir sobre uma ampla diversidade de substratos tais como óleos e gorduras naturais, triglicerídeos sintéticos e ésteres de ácido graxo (HOUDE *et al.*, 2004). Essas características, somadas à sua estabilidade, quimio-, regio- e enantiosseletividade sem a necessidade de adicionar cofatores para a reação se processar, amplificam as possibilidades de uso dessas proteínas e mantêm essas enzimas na categoria de grupo catalítico de grande interesse biotecnológico e industrial (DAIHA *et al.*, 2015).

As lipases têm atraído muita atenção como grupo de catalisadores com comprovado potencial de uso em processos biotecnológicos, da ainda pouco explorada, bioindústria de tecnologia de lipídeos (TREICHEL *et al.*, 2010). Devido à sua versatilidade catalítica, seu uso abrange desde obtenção de ésteres aromáticos usados na indústria de alimentos, em formulação de detergentes, aplicação em resolução de misturas de drogas opticamente ativas (misturas racêmicas), produção de insumos químicos, agroquímicos, biopolímeros, bem como seu uso como biosensores, na biorremediação além de aplicação na produção de cosméticos (HASAN *et al.*, 2006; JOSEPH *et al.*, 2008).

O aumento da demanda mundial de enzimas têm levado a uma projeção de movimentação de 8 bilhões de dólares em 2015 (LI *et al.*, 2012). Contudo, o uso industrial de lipases permanece limitado por seu custo comercial, sobretudo em aplicações que demandam grandes contingentes desse catalisador e geram produtos finais de baixo custo (RIBEIRO *et al.*, 2011). Por isso, mais estudos são necessários para solucionar questões de redução de custo de produção e de aumento da eficiência catalítica da enzima (por meio do estudo de suas propriedades físicas, químicas e genéticas). A prospecção de grupos microbianos que produzem enzimas com novas propriedades de especificidade, estabilidade ao pH e temperatura e versatilidade catalítica também é uma tendência nesta área.

Segundo Daiha *et al.* (2015) há quatro importantes setores industriais onde a aplicação de lipases é mais notável: resolução cinética de enantiômeros (química fina), formulação de detergentes, produção de biodiesel e na área de alimentação (humana ou animal).

Na indústria de formulação de detergentes, a primeira lipase com sucesso comercial (Lipolase) foi lançada pela empresa Novo Nordisk A/S no final da década de 80 (DAIHA *et al.*, 2015). Essa aplicação, entretanto, requer características bem peculiares das lipases como ser alcalina, tolerar e ser ativa em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de ser estável frente a íons metálicos, surfactantes e oxidantes, componentes comuns na formulação dos detergentes (WANG *et al.*, 1995; SU *et al.*, 2015).

A transesterificação é um processo que pode ser usado na indústria para se conduzir uma reação entre um óleo e um álcool para a produção de biodiesel. Pode ser realizado por meio de catálise alcalina (processo mais usado atualmente embora possa ocorrer saponificação, o que é um inconveniente), catálise ácida (processo mais lento) ou catálise enzimática (usando lipases e com maior estabilidade, segurança e menor geração de resíduo). Para ser aplicável na síntese desse biocombustível, a lipase precisa ter bom rendimento em transesterificação, estabilidade em álcool (principalmente metanol) e baixo custo de produção, visto que esses são os problemas mais críticos da indústria de biodiesel (JAIN e MISHRA, 2015).

No setor de alimentos, as lipases com altos rendimentos em esterificação são aplicáveis na síntese de ésteres aromáticos, com grande seletividade (poucos subprodutos gerados), em baixa temperatura (com menor gasto de energia) e menor geração de resíduos (SILVA *et al.*, 2014). Esses componentes aromáticos ocupam, segundo Jain e Mishra (2015), cerca de um quarto do mercado mundial de aditivos de alimentos. As lipases apresentam diversas outras aplicações na área de alimentos, tais como hidrólise da gordura do leite e

queijo, na formação de aromas, melhoramento na qualidade da emulsificação de maioneses, transesterificação e formação de lipídeos estruturados mais saudáveis, entre outras (ARAVIDAN *et al.*, 2007).

A hidrólise enzimática de óleos e gorduras é de grande interesse industrial. Óleos vegetais são compostos essencialmente de triglicerídeos contendo ácidos graxos com cadeias de diferentes comprimentos (C8-C24) e variados graus de saturação. Associados à gordura animal, representam o suprimento mundial de óleos naturais renováveis (DYER *et al.*, 2008). Segundo a *Statistics Division of Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAOSTAT (2013), a produção mundial de plantas oleaginosas aumentou cerca de 70 milhões de toneladas na última década, alcançando a soma de 196,7 milhões de toneladas em 2013. Esses óleos naturais têm sido historicamente aplicados na indústria alimentícia, nutrição animal e, em menor extensão, na indústria de detergentes, como lubrificantes, na oleoquímica, mais recentemente, tem sido utilizados para a produção de biodiesel (SALIHU *et al.*, 2012).

Uma das vertentes de exploração econômica de óleos vegetais e gorduras consiste em produzir concentrados de ácidos graxos livres e na forma de gliceróis (monoacil ou diacilgliceróis), os quais são utilizados como matéria-prima em diversos setores industriais como emulsificantes, revestimentos, adesivos, surfactantes, produtos de cuidados pessoais e alimentos (AVELAR *et al.*, 2013). Na nutrição animal, por exemplo, o uso de ácidos graxos insaturados provenientes de fontes vegetais na ração implica na produção de carne mais saudável (FERNANDES *et al.*, 2009).

Ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados gerados a partir da hidrólise de óleos vegetais e gorduras possuem importantes propriedades fisiológicas como promoção de aumento do HDL, redução do risco de doença cardiovascular, possuem efeitos benéficos na aterosclerose, trombose e arritmia (CARVALHO *et al.*, 2009; JAIN e MISHRA *et al.*, 2015). Além disso, esses ácidos são essenciais na formação das membranas celulares e de prostaglandinas e seu uso têm sido intensificado como aditivos de alimentos, nutracêuticos e fármacos (anti-inflamatório, anticolesterolêmico e antitrombolítico) (SHARMA *et al.*, 2001).

Há três rotas principais para a produção de ácidos graxos a partir de óleos vegetais: separação com alta pressão de vapor sob alta temperatura (250 °C e 70 bar) com formação de produtos indesejáveis; hidrólise alcalina com seu alto custo de processo e necessidade de acidificação dos produtos (sabão) formados; hidrólise enzimática (MURTY *et al.*, 2002). Esta última oferece a vantagem de ser realizada em condições amenas de pressão e temperatura, ter altos rendimentos de conversão, facilitar a recuperação de produtos (SHARMA *et al.*, 2013;

JAIN e MISHRA *et al.*, 2015), ter menos perda de produtos por aquecimento (BARROS *et al.*, 2010), além de apresentar menor número de reações secundárias (DAIHA *et al.*, 2015).

A maior dificuldade para substituir a catálise química pela catálise enzimática na produção de concentrados de ácidos graxos consiste em encontrar uma enzima capaz de converter o substrato com bons rendimentos, especificidade catalítica para o processo e que tenha um baixo custo de produção (ABDELMOEZ *et al.*, 2013).

Fungos fitopatogênicos produzem enzimas extracelulares capazes de degradar polímeros da parede celular das plantas para obter nutrientes e garantir a infecção durante o processo de invasão de tecidos vegetais (ANNIS e GOODWIN, 1997). O fungo filamentosso *C. gloeosporioides* é um reconhecido fitopatógeno, causador da antracnose (HUANG *et al.*, 2015) em frutas tropicais e subtropicais, o que afeta culturas de alto valor como manga, morango, abacate, citros, mamão, caju e maracujá (SERRA *et al.*, 2011). *Colletotrichum* é considerado o oitavo maior gênero fitopatogênico de impacto econômico mundial e interesse científico. Espécies de *Colletotrichum* são relatadas como produtoras de cutinase, enzima que permite ao fitopatógeno penetrar na barreira cuticular do hospedeiro (DICKMAN *et al.*, 1982; ETTINGER *et al.*, 1987; BONNEN e HAMMERSCHMIDT, 1989). Outras enzimas secretadas por *Colletotrichum* descritas na literatura são pectato liase (DRORI *et al.*, 2003; MIYARA *et al.*, 2008), proteinases (DUNAEVSKY *et al.*, 2007), lipases (BALAJI e EBENEZER, 2008), celulasas, amilases e esterases (VENKATESAGOWDA *et al.*, 2012).

Há muitos estudos na literatura sobre aplicações de lipases microbianas, entretanto, são escassos os trabalhos sobre o potencial biotecnológico das enzimas lipolíticas de *C. gloeosporioides*, embora sejam bastante estudadas para compreensão do estabelecimento da sua patogênese em plantas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de lipase de *C. gloeosporioides* por fermentação submersa, sua purificação parcial, estabilidade frente a diferentes situações desnaturantes e aplicações em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação para sugerir seu potencial de uso industrial.

5. METODOLOGIA

As metodologias de produção, armazenamento e aplicação do preparado enzimático em reação de hidrólise foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (MICROAL) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais

(UFMG), com a colaboração do Professor Dr. Gecernir Colen. As metodologias de purificação, caracterização e demais aplicações do preparado enzimático foram realizadas no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas (LEFQP) no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, com a colaboração do Professor Dr. Marcelo Matos Santoro. A hidrólise química e cromatografias dos óleos foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas (ICEX) da UFMG, com a colaboração da Dra. Vany Perpétua Ferraz. Todos os solventes usados e os reagentes aplicados nas análises de cromatografia líquida e eletroforese foram grau HPLC; *para*-nitrofenila, *para*-nitrofenil palmitato, metanol, etanol, álcool isopropílico, butan-1-ol, diclorometano e acetonitrila foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO-EUA). Os meios Sabouraud, ágar batata dextrose e a peptona foram obtidos da Acumedia (Baltimore, EUA), os sais para o processo de fermentação submersa ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 e NH_4NO_3 , $CaCl_2$ e Tris amino metano) e testes de estabilidade foram obtidos da Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, Brasil). O padrão de massa molecular pré-corado foi obtido da Thermo Scientific. O óleo de mamona foi doado pela Bioóleo LTDA (Bahia, Brasil), a manteiga de cacau foi doada pela Cargill Agrícola S.A. (Bahia, Brasil), o azeite de dendê foi obtido no comércio de Salvador, Bahia (Brasil) e, o óleo residual de fritura foi doado pela comunidade acadêmica. Os demais óleos foram obtidos no comércio de Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil).

5.1 Produção de lipase por *C. gloeosporioides* em fermentação por substrato líquido

5.1.1 Manutenção da cepa de estudo

Uma cepa de *C. gloeosporioides* obtida da coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais, com conhecida atividade lipolítica (COLEN *et al.*, 2006), foi mantida em ágar batata dextrose (ABD) a 4 °C. Esse micro-organismo foi preservado em fragmentos deste ágar imersos em água destilada estéril à temperatura ambiente (CASTELLANI, 1967).

5.1.2 Pré-inóculo

Para a padronização do inóculo, foi realizado um cultivo do fungo filamentoso em ABD, em placas de Petri, por cinco dias à temperatura ambiente. Foram feitos cortes

cilíndricos no ágar (4 mm de diâmetro e 2 mm de altura) e os discos obtidos foram colocados em 5 mL de água estéril. Os esporos foram suspensos na água e contados em câmara de Neubauer. O número de cortes equivalente a 10^7 esporos por mL foi padronizado para as fermentações submersas.

5.1.3 Produção da enzima

Para definir as condições de produção da lipase baseou-se nos estudos de Colen *et al.* (2006) e fez-se o monitoramento do crescimento fúngico em relação à produção da enzima em FSL. Então, o inóculo fúngico foi adicionado a um frasco de vidro de 125 mL de capacidade, contendo 25 mL de meio de cultura padrão para produção da enzima (adaptado de COLEN *et al.* 2006), em g.L⁻¹: peptona bacteriológica de carne e de caseína (10), MgSO₄. 7H₂O (0,6), KH₂PO₄ (1,0), NH₄NO₃ (1,0) e 4 mL de óleo de oliva, em pH 6,0. Esse material foi incubado em mesa agitadora orbital (150 rpm) a 30 °C por até 96 h, para obtenção do caldo fermentado. Alíquotas desse caldo foram coletadas diariamente, resfriadas a 4 °C e filtradas em membrana Whatman n° 1. A cada 24 h foram determinados o pH, a quantidade de biomassa, o teor de proteínas totais, a atividade enzimática e a atividade específica (atividade enzimática/proteínas totais), ao longo da fermentação.

5.1.4 Determinação de pH

Determinou-se o pH dos caldos enzimáticos usando um pHmetro (Quimis).

5.1.5 Determinação de biomassa (peso seco)

O material retido na membrana de filtração foi lavado duas vezes com etanol e seco a 80 °C até peso constante, sendo, posteriormente, pesado.

5.1.6 Determinação de proteínas totais

Foi usado o procedimento descrito por Bradford (1976). Em microplacas foram adicionados 180 µL do reagente de Bradford e 20 µL da solução enzimática (ou diluição da solução, quando necessário). A mistura foi agitada suavemente e deixada em repouso por 15 min e em seguida foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Fez-

se uma curva analítica de calibração com albumina soro bovina (Merck). Os valores das amostras foram comparados com a curva analítica de calibração e foram encontrados os valores de proteínas das amostras.

5.1.7 Determinação de atividade enzimática

Para a determinação das atividades enzimáticas de hidrólise nas etapas de caracterização e purificação da enzima usou-se metodologia adaptada de Winkler e Stuckmann (1979). A lipase foi avaliada usando o *para*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) como substrato. Uma solução 3 mg.mL⁻¹ de *p*NPP em isopropanol foi misturada na proporção 1:9 com uma solução de tampão tris-HCl 0,09 mol.L⁻¹ em pH 8,0, acrescida de goma arábica (2 mg.mL⁻¹) e triton x-100 (14 mg.mL⁻¹). A essa mistura adicionaram-se 40 µL da enzima e dosou-se imediatamente a absorbância encontrada em 410 nm contra um branco em que a enzima não foi adicionada. Este procedimento foi repetido após 15 minutos de incubação a 37 °C. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade necessária para liberar 1 µmol de *para*-nitrofenol (*p*NP) por mg de proteínas e por mL do preparado enzimático adicionado ao ensaio, por min. Para esses cálculos de atividade enzimática fez-se uma curva analítica padrão usando uma solução de *p*NP em isopropanol.

5.1.8 Obtenção do preparado enzimático

Após a definição das condições de cultivo para a produção da enzima, o fungo foi cultivado por FSL, o caldo fermentado foi resfriado a 4 °C e então filtrado em membrana Whatman n° 1. A fração sólida foi descartada e a fração líquida, contendo as enzimas, foi acondicionada a -80 °C, para ser utilizada nas etapas posteriores.

5.2 Caracterização do preparado enzimático

5.2.1 Estimativa da massa molecular

Para fazer uma estimativa da massa molecular da lipase foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (4% no gel de empilhamento e 12,5% no gel de separação) (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com prata. Um segundo grupo de geis não foi corado e foi utilizada uma solução de

triton X-100, 2,5%, para retirar-se o SDS e obter-se as proteínas na forma nativa. Assim, foi possível realizar um zimograma sobrepondo esses geis com uma camada de solução de substrato cromogênico fundido a 40 °C (*Phenol red* 0,01%; óleo de oliva 1%; CaCl₂ 10 mmol.L⁻¹ e ágar 2%, em pH 7,4). Esses geis permitiram estimar a massa molecular da lipase por comparação da localização da banda com atividade catalítica com as bandas do marcador de massa molecular.

5.2.2 Estabilidade da enzima ao longo do tempo

A atividade lipolítica do preparado enzimático foi monitorada por dois meses a 25 °C (temperatura ambiente), a 4 °C (refrigerador), -18 °C (freezer) e -80 °C (ultrafreezer). O preparado enzimático foi mantido a -80 °C para as próximas análises.

5.2.3 Estabilidade enzimática

Os testes de estabilidade enzimática foram conduzidos segundo a metodologia de Castro-Ochoa *et al.* (2005), modificada, usando *p*NPP como substrato. Todas as análises foram feitas em triplicata e a atividade lipásica de uma amostra de preparado enzimático sem solvente orgânico, íon ou detergente foi usada como controle (100 % de atividade). A atividade residual foi mensurada por meio da metodologia descrita no item 5.1.7 (página 45), a 37 °C, pH 8,0.

A estabilidade térmica foi determinada por incubação do preparado enzimático (0,5 mL) em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 e 70 °C) por 1 h, seguido por quantificação da atividade enzimática. A temperatura na qual a enzima foi mais estável por 1 h também foi avaliada após 24 h. Para a estabilidade em solventes, o preparado enzimático (0,5 mL) foi incubado com três concentrações (6, 30 e 50 % v/v) de solventes miscíveis em água (metanol, etanol, isopropanol, butan-1-ol e acetonitrila) e três concentrações (30, 50 e 75 % v/v) de solventes imiscíveis em água (tolueno, hexano, heptano e diclorometano) a 37 °C, durante 1 h e, então, a atividade enzimática foi dosada. Para estabilidade em pH, o preparado enzimático foi incubado a 37 °C por 1 h com diferentes tampões (0,05 mol.L⁻¹) (citrato-fosfato para pH 4-6; TRIS-HCl para pH 7-9 e glicina-NaOH para pH 10-11) e então a atividade enzimática foi dosada. Para estudar o comportamento da estabilidade e atividade da lipase frente a diferentes íons, o preparado enzimático (0,5 mL) foi incubado a 37 °C por 1 h com soluções aquosas (0,5 mL) contendo 1 ou 10 mmol.L⁻¹ de NH₄⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Sn²⁺ e EDTA e, então, a

atividade enzimática foi avaliada. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA, de fator único), seguida por teste de Tukey com 95 % confiança.

5.2.4 Temperatura e pH ótimos de reação usando o preparado enzimático

Com base na estabilidade térmica da lipase no preparado enzimático, a temperatura ótima de reação foi determinada com a dosagem da atividade lipásica em diferentes temperaturas (30 a 45 °C). O pH ótimo de reação foi determinado pela dosagem de atividade lipásica sendo dosada em meios reacionais com diferentes valores de pH (7-11), usando diferentes tampões (TRIS-HCl para pH 7-9 e glicina-NaOH para pH 10-11), na concentração de 50 mmol.L⁻¹.

5.3 Purificação parcial da lipase produzida por *Colletotrichum gloeosporioides*

5.3.1 Purificação de baixa resolução

Para essa etapa foram adotadas duas estratégias de purificação de baixa resolução. A primeira foi baseada na precipitação por *salting-out*, através da qual se fez uma precipitação fracionada a 4 °C das proteínas totais do preparado enzimático por saturação da solução com concentrações pré-determinadas de sulfato de amônio (25%, 50%, 75% e 100%), por 2 h. A segunda estratégia baseou-se na ultrafiltração do preparado enzimático com membrana para corte de 10.000 D (membrana de celulose regenerada corte de 10 kDa Milipore (Darmstad, Alemanha)), para reter apenas as proteínas com massa molecular acima do corte. O material resultante das duas estratégias foi avaliado quanto à atividade enzimática (item 5.1.7 - página 45), proteínas totais (item 5.1.6 - página 45), atividade específica (atividade enzimática/proteínas totais).

5.3.2 Purificação de alta resolução

O material resultante da estratégia de concentração mais eficiente foi utilizado nesta etapa. Adotaram-se duas estratégias cromatográficas no *Fast Protein Liquid Chromatography System* - FPLC (GE Pharmacia, Buckinghamshire, Inglaterra) também para a separação da proteína enzimática. A primeira envolveu o uso apenas de cromatografia de troca aniônica com coluna Resource-Q, em modo de gradiente, com os eluentes tampão A (Tris-HCl 20 mM

pH 8,0) e tampão B (Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹ pH 8,0, NaCl 1 mol.L⁻¹); a segunda estratégia tratou-se de filtração em gel com coluna Superose 12 HR10/30 (Amersham Biosciences) e eluição com tampão A (modo isocrático). Em seguida, realizou-se a concentração do *pool* com maior atividade enzimática e cromatografia de afinidade deste *pool*, com coluna contendo benzamidina lavada inicialmente com tampão A e eluída em modo isocrático com tampão B, metodologia adaptada de Bou ali *et al.* (2011). As frações resultantes foram avaliadas quanto à atividade enzimática e aquelas que apresentaram maior ação catalítica foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).

5.3.3 Monitoramento da purificação

Para acompanhar a purificação da lipase foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito no item 5.2.1

5.4 Caracterização da lipase nas frações parcialmente purificadas

5.4.1 Determinação do pH e temperatura ótimas da lipase nas frações parcialmente purificadas

Para determinação da faixa de temperatura, usaram-se 150 µL das frações parcialmente purificadas e dosou-se a atividade enzimática (item 5.1.7, página 45) em diferentes temperaturas (30, 40 e 45 °C). As análises foram feitas em triplicata. Para determinação da faixa de pH, usou-se 150 µL das frações parcialmente purificadas e dosou-se a atividade enzimática (item 5.1.7, página 45) em diferentes pH, usando os tampões a 0,05 mol.L⁻¹ (tris-HCl para pH 7-9 e glicina-NaOH para pH 10-11). As análises foram feitas em triplicata. Para esses ensaios foi feita uma análise de variância (ANOVA de fator único), seguida de teste de Tukey com 95 % de confiança, para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras.

5.5 Aplicações da lipase produzida por *C. gloeosporioides*

5.5.1 Atividade hidrolítica de lipase produzida por *C. gloeosporioides*

5.5.1.1 Hidrólise enzimática dos óleos

Para avaliar a atividade hidrolítica da lipase *C. gloeosporioides*, o fungo foi cultivado para se preparar um inóculo (conforme metodologia do item 5.1.2, página 44) e produzir a enzima por meio de FSL (como descrito no item 5.1.3, página 44). Com o preparado enzimático foram feitos ensaios de titulometria conforme descrito por Colen *et al.* (2006), usando diferentes substratos (óleo de alho, amêndoas, amendoim, babosa, manteiga de cacau, óleo de canola, azeite de dendê, óleo de gergelim torrado, girassol, linhaça, mamona, milho, oliva, soja, óleo residual de soja usado em fritura e óleo de tutano). As reações enzimáticas foram conduzidas em frascos de vidro incubados em banho-maria com agitação (45 ciclos/min) a 30 °C por 10 min. Cada reação continha 5,0 mL de uma emulsão de óleo (25% v/v) em álcool polivinílico (2% v/v) como substrato; 5 mL de solução tampão TRIS-HCl 0,1 M em pH 8,0 para o ajuste do pH da enzima e 1 mL do preparado enzimático ou 1 mL deste preparado, porém desnaturado, para servir de branco da reação. A reação foi paralisada por adição de 10 mL de solução de acetona/álcool etílico (1:1) para a desnaturação da enzima. Após a reação, os ácidos graxos liberados foram titulados com hidróxido de sódio 0,05 N usando timolftaleína (0,2%) como indicador de pH. A atividade lipásica verificada foi expressa em unidades de atividade enzimática (U), que representa a quantidade de micromoles de ácidos graxos liberados por min, por mL, nas condições de ensaio e, para comparação, a hidrólise do óleo de oliva foi tomada como 100%. A mistura obtida a partir da hidrólise enzimática foi armazenada para análises posteriores.

5.5.1.2 Hidrólise química dos óleos

Para se determinar o perfil de ácidos graxos dos óleos foi realizada a hidrólise química dos mesmos. Para tanto, dissolveu-se, em tubo criogênico de capacidade de 2 mL, aproximadamente 10 mg do óleo em 100 µL de solução (1:1 v/v) de etanol (95%)/ hidróxido de potássio 1 mol.L⁻¹ (5 %). Após agitação vigorosa por 10 s, o óleo foi hidrolisado por 5 min em um forno de micro-ondas doméstico (Panasonic Piccolo) na potência de 80 W (Potência 2), adaptado do método de Christie (1989). A mistura obtida a partir da hidrólise química foi armazenada para análises posteriores.

5.5.1.3 Preparação das amostras para cromatografia

5.5.1.3.1 Extração dos ácidos graxos

As misturas provenientes das hidrólises foram resfriadas. Em seguida, foram adicionados às misturas 400 μL de HCl a 20%, 4 μg NaCl e 600 μL de acetato de etila. Após agitação vigorosa (10 s) em vórtex, as misturas ficaram em repouso por 5 min. Em seguida, 300 μL foram retirados da camada orgânica e colocados em tubos de microcentrífuga, secados por evaporação, restando apenas os ácidos graxos livres. O procedimento foi realizado com base em uma adaptação do método de Christie (1989).

5.5.1.3.2 Metilação dos ácidos graxos

Após a extração, os ácidos graxos livres foram metilados com 100 μL BF_3 / metanol (14%) sob aquecimento durante 10 minutos em banho-maria a 80 $^\circ\text{C}$. Em seguida, foram diluídos com 400 μL de metanol e armazenados para análises posteriores (EN14103, 2003). Após esse procedimento, 1 μL da solução resultante das amostras provenientes da hidrólise química foi separado para injeção no cromatógrafo a gás. Após a metilação, as amostras provenientes da hidrólise enzimática (100 μL) foram misturadas com o padrão interno (PI), 100 μL de pentadecanoato de metila ($\text{C}_{15:0}$ - 9,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após agitação suave, 1 μL desta solução foi separada para injeção no cromatógrafo a gás.

5.5.1.4 Análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia a gás

Todas as amostras foram submetidas à análise em cromatógrafo a gás HP7820A equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna HP-INNOWAX (HP) 15 m x 0,25 mm x 0,25 μm com gradiente de temperatura: 120 $^\circ\text{C}$, 0 min, 7 $^\circ\text{C}/\text{min}$ até 220 $^\circ\text{C}$. O modo de injeção era *split* de (1/50) a 250 $^\circ\text{C}$ e o detector estava a 250 $^\circ\text{C}$. O gás hidrogênio foi utilizado para arraste, com vazão de 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e volume de injeção de 1 μL . A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados SUPELCO37.

5.5.2 Atividade de transesterificação de lipase produzida por *C. gloeosporioides*

Para avaliar a capacidade da lipase de *C. gloeosporioides* de realizar transesterificação em meio com baixo teor de água, foi feito um ensaio conforme descrito por Teng e Xu (2007).

Esse método é baseado nas transesterificações catalisadas pelas lipases entre ésteres de ácidos graxos e álcool, em meio orgânico, na ausência de água. Foram utilizados o *para*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) e diferentes alcoois (metanol, etanol, isopropanol, butan-1-ol e dodecanol) como substrato para a transesterificação. A lipase, quando presente no preparado enzimático, quebra a ligação éster do *p*NPP, liberando *para*-nitrofenol (*p*NP) e ácido palmítico. Este último é usado na síntese do novo éster com o álcool utilizado. Como o aumento do *p*NP é diretamente proporcional ao aumento de éster formado, a dosagem de *p*NP liberado foi utilizada como parâmetro positivo de reação de esterificação.

Para realizar os ensaios, o preparado enzimático foi submetido à secagem em aparelho liofilizador (K 105, Liotop, Brasil). Uma alíquota (massa em g) do pó do preparado enzimático obtido contendo 20 mg de proteína foi padronizada. Esse pó foi misturado com 0,5 mL de solução de substrato (10 mmol.L⁻¹ de *p*NPP em heptano). Para iniciar a reação, um volume de 30 µL de álcool foi adicionado à mistura. Os componentes da reação foram incubados a 37 °C por 30 min com agitação constante (200 rpm). A mistura foi centrifugada por 30 s e 100 µL do sobrenadante límpido foi adicionado a 1 mL de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e a mistura foi agitada. O *p*NP liberado, extraído pelo solvente aquoso alcalino, foi dosado a 410 nm contra um branco sem enzima em espectrofotômetro UV-visível (leitor de microplaca multimodo Varioskan flash da Thermo Scientific). Uma curva analítica de calibração de *p*NP em heptano foi feita para se obter os resultados quantitativos.

5.5.3 Atividade de esterificação de lipase produzida por *C. gloeosporioides*

A fim de avaliar a atividade de esterificação direta da lipase produzida por *C. gloeosporioides* utilizou-se a metodologia de Silva *et al.* (2014), modificada. Os substratos da reação foram butan-1-ol (250 mmol.L⁻¹) e um ácido (acético, butírico ou oleico, a 250 mmol.L⁻¹). A reação ocorreu em meio orgânico (5 mL de heptano). Essa mistura foi incubada com 1 g de preparado enzimático liofilizado, a 37 °C, a 200 rpm, por 24 h. O rendimento dos ésteres formados foi quantificado pela dosagem da concentração dos ácidos residuais na mistura de reação. Uma alíquota de 500 µL do meio reacional foi diluída com etanol/acetona 50:50 (v/v), homogeneizada e titulada com uma solução de NaOH (20 mmol.L⁻¹), usando fenolftaleína como indicador. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em % de ácidos residuais.

6 RESULTADOS

6.1 Produção de lipase por *C. gloeosporioides* em FSL

O monitoramento do crescimento do fungo no FSL pode ser visto na Figura 5. Observou-se a máxima produção de biomassa após 48 h, alcançando 5 g.L^{-1} de meio de cultivo. A produção máxima de lipase, $0,742 \text{ U/mL}$ (unidades enzimáticas por mL de caldo filtrado), também ocorreu em 48 h, com atividade específica de 4,68 (unidades de lipase por mg de proteína, por mL de preparado enzimático). Dessa maneira, o período de 48 h de fermentação foi estabelecido como padrão para a produção do preparado enzimático. Foram mantidos os parâmetros da composição e pH inicial do meio de cultivo, a temperatura de incubação, a intensidade de agitação, bem como a relação entre o volume de meio de cultivo e o volume do recipiente de fermentação.

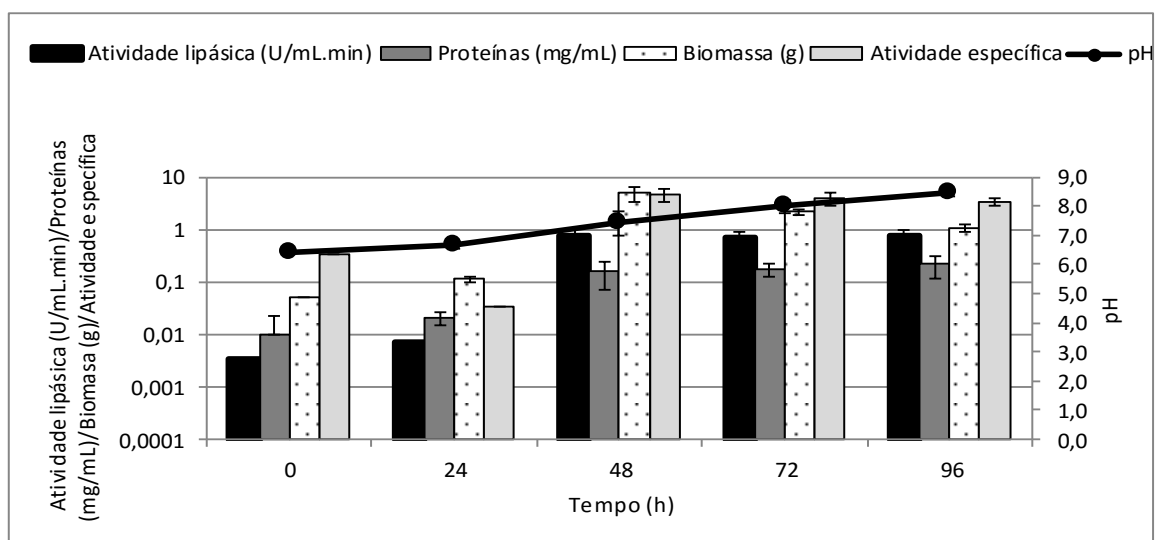


Figura 5 - Monitoramento do crescimento do fungo por fermentação submersa e da produção enzimática

6.2 Caracterização da enzima

Algumas aplicações industriais exigem caracterização parcial do preparado enzimático, a fim de adequar as condições do processo às peculiaridades das enzimas. Neste contexto, realizou-se uma estimativa da massa molecular de enzimas, bem como a investigação das melhores condições de armazenamento e avaliação da estabilidade das enzimas lipolíticas de *C. gloeosporioides* frente a solventes, íons, diferentes pHs e temperaturas.

6.2.1 Estimativa da massa molecular

Para estimar a massa molecular, o SDS-PAGE do preparado enzimático foi comparado com um zimograma contendo uma emulsão lipídica na concentração de 1% e usando um marcador de massa molecular pré-corado. A fração com atividade enzimática apresentou aproximadamente 18 kDa (Figura 6), que se assemelha ao encontrado por Chen *et al.* (2007) para uma outra enzima lipolítica de *Colletotrichum*. Oliveira (2000) também encontrou enzima lipolítica deste mesmo fungo com massa molecular acima de 10 kDa.

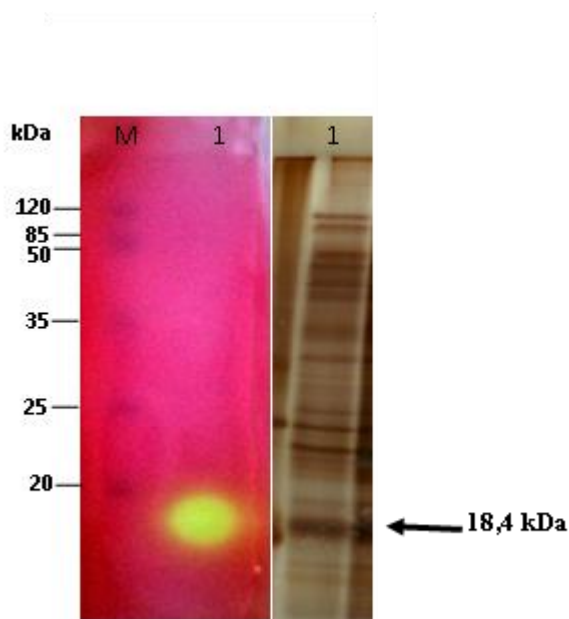


Figura 6 - Fotografia do gel do zimograma comparada com a fotografia do gel do SDS-PAGE do preparado enzimático contendo a enzima lipolítica produzida por *C. gloeosporioides*

6.2.2 Estabilidade da enzima por dois meses

O efeito da temperatura sobre o preparado enzimático foi analisado durante 60 dias, em temperaturas diferentes (Figura 7). A atividade foi medida e a enzima demonstrou ser muito instável quando armazenada à temperatura ambiente (25 °C). Ocorreu um decréscimo significativo ($p \leq 0,05$) de atividade ao longo do tempo, permanecendo em cerca de 50% de atividade inicial após 60 dias. Em temperaturas mais baixas (8 °C e -20 °C), no mesmo período de incubação, 86,8% e 77,7 % de atividade inicial foram mantidas, respectivamente. Maior estabilidade foi detectada sob armazenamento em ultrafreezer (-80 °C), quando após 60 dias, foi possível verificar uma maior atividade no preparado enzimático do que aquela que havia antes deste ser armazenado, sugerindo alguma recuperação da atividade da enzima em

condições de congelamento. Estes dados corroboram os resultados obtidos com carboxilesterases armazenados sob baixa temperatura (CORREA *et al.*, 2013). A temperatura de ultrafreezer foi, portanto, a temperatura escolhida para armazenar o preparado enzimático para as próximas etapas.

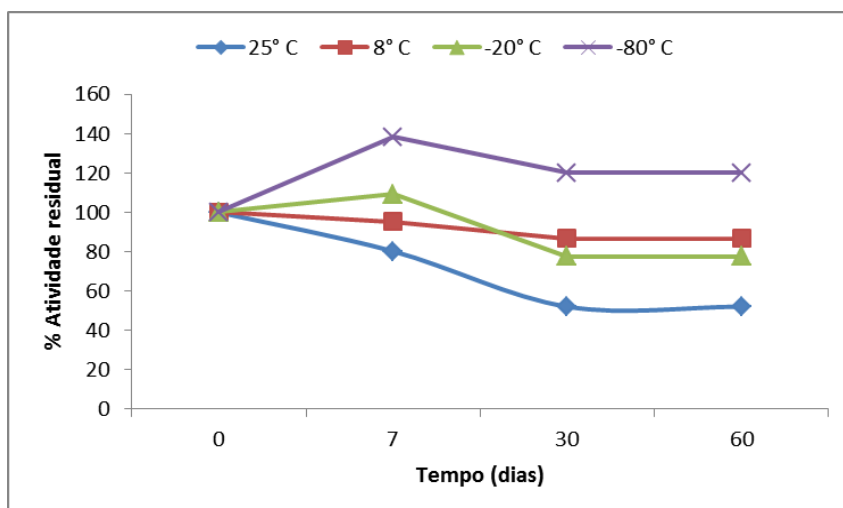


Figura 7 - Atividade residual do preparado enzimático de *C. gloeosporioides* armazenados em diferentes temperaturas

6.2.3 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima

O preparado enzimático reteve 100% de atividade lipolítica após 1 h de incubação a 30 e 40 °C (Figura 8). Estudos com lipases de *Fusarium graminearum* também apontaram estabilidade e atividade nessa faixa de temperatura (NGUYEN *et al.*, 2010). A partir de 50 °C, a estabilidade térmica da enzima de *C. gloeosporioides* foi drasticamente reduzida, mantendo um terço de sua atividade, enquanto que, a 60 °C, foi preservada apenas 6% da atividade. Ocorreu perda total de atividade a 70 °C. A falta de atividade em temperaturas mais altas sugere modificações na estrutura tridimensional e, conseqüentemente, perda de função.

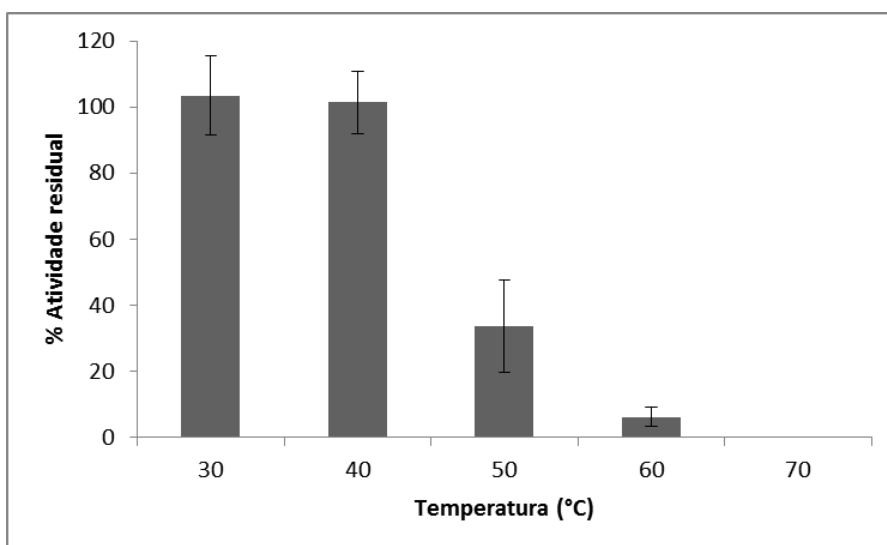


Figura 8 - Efeito da temperatura na estabilidade do preparado enzimático de *C. gloeosporioides*

A atividade catalítica ótima da lipase de *C. gloeosporioides* (no preparado enzimático) foi detectada a 37 °C (Figura 9), embora sem diferença significativa das demais temperaturas testadas. Temperaturas ótimas próximas de 37 °C têm sido relatadas em lipases de *Mucor hiemalis corticola f. lipases* (ULKER e KARAOGLU, 2012). A estabilidade da lipase na temperatura ótima foi avaliada por 24 h (Figura 10). Durante as primeiras três horas, a atividade lipolítica foi mantida, com cerca de 80% de atividade residual. A meia vida da enzima ocorreu após 5 horas de incubação, com um notável declínio após esse período. Li *et al.* (2012), por exemplo, avaliando lipase de *Stenotrophomonas maltophilia*, observaram a meia vida da enzima de 40 min a 40 °C. Os resultados encontrados aqui são, portanto, muito interessantes, pois a estabilidade em períodos longos é uma característica necessária para algumas aplicações industriais.

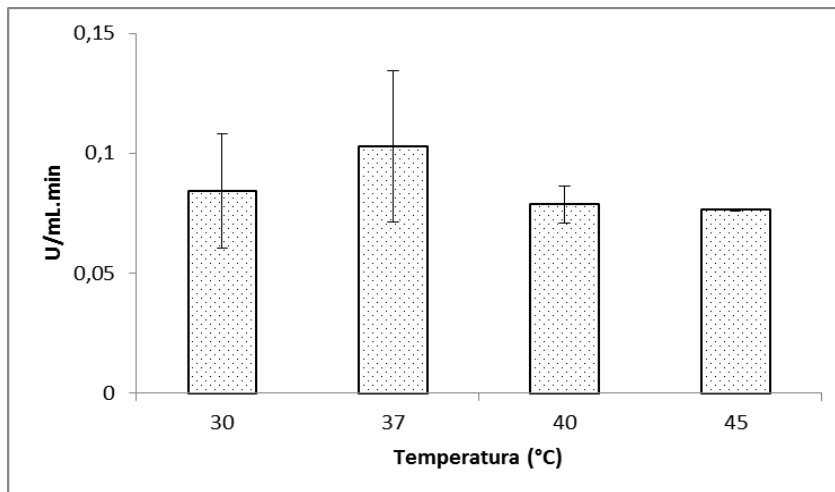


Figura 9 - Determinação do valor ótimo de temperatura da lipase de *C. gloeosporioides* no preparado enzimático

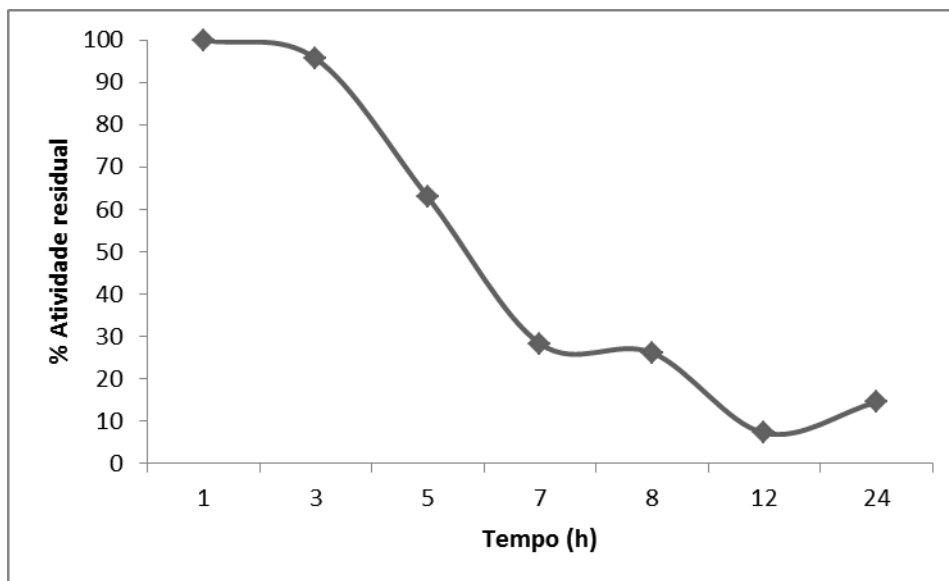


Figura 10 - Efeito da temperatura na estabilidade da lipase de *C. gloeosporioides* no preparado enzimático por 24 h, a 37 °C

6.2.4 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da enzima

A lipase de *C. gloeosporioides* manteve-se relativamente estável na faixa de pH 5 a 8 (atividade de residual de 60% ou mais), com maior estabilidade em pH 6,0, após 1 h a 37 °C (Figura 11). A lipase ficou mais instável em pH mais elevado, mantendo cerca de 30% da atividade original em pH 9 e 10, e cerca de 20% de atividade residual em pH 11. Apesar de ter

sido mostrado pouca resistência a meio alcalino, o preparado enzimático apresentou valor ótimo quando em pH 12 (Figura 12).

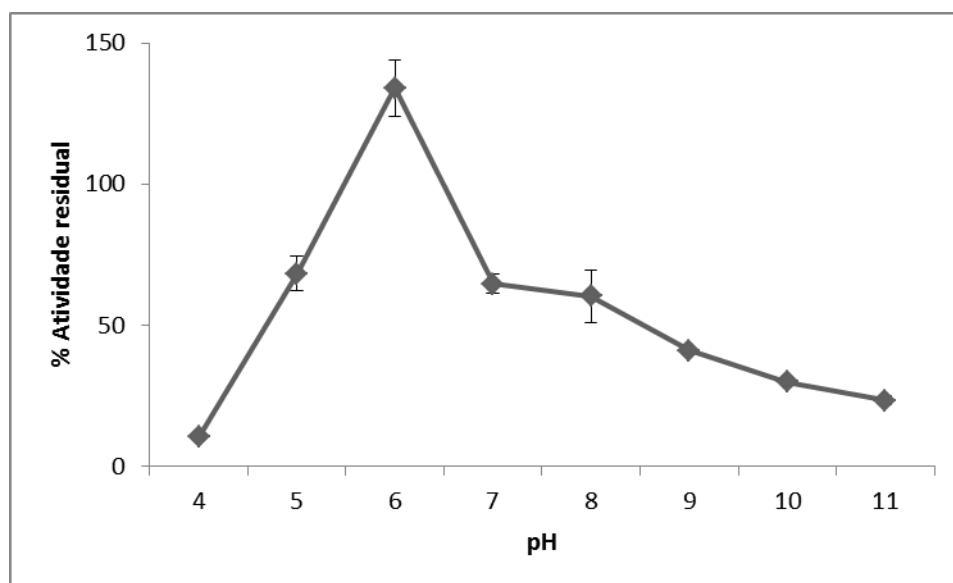


Figura 11 - efeito do pH na estabilidade da lipase de *C. gloeosporioides* no preparado enzimático

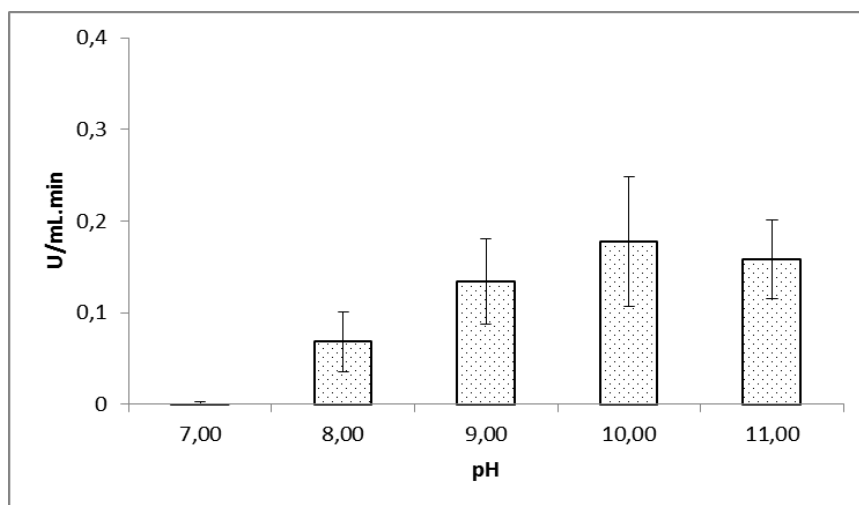


Figura 12 - Determinação do valor ótimo de pH da lipase de *C. gloeosporioides* no preparado enzimático

6.2.5 Estabilidade em solventes

A estabilidade da lipase em meio orgânico é importante para as reações de esterificação (ULKER e KARAOGLU, 2012) e foi avaliada em cinco solventes miscíveis em água (metanol, etanol, isopropanol, butan-1-ol e acetonitrila) em três concentrações (6, 30 e 50%, v/v) e o resultado pode ser visto na Tabela 1. A lipase de *C. gloeosporioides* exibiu

tolerância à baixas concentrações (6% v/v) de todos os solventes miscíveis em água (Tabela 1). Em altas concentrações, a enzima foi mais ativa em metanol (30% v/v) e butan-1-ol (50% v/v). Perda total da atividade foi observada quando a concentração de acetonitrila foi superior a 30% (v/v). Esta lipase também foi avaliada e provou ser tolerante a solventes imiscíveis em água, sendo estável em heptano e em hexano em todas as concentrações testadas, com maior atividade em heptano a 75% (v/v) (Tabela 1). Em tolueno e diclorometano, a enzima foi mais estável em baixa concentração (30% v/v), com perda total da atividade em tolueno a 50% (v/v). A estabilidade de lipase de *Mucor hiemalis f. hiemalis* em hexano e heptano já foi relatada anteriormente (HIOL *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Avaliação da estabilidade do preparado enzimático de *C. gloeosporioides* frente a diferentes solventes

Concentração (% v/v)	Atividade residual (%)			
	6	30	50	75
Metanol ^a	132,5	30,9	13,1	nd
Etanol ^a	143,1	28,1	5,6	nd
Isopropanol ^a	124,9	23,7	3,8	nd
butan-1-ol ^a	150,6	24,1	18,9	nd
Acetonitrila ^a	100,8	3,1	0,0	nd
Tolueno ^b	nd	223,5	5,4	0,0
Heptano ^b	nd	84,3	118,7	223,3
Diclorometano ^b	nd	85,5	80,6	57,1
Hexano ^b	nd	89,5	122,0	127,8

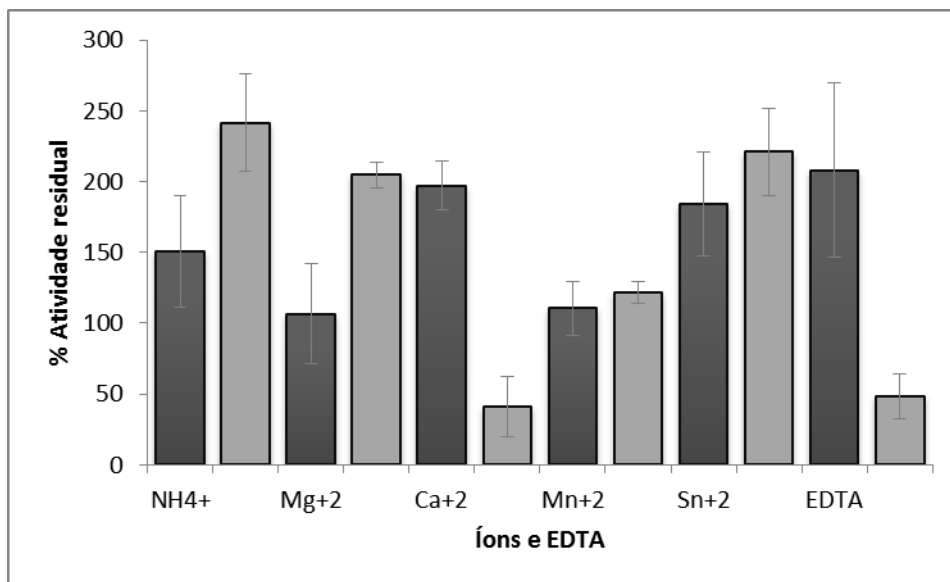
^a Solventes miscíveis com água ^b Solventes imiscíveis com água nd não determinado

6.2.6 Estabilidade em íons e EDTA

Componentes iônicos podem interferir na atividade e a estabilidade da lipase presente em um preparado enzimático. A lipase de *C. gloeosporioides* manteve-se estável em todas as soluções testadas a 1 mmol. L⁻¹ (Figura 13). Os íons NH₄⁺ e Sn²⁺ estimularam a atividade lipolítica nas duas concentrações analisadas (1 e 10 mmol. L⁻¹). Yu *et al.* (2013) mostraram que os níveis ideais de NH₄⁺ levam ao aumento da atividade lipolítica em *Rhizopus oryzae*. Esse aumento da atividade lipolítica na presença de NH₄⁺ também foi demonstrado por lipases de *Nomuraea rileyi* MJ (SUPAKDAMRONGKUL *et al.*, 2010).

O íon cálcio e o agente quelante EDTA afetaram a lipase de maneiras diferentes, aumentaram a atividade lipolítica em concentração mais baixa (1 mmol.L⁻¹) e induziram a perda de atividade lipolítica em 50% na concentração mais alta analisada (10 mmol.L⁻¹). Este efeito observado por EDTA sugere que a lipase de *C. gloeosporioides* pode ser dependente de íons divalentes.

Íons podem interferir com a atividade da enzima, agindo diretamente no sítio catalítico das mesmas (SUPAKDAMRONGKUL *et al.*, 2010). Eles também podem atuar no substrato, devido à formação de complexos entre íons metálicos e ácidos graxos ionizados, alterando sua solubilidade e modificando seu comportamento em uma interface óleo/água.



A cor cinza escuro representa a concentração de 1 mmol.L⁻¹ e a cor cinza claro representa 10 mmol.L⁻¹

Figura 13 - Avaliação da estabilidade do preparado enzimático de *C. gloeosporioides* frente a diferentes íons

6.3 Purificação parcial da lipase produzida por *C. gloeosporioides*

6.3.1 Purificação de baixa resolução

Devido à importância de se trabalhar com uma forma mais purificada da enzima buscou-se concentrar o material inicial. As estratégias testadas com este intuito foram eficientes na redução de volume. A precipitação com sulfato de amônio permitiu reduzir aumentar a concentração da atividade. A ultrafiltração com corte de 10 kDa converteu um volume inicial de preparado enzimático de 50 mL para 10 mL. Ambas as metodologias

conseguiram aumentar a atividade específica na ordem de 10 vezes, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação entre a ultrafiltração e a precipitação com sulfato de amônio

	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Fator de purificação
Preparado enzimático	0,09	0,19	0,47	1
Ultrafiltração 10 kDa	1,55	1,31	1,19	2,5
Precipitação com sulfato de amônio (P 25%)	1,69	1,39	1,21	2,6

P 25%: precipitado com 25% de sulfato de amônia.

A estratégia de concentração que utiliza sulfato de amônio é eficiente para precipitar sólidos em solução e gerar volumes muito menores do que o original. A precipitação de proteínas deve ser feita em condições brandas como repouso, armazenamento a 4 °C e utilizando uma concentração de sais que permita o máximo de precipitação com o cuidado de não interferir irreversivelmente na estrutura tridimensional da proteína. Além disso, após a operação, é necessário fazer uma diálise para alcançar uma condição iônica cabível para as etapas posteriores de purificação.

A precipitação utilizando sulfato de amônio na concentração de 25% do sal (p/v) forneceu um precipitado com maior atividade enzimática e levou a um aumento da concentração de proteínas e na atividade específica (Tabela 2). Utilizando a ultrafiltração, que consiste em filtração com membrana de poro de tamanho molecular em temperatura baixa, alcançaram-se resultados semelhantes de atividade enzimática e específica (Tabela 2). Sendo os resultados semelhantes e a ultrafiltração um procedimento mais barato e menos agressivo para a proteína, sem a necessidade de fazer um equilíbrio iônico, preferiu-se trabalhar com o material ultrafiltrado para facilitar a manipulação do material nas etapas posteriores.

6.3.2 Purificação de alta resolução

Após a escolha do material de partida, realizaram-se as duas estratégias de purificação de alta resolução. Na primeira, o material foi submetido à cromatografia de troca iônica. A dosagem da atividade enzimática das 56 frações obtidas revelou 25 frações com atividade enzimática, ou seja, ocorreu um espalhamento da atividade lipásica, demonstrando que a troca iônica não foi eficiente para purificar a enzima (Figura 14).

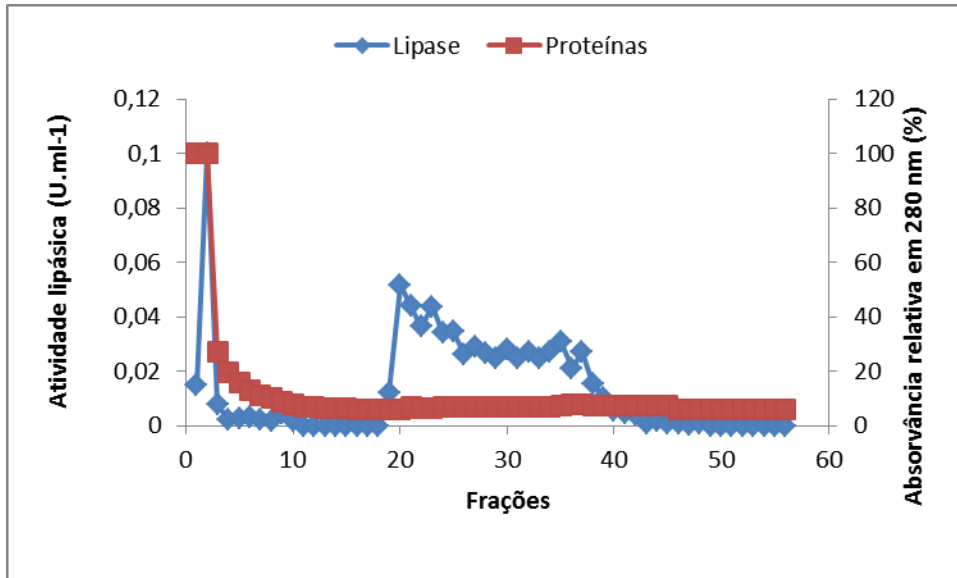


Figura 14 Cromatografia em coluna resource Q em equipamento FPLC

Na segunda estratégia adotada, o material passou por cromatografia de filtração em gel (Figura 15) e o *pool* de frações com atividade proveniente dessa cromatografia foi aplicado em uma cromatografia de afinidade em coluna com benzamidina (Figura 16). Oliveira (2000), trabalhando com *C. gloeosporioides*, também obteve dificuldades na eluição da enzima em coluna de troca iônica e deu seguimento à purificação da lipase deste micro-organismo por meio de cromatografia em gel (coluna Sephadex G-100), obtendo a purificação parcial da enzima.

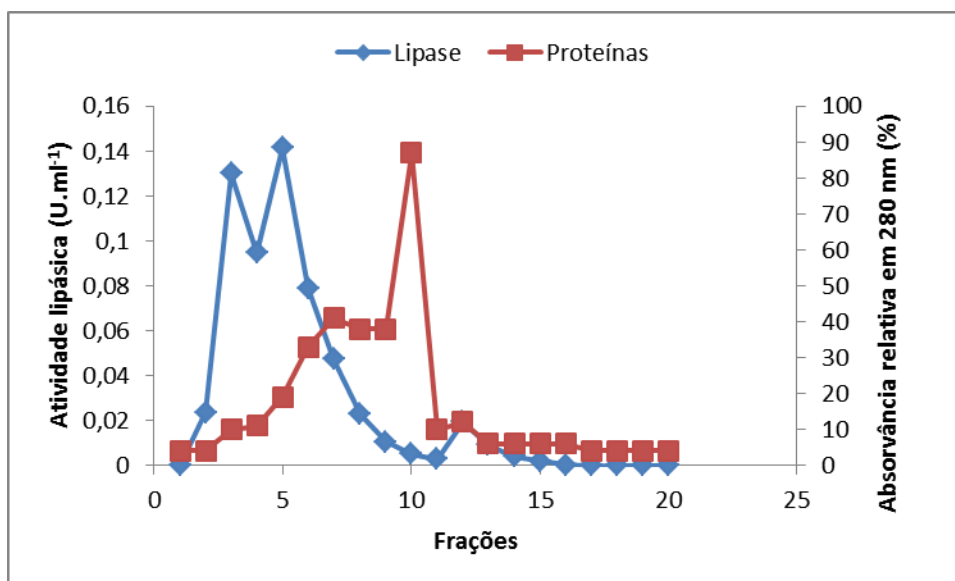


Figura 15 Cromatografia em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC

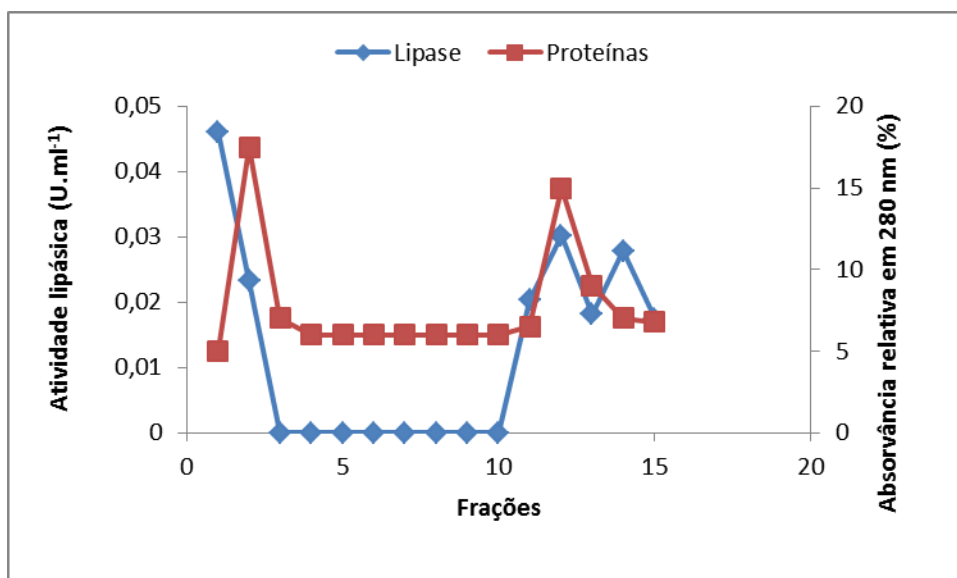


Figura 16 Cromatografia em coluna de benzamidina em equipamento FPLC

Essa estratégia apresentou menos frações com atividade enzimática, sendo mais eficiente na purificação da enzima. Os resultados das etapas dessa estratégia de purificação parcial da lipase são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Eficiência da purificação parcial da lipase

Etapas de purificação	Volume (mL)	Proteínas totais (mg)	Atividade total (U.mL ⁻¹)	Atividade específica total (U.mg ⁻¹)	Rendimento %	Fator de purificação
Ultrafiltração 10kDa	50	65,45	135,64	2,07	100,00	1,00
<i>Pool</i> da filtração em gel	10	17,00	52,00	3,06	38,34	1,48
FR1	2	0,87	36,83	42,50	27,15	20,51
FR2	2	1,01	20,25	20,10	14,93	9,70
FR11	2	3,06	18,08	5,90	13,33	2,85
FR12	2	2,26	25,36	11,24	18,69	5,42
FR13	2	0,79	16,49	20,84	12,15	10,06
FR14	2	0,39	23,61	60,98	17,41	29,43
FR15	2	0,30	15,99	53,10	11,79	25,62

FR1, 2, 11, 12, 13, 14 e 15 correspondem às frações parcialmente purificadas obtidas após a cromatografia de filtração em gel, seguida por cromatografia de afinidade

A fração 1, proveniente da coluna com benzamidina (Figura 16), alcançou a melhor combinação rendimento/fator de purificação, tendo recuperação de 27,15 % da atividade lipolítica e fator de purificação alto (20,51) (Tabela 3). Esses resultados são superiores aos de Oliveira (2000) que alcançou um fator de purificação de apenas 8,1, sugerindo que a cromatografia de afinidade com coluna de benzamidina é eficiente como etapa complementar da filtração em gel.

A purificação parcial da enzima pode ser acompanhada na Figura 17, onde se observa o resultado de uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), com coloração pela prata. As frações com atividade enzimática obtidas da cromatografia de afinidade (1, 2, 11, 12, 13, 14 e 15) não estão totalmente puras, mas possuem menor número de bandas do que o material das etapas iniciais (preparado enzimático, ultrafiltração e gel filtração), demonstrando uma purificação parcial.

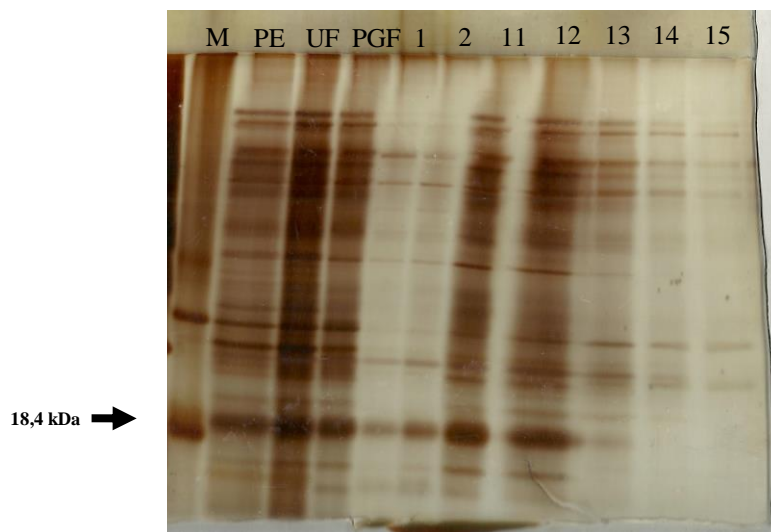


Figura 17 - Etapas da purificação parcial da lipase por SDS-PAGE com coloração de prata

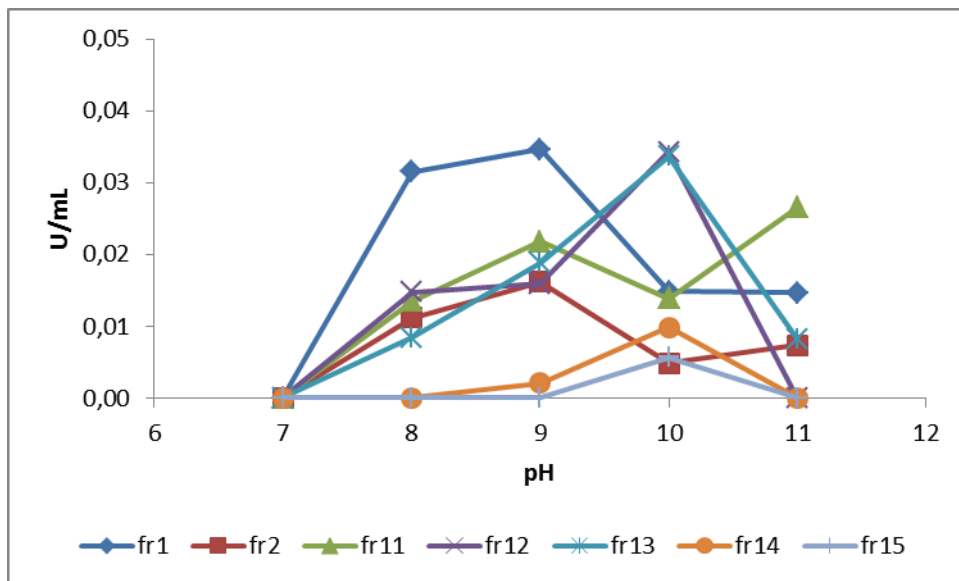
M marcador de massa molecular, PE preparado enzimático, UF ultrafiltrado 10kDa, GF gel filtração, 1, 2 e 11-15 são frações obtidas da cromatografia de afinidade. A seta indica no gel corado com prata a banda com atividade lipolítica ao longo das etapas de purificação.

Conforme demonstrado no zimograma da Figura 6 (página 53), a massa molecular da enzima com atividade lipolítica apresentou aproximadamente 18 kDa. Esse dado está de acordo com os dados de Chen *et al.* (2007), os quais já haviam previamente relatado a

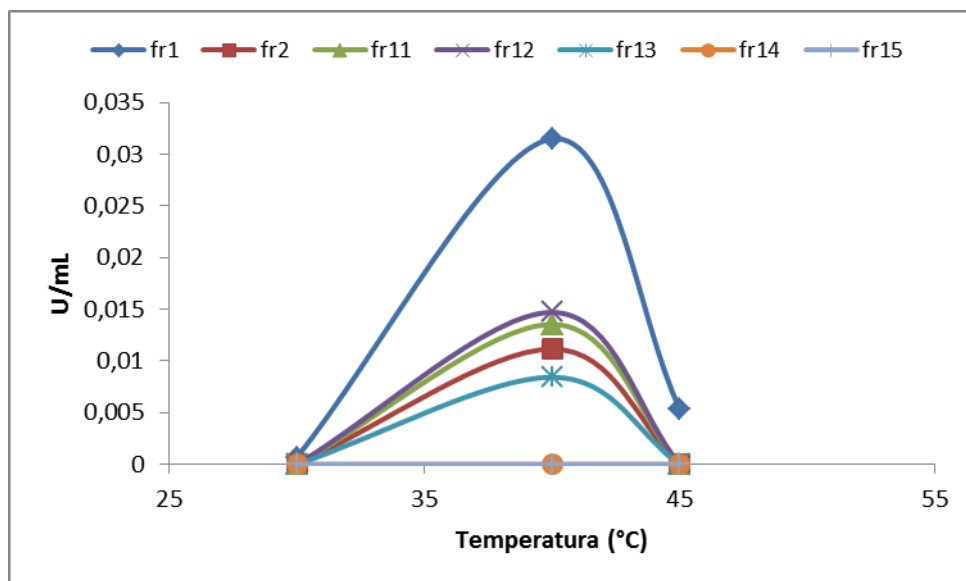
presença de enzima lipolítica (cutinases) em *C. gloeosporioides* com massa molecular similar, 21kDa.

6.3.3 Caracterização das frações parcialmente purificadas

Sete frações provenientes da cromatografia de afinidade possuíam atividade enzimática (1, 2, 11, 12, 13, 14 e 15) e foram caracterizadas quanto ao valor de pH (Figura 18) e temperatura (Figura 19) ótimos de ação.



FiFigura 18 - Caracterização do valor ótimo de pH das frações parcialmente purificadas (1, 2, 11-15) da lipase de *C. gloeosporioides*



FiFigura 19 - Caracterização do valor ótimo de temperatura das frações parcialmente purificadas da lipase de *C. gloeosporioides*

Quanto ao valor ótimo de pH, observou-se comportamentos diferentes das frações provenientes da cromatografia de afinidade. As frações 1, 2 e 11 (Figura 16) tiveram maior atividade entre pH 8 e 9, enquanto as frações 12-15 (Figura 16) foram mais ativas em pH 10. Com exceção da fração 11, todas as enzimas tiveram sua ação catalítica consideravelmente diminuída nos pH extremos testados (7 e 11). A temperatura ótima de 40 °C foi observada para as frações 1, 2, 11, 12 e 13 provenientes da cromatografia de afinidade (Figura 16). Para as frações 14 e 15 não foi possível estabelecer a temperatura ótima, pois, não apresentaram atividade nas temperaturas testadas.

Esta avaliação inicial das frações permite supor que mais de uma forma da lipase tenha sido produzida pelo fungo nas condições empregadas. Apesar da presença de enzimas, sob formas múltiplas, trazer benefícios para o micro-organismo, por favorecer a adaptação e competição em ambientes naturais em mudanças constantes, a presença delas em formulações enzimáticas brutas dificulta o processo de purificação (OLIVEIRA, 2000).

6.4 Aplicações da lipase produzida por *C. gloeosporioides*

6.4.1 Atividade hidrolítica de lipase produzida por *C. gloeosporioides*

A ação hidrolítica da lipase de *C. gloeosporioides* foi avaliada sobre 15 diferentes óleos vegetais e uma gordura animal (tutano de boi). A enzima foi capaz de hidrolisar todos os substratos testados, com diferentes rendimentos. Os maiores graus de hidrólise foram observados usando óleo de oliva (100 % - 18,0 IU), soja (98,9 % - 17,8 IU), canola (88,4 % - 15,9 IU) e amêndoas (88,4 % - 15,9 IU) e os menores graus de hidrólise foram detectados quando linhaça (46,3 % - 8,3 IU), mamona (36,8 % - 6,6 IU) e babosa (32,6 % - 5,9 IU) foram usadas como substrato (Tabela 4). Esses resultados mostram que a lipase de *C. gloeosporioides* têm ação sobre diferentes substratos, corroborando com a literatura para lipases de outras fontes (CHEN *et al.*, 2007; BALAJI e EBENEZER, 2008).

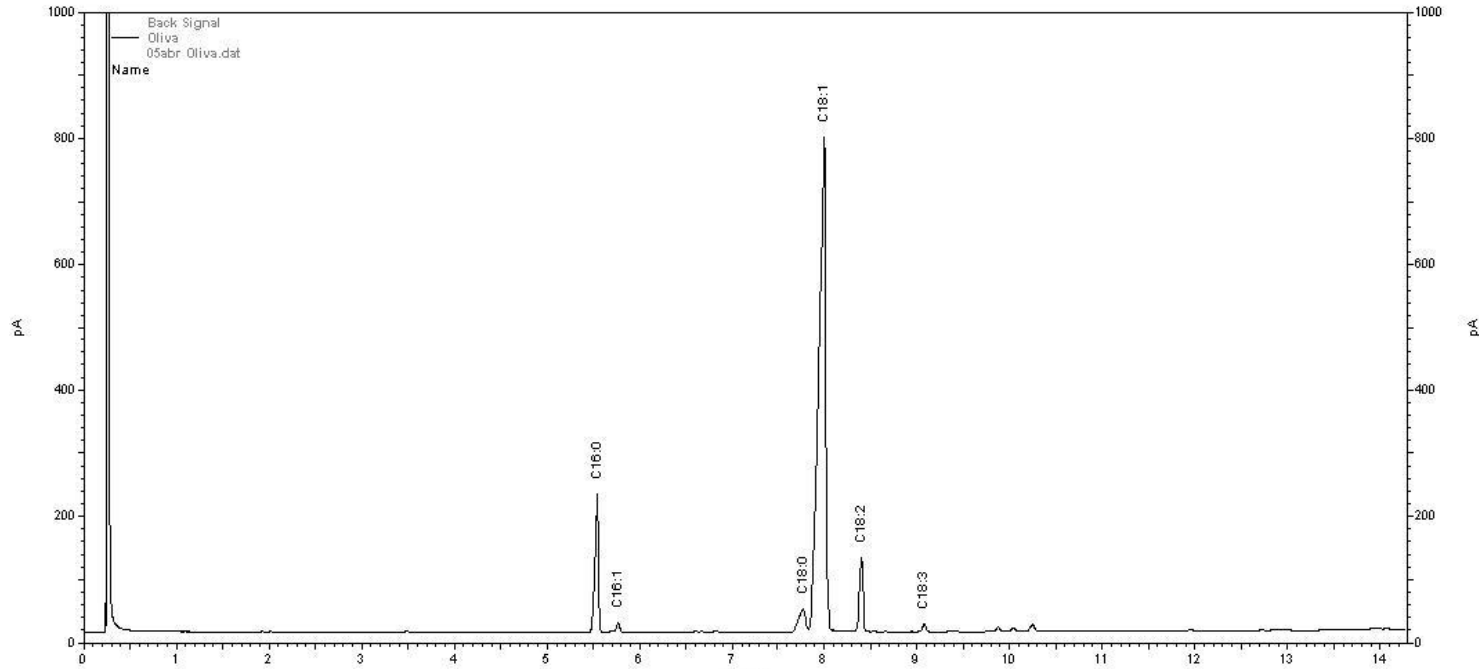
Tabela 4 - Atividade hidrolítica de lipase de *C. gloeosporioides* sobre diferentes substratos lipídicos

Óleos	Hidrólise (%)		Aividade hidrolítica (U/mL preparado enzimático)		
		dp		dp	*
Oliva	100,0	3,6	18,0	0,7	a
Soja	98,9	6,6	17,8	1,2	a
Canola	88,4	13,8	15,9	2,5	ab
Amendoas	88,4	0,0	15,9	0,0	ab
Soja residual	87,4	9,6	15,7	1,7	ab
Tutano	84,2	3,6	15,1	0,7	ab
Girassol	84,2	7,9	15,1	1,4	ab
Cacau	80,0	1,8	14,4	0,3	bc
Gergelim torrado	77,9	3,6	14,0	0,7	bc
Dendê	74,7	6,6	13,4	1,2	bc
Alho	71,6	4,8	12,9	0,9	bc
Amendoim	71,6	3,6	12,9	0,7	bc
Milho	65,3	4,8	11,7	0,9	c
Linhaça	46,3	3,6	8,3	0,7	d
Mamona	36,8	1,8	6,6	0,3	d
Babosa	32,6	1,8	5,9	0,3	d

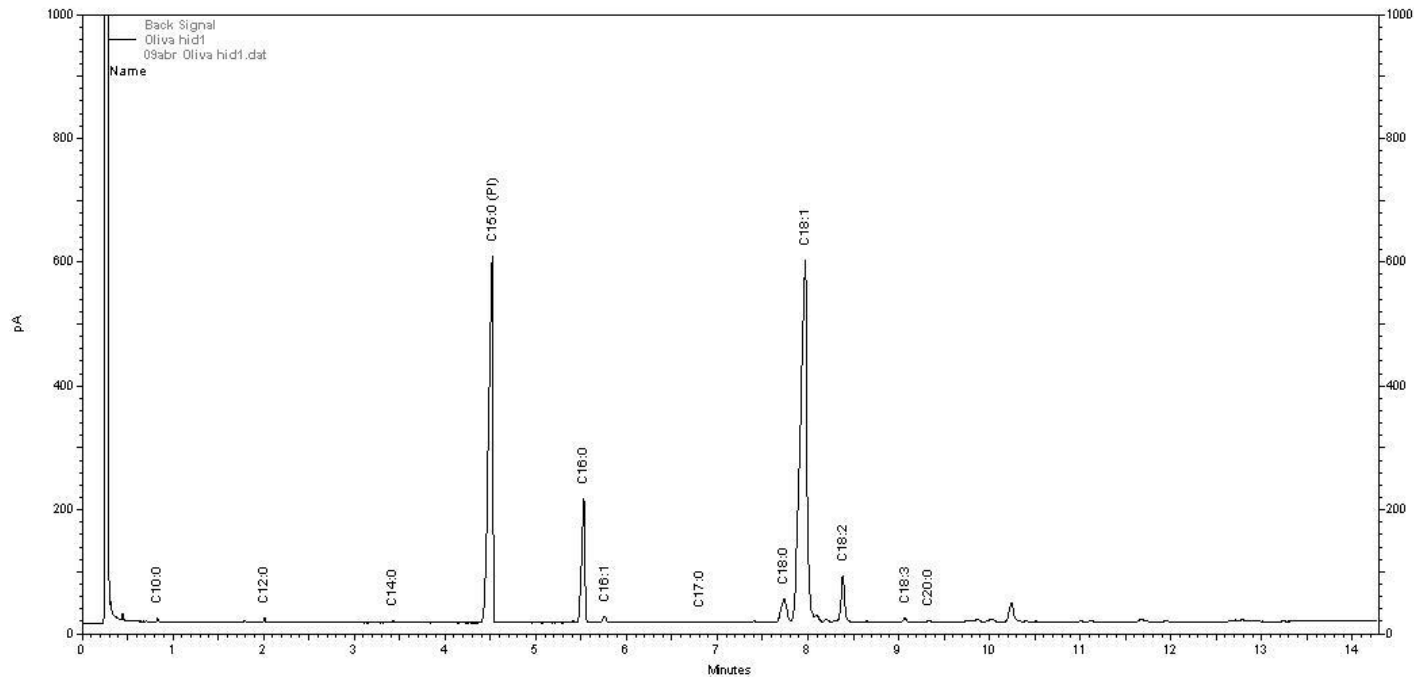
* letras diferentes representam diferença estatística significativa com 95% de confiança; dp é o desvio padrão

Foram obtidos os perfis dos óleos utilizados neste estudo, por hidrólise química, e, após a hidrólise enzimática utilizando preparado enzimático de *Colletotrichum gloeosporioides*. O perfil de ácidos graxos dos óleos após ação de lipase de *C. gloeosporioides* foi muito similar ao perfil de ácidos graxos dos óleos (hidrólise química), como pode ser visto nos cromatogramas do óleo de soja (Figura 20 na página 67) e nos resultados dos demais óleos na Tabela 5 (página 68 e 69), salientando a capacidade hidrolítica dessa enzima e sua aplicabilidade em produzir concentrados de ácidos graxos a partir de substratos vegetais. Nos perfis dos óleos e hidrolisados percebeu-se uma maior concentração de ácidos graxos insaturados e com cadeias longas (Tabela 5, na página 68 e 69).

(a)

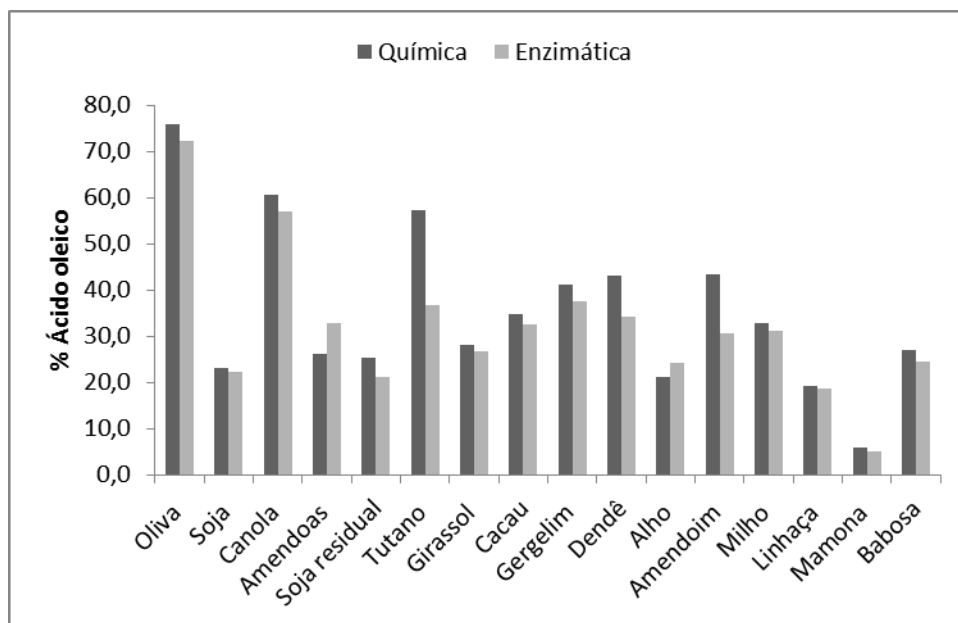


(b)

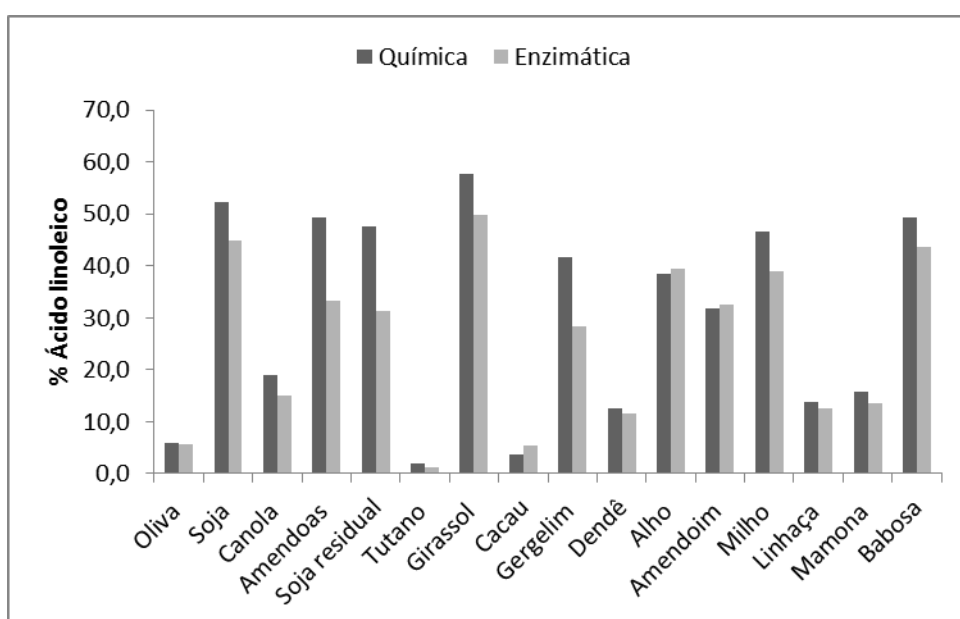


FiFigura 20 Perfil de ácidos graxos do óleo de soja obtidos após hidrólise química (a) e enzimática (b) com lipase de *C. gloeosporioides*

Entretanto, uma parte dos ácidos oleico (Figura 21) e linoleico (Figura 22), presentes nos triglicerídeos não foram convertidos em ácidos graxos livres através da ação da lipase. No ácido oleico, ocorreram as maiores diferenças entre a % de ácido oleico do substrato e do hidrolisado ($[\% \text{ de hidrólise química} - \% \text{ de hidrólise enzimática}] * 100 / \% \text{ de hidrólise química}$) em óleo de tutano (35,5 %), amendoim (29,6 %), dendê (21,1 %) e mamona (17,2 %). Quanto ao ácido linoleico isso foi observado nos óleos de tutano (38,6 %), soja residual (34,4 %), amêndoas (32,5 %) e gergelim (31,6 %).



FiFigura 21 - Concentração de C18:1 (ômega 9, ácido oleico) gerada por hidrólise química e enzimática usando lipase de *C. gloeosporioides*, em diferentes óleos



FiFigura 22 - Análise da concentração de C18:2 (ômega 6, ácido linoleico) gerada por hidrólise química e enzimática usando lipase de *C. gloeosporioides*, em diferentes óleos

6.4.2 Atividade de transesterificação

Observou-se que a lipase de *C. gloeosporioides* foi capaz de realizar transesterificação em meio orgânico (hexano) (Figura 23), mostrando maior atividade em álcoois de cadeia curta. A transesterificação com maior rendimento ocorreu quando foi utilizado propanol ($5,4 \cdot 10^{-3} \text{ U.kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e o menor rendimento ocorreu quando foram usados butan-1-ol e dodecanol. A enzima usada mostrou maior predileção por álcoois de cadeia de até três carbonos, em reações de transesterificação. Essa característica é interessante uma vez que outras lipases, tais como as obtidas de *Aspergillus niger* mostraram, ao contrário, maiores atividades de esterificação quando se usava pentanol em vez de metanol e etanol em reações com o ácido láurico (MISTRANTA *et al.*, 1993).

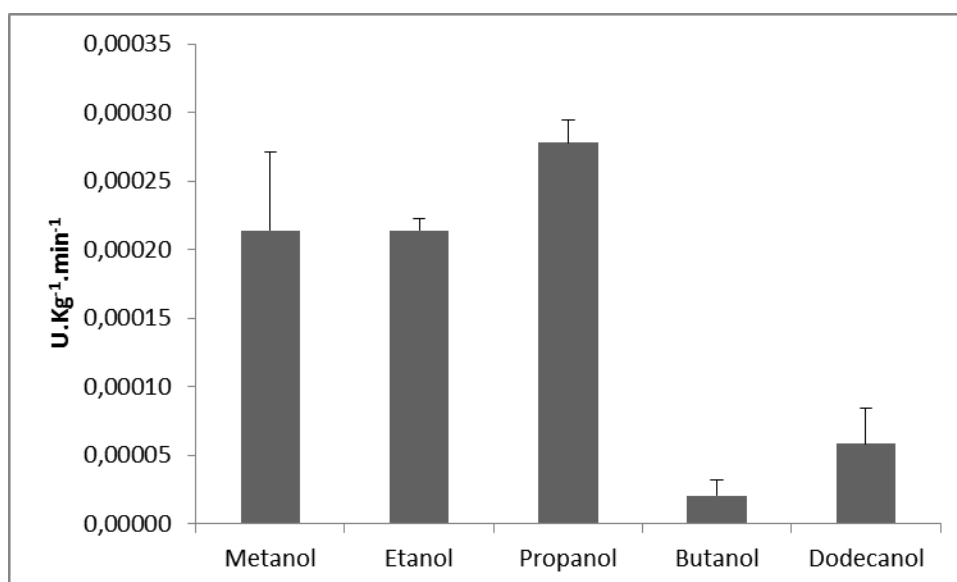


Figura 23 - Atividade de transesterificação da lipase de *C. gloeosporioides* com álcoois

Não há diferença significativa entre metanol e etanol como substrato dessa reação, assim como entre butan-1-ol e dodecanol. Os demais são significativamente diferentes, para um $\alpha = 0,05 \%$.

6.4.3 Atividade de esterificação

A capacidade da lipase de *C. gloeosporioides* em reação de esterificação foi avaliada também na síntese do butirato de butila e do acetato de butila (ésteres utilizados na indústria alimentar para produzir, por exemplo, flavorizantes com aroma de abacaxi) e oleato de butila

(aditivo de biodiesel). Foram realizados experimentos de esterificação por 24 h, com a razão molar álcool/ácido 1:1 em heptano, na ausência de água. As quantidades de butirato de butila, acetato de butila e oleato de butila sintetizadas foram 70, 14 e 40%, respectivamente (Figura 24). Bayramoglu *et al.* (2011) mostraram um rendimento de 42,6% da síntese de butirato de butila usando lipase de *Mucor miehei*, em condições semelhantes.

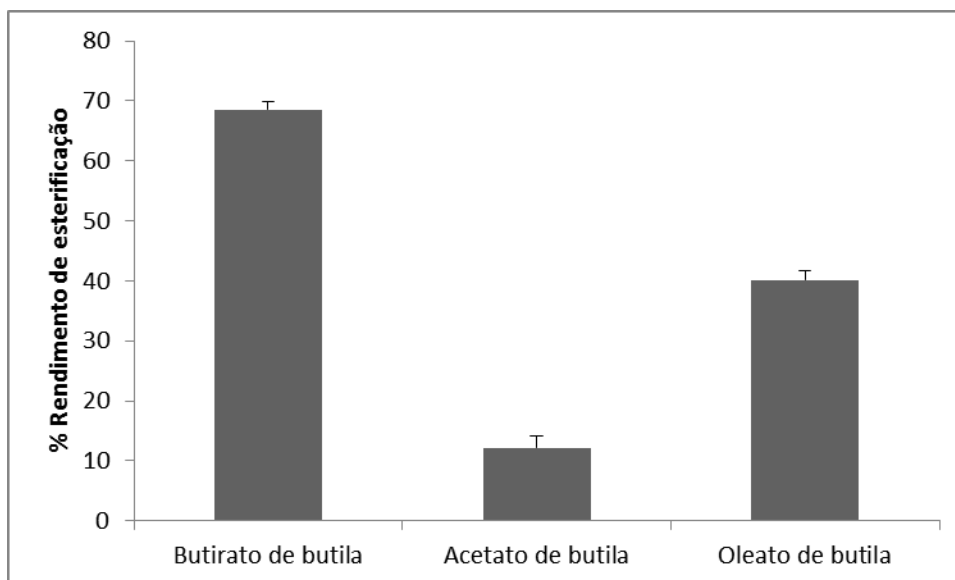


Figura 24 - Atividade de esterificação lipase de *C. gloeosporioides*

7. DISCUSSÃO

As enzimas dos micro-organismos desempenham um importante papel na utilização das fontes de carbono, facilitando a sobrevivência microbiana até em ambientes mais inóspitos (ABRANCHES *et al.*, 1997). *C. gloeosporioides* tem reconhecida atividade lipolítica (COLEN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; BALAJI e EBENEZER, 2008). No presente trabalho, este fungo produziu um preparado enzimático contendo alta atividade lipolítica, obtida por fermentação em substrato líquido. Essa lipase do preparado enzimático apresentou estabilidade térmica por muito tempo em sua temperatura ótima. Esta longa estabilidade é interessante, pois certas aplicações de lipase implicam em processos longos que demandam enzimas estáveis. A lipase apresentou melhor estabilidade em pH 6, semelhante ao que foi observado para lipase de *Mucor griseocyanus* (COCA e DUSTET, 2006), mas foi ativa em uma ampla faixa de pH, com predileção por condições levemente alcalinas (pH 8, 9, 10 11), corroborando com outros estudos, os quais descrevem outras enzimas alcalinas produzidas por essa espécie (DUNAEVSKY *et al.*, 2007). O pH ótimo alcalino (cerca de 9-10) já foi previamente descrito para enzimas lipolíticas de *C. gloeosporioides* (DICKMAN *et al.*, 1982),

Colletotrichum lagenarium (BONNEN e HAMMERSCHMIDT, 1989) e *Fusarium solani f. pisi*. (PURDY e KOLATTUKUDY, 1975).

Lipases estáveis abaixo de 60 °C, com tolerância a meio alcalino, são interessantes para aplicações na indústria de formulações detergentes (SANGEETHA *et al.*, 2010) porque as enzimas usadas nessas indústrias precisam ser ativas e estáveis nas condições alcalinas de lavagem. A compatibilidade com agentes oxidantes e surfactantes e capacidade de agir sobre uma grande diversidade de substratos, também são características importantes para uso de lipases nessa indústria (JELLOULI *et al.*, 2011; CHAUHAN *et al.*, 2013). A ação sobre diferentes substratos aumenta a efetividade da enzima sobre manchas de diferentes origens. Os resultados do presente trabalho demonstraram indícios de aplicabilidade da lipase de *C. gloeosporioides*, em formulações detergentes, uma vez que esta apresentou atuação em uma diversidade de materiais graxos (16 óleos) além da capacidade de tolerar pH alcalino e estabilidade térmica até 60 °C.

A lipase de *C. gloeosporioides* catalisou reações de hidrólise, transesterificação e esterificação. Foi capaz de hidrolisar substratos oleaginosos com uma diversa composição de triglicerídeos (tanto em relação ao tamanho da cadeia quanto ao grau de saturação). A lipase de *C. gloeosporioides* mostrou atividade sobre um bom espectro de substratos, corroborando com relatos anteriores de Colen *et al.* (2006). Outras lipases de fungo também foram descritas como capazes de aceitar diversidade de substratos, como uma lipase de *Rhizopus oryzae* (HIOL *et al.*, 2000). Esses resultados permitem sugerir que diferentes óleos poderiam ser utilizados como fonte de carbono e energia, para o cultivo de *C. gloeosporioides*, como óleo residual de soja. Isso poderia reduzir a concentração de componentes tradicionais de meios de cultivo, que são mais caros. De acordo com Abdelmoez *et al.* (2013) e Salihu *et al.* (2012), a bioconversão de resíduos, da agricultura por exemplo, na produção de lipase e outros produtos será cada vez mais uma prioridade dentro da biotecnologia.

Lipases obtidas de fungos distintos apresentam preferências por substratos diferentes. Penci *et al.* (2010), utilizando uma fosfolipase comercial de *Aspergillus oryzae* também obteve maior rendimento de hidrólise sobre óleo de soja do que óleo de girassol. Os valores de hidrólise encontrados no presente trabalho foram altos comparados com a literatura. Freitas *et al.* (2007), por exemplo, mostraram rendimentos de hidrólise sobre óleo de soja inferiores usando preparado enzimático bruto comercial contendo lipase de *Candida rugosa* e *Thermomyces lanuginosa* (70 e 50 % de hidrólise, respectivamente).

Na indústria oleoquímica, lipases têm sido utilizadas para a produção de ácidos graxos a partir da sua ação catalítica sobre matérias-primas de fontes renováveis como óleos naturais e gorduras (MURTY *et al.*, 2002) tais como óleo de girassol, coco, milho, oliva, farelo de arroz,

bem como sebo e tutano. O tipo de ácidos graxos obtido depende da composição do óleo natural e da especificidade da enzima. O perfil de ácidos graxos encontrado nos óleos estudados é condizente com a tabela de composição de alimentos brasileira (TACO) (TABELA, 2006) para azeite de oliva e de dendê (oleico, palmítico, linoleico), para semente de amendoim (oleico, linoleico, palmítico), para soja, girassol, gergelim e milho (linoleico, oleico, palmítico), canola (oleico, linoleico, α -linolenico) e semente de linhaça (α -linolenico, oleico, linoleico). O óleo de amêndoas apresentou como ácidos graxos principais o linoleico, oleico e palmítico, similar ao encontrado por Maestri *et al.* (2015) em amêndoas argentinas, enquanto que a manteiga de cacau apresentou ácido oleico, esteárico e palmítico, similar ao relatado por Lipp e Anklam (1998) para manteiga de cacau brasileiro. Os principais ácidos graxos detectados em tutano foram ácido oleico e palmítico, similar ao relatado por Abd-El-Aal e Mohamed (1989) para tutano de boi.

Segundo Nelson e Cox (2014), o ômega 3 (como α -linolênico C18:3) e ômega 6 (como o linoleico C18:2) são ácidos graxos essenciais para humanos porque seu metabolismo é incapaz de formar as ligações duplas nas posições ômega 3 e 6 da cadeia carbônica e então, toda a fonte desses nutrientes é proveniente da alimentação. O ômega 9 (como o ácido oleico C18:1) também é essencial, mas pode ser sintetizado se houver reservas corporais de ômega 3 e 6. Nesse contexto, o uso de lipase de *C. gloeosporioides* sobre os substratos escolhidos foi eficiente em gerar concentrados de ácidos graxos essenciais.

No presente trabalho, a capacidade de liberação dos ácidos graxos da lipase parece não estar relacionada ao tipo de ácido, uma vez que o mesmo ácido graxo em diferentes substratos teve diferentes taxas de conversão em ácido graxo livre. Isso pode estar relacionado à posição que esses ácidos graxos ocupam no esqueleto do triglicerídeo dos óleos escolhidos, uma vez que um ácido graxo pode estar na posição 1,3 ou na posição 2 do triglicerídeo e cada lipase têm especificidade por uma posição diferente. Segundo Sharma *et al.* (2013) lipases de diferentes fontes microbianas, plantas ou animais podem ter especificidade diversa em relação a hidrólise de um mesmo óleo e que algumas podem ser não específicas, e outras podem ser específicas (posição 2 ou 1, 3), dependendo dos aminoácidos que compõe o seu sítio ativo. Shimada *et al.* (1997), por exemplo, relataram uma lipase de *Rhizopus delemar* específica para a posição 1,3 do triglicerídeo.

A hidrólise enzimática tem a vantagem de não ser tão extrema como a hidrólise química, pois ocorre sob condição amena de pressão e temperatura (ABDELMOEZ *et al.*, 2013). Além disso, por meio da especificidade das enzimas, podem ser gerados além de ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos importantes. Estes últimos têm propriedades emulsificantes e, por serem menores que os triglicerídeos, são tão assimiláveis pelo organismo humano no intestino

delgado quanto os ácidos graxos livres, porém com mais resistência à deterioração oxidativa (CARVALHO *et al.*, 2009).

O óleo de soja residual, proveniente de sobras domésticas, possui grande concentração de ácidos graxos livres, os quais podem ter potencial para desestabilizar a estrutura enzimática. A lipase de *C. gloeosporioides* mostrou-se estável nesse substrato e promoveu sua hidrólise com grande rendimento (87,6%). Essa estabilidade e bom rendimento indicam características dessa enzima interessantes para a produção de biodiesel sobre fontes de óleos residuais. Além disso, a lipase de *C. gloeosporioides* apresentou notável estabilidade em solventes imiscíveis com água, bem como uma boa tolerância a baixas concentrações de solventes miscíveis com água, características de interesse de indústrias que demandam reações de esterificação e transesterificação em meio orgânico, tais como síntese de ésteres de aroma e produção de biodiesel.

Lipases podem realizar reações de esterificação em meios com baixo conteúdo de água (SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012). Solventes orgânicos imiscíveis com água são meios de reação preferenciais nesses casos, pois permitem maior solubilidade dos substratos. Ao contrário de solventes miscíveis, eles não contribuem para o desaparecimento da camada aquosa, que é fundamental para o correto dobramento e estabilidade da enzima (TAMALAMPUDI *et al.*, 2007). Os solventes miscíveis com água tais como álcoois de cadeia curta, por sua vez, são substratos comuns em reações de esterificação mediada por lipase (MUSTRANTA *et al.*, 1993; TAN *et al.*, 1996). Assim, estabilidade destas enzimas frente a solventes miscíveis com água também é necessária para um desempenho eficiente destes catalisadores.

O preparado enzimático contendo enzima lipolítica de *C. gloeosporioides* foi capaz de realizar transesterificação entre o palmitato e os diferentes álcoois usados, sendo que o processo teve maior rendimento quando foram usados álcoois de cadeia curta (metanol, etanol e propanol). Usando o mesmo protocolo, Teng e Xu (2007) relataram alta taxa de transesterificação (70 % de rendimento) do etanol em ésteres etílicos pela lipase produzida por *Penicillium sp.* Goujard *et al.* (2009) também demonstraram, a partir do mesmo protocolo, a transesterificação entre etanol e ácido palmítico ($560 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) por lipases comerciais parcialmente purificadas. Os rendimentos mais baixos encontrados no presente trabalho (máximo de $0,0004\text{U.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em relação aos dados da literatura citada, podem ser devido ao uso, no presente trabalho, de um preparado enzimático, enquanto os trabalhos de Teng e Xu (2007) e Goujard *et al.* (2009), os quais obtiveram rendimentos mais proeminentes, usaram lipases parcialmente purificadas.

O preparado enzimático contendo enzima lipolítica de *C. gloeosporioides* mostrou capacidade de sintetizar ésteres, com particular eficiência na síntese de butirato de butila, alcançando alta taxa de conversão. Esses resultados permitem indicar seu potencial para a síntese de ésteres como agentes do *flavor* na indústria de alimentos. Esterificações conduzidas por outras lipases microbianas já foram descritas por Tan *et al.* (1996), os quais aplicaram lipase de *Pseudomonas* na síntese de octanoato de butila, um éster com aroma Frutal. Weber *et al.* (2001 e 2002), usaram lipase de *Candida rugosa* na esterificação de fitoesteróis com ácidos graxos, para os quais sugere-se o uso como aditivos em alimentos.

8. CONCLUSÃO

C. gloeosporioides apresentou-se um bom produtor de lipase nas condições de fermentação em substrato líquido e um acompanhamento por 96 h sugeriu que a lipase secretada está associada ao crescimento do fungo. O tempo de produção máxima da enzima ocorreu em 48 h de fermentação. As técnicas empregadas foram suficientes para purificar parcialmente e caracterizar a enzima produzida pelo fungo *C. gloeosporioides* e a técnica de zimograma aplicada foi muito eficiente na detecção da banda com atividade lipolítica e foi imprescindível para estimar a massa molecular da lipase de cerca de 18 kDa.

A lipase contida no preparado enzimático produzido por *C. gloeosporioides* foi estável em diferentes sais e solventes miscíveis e imiscíveis com água, apresentou estabilidade térmica em até 60 °C e em ampla faixa de pH, com melhor atividade em meio alcalino.

A lipase contida no preparado enzimático promoveu tanto reações de hidrólise quanto transesterificação e esterificação com versatilidade sobre diferentes substratos. Na hidrólise, a lipase foi capaz de gerar concentrados de ácidos graxos essenciais e obtiveram-se maiores rendimentos quando óleo de oliva, soja, canola e amêndoas foram usados como substrato.

Observou-se a capacidade de esterificação da lipase contida no preparado enzimático e foram obtidos bons rendimentos de butirato de butila, o qual tem aroma de abacaxi e é utilizado na indústria de alimento.

Os resultados permitiram sugerir que a lipase de *C. gloeosporioides* têm características favoráveis para aplicação na indústria de detergentes, na produção de concentrados de ácidos graxos e em processos de produção de ésteres aplicados como *flavor* na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ABD-EL-AAL, M. H.; MOHAMED, M. S. A comparative study on bone fats from different species of animals. **Food Chemistry**, v. 31, p. 93-103. 1989.
- ABDELMOEZ, W.; MOSTAFA, N. A.; MUSTAFA, A. Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 59, p. 290-297. 2013.
- ABRANCHES, J.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER A. N. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 328-336. 1997.
- ANNIS, S. L.; GOODWIN, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 1-14. 1997.
- ARAVIDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 141-158. 2007.
- AVELAR, M. H. M.; CASSIMIRO, D. M. J.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 452-458. 2013.
- BALAJI, V.; EBENEZER, P. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 7, p. 1-8. 2008.
- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29. 2010.
- BAYRAMOGLU, G.; KARAGOZ, B.; ALTINTAS, B.; ARICA, M. Y.; BICAK, N. Poly(styrene – divinylbenzene) beads surface functionalized with di-block polymer grafting and multi-modal ligand attachment: performance of reversibly immobilized lipase in ester synthesis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 735-746. 2011.
- BONNEN, A. M.; HAMMERSCHMIDT, R. Cutinolytic enzymes from *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 35, p. 463-474. 1989.
- BOSE, A.; KEHARIA, H. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 255-266. 2013.
- BOU ALI, M.; BEN ALI, Y.; KARRAY, A.; FENDRI, A.; GARGOURI, Y. Purification and characterization of the first bird pancreatic lipase expressed in *Pichia pastoris*: the turkey. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 24. 2011.

BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye release. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254. 1976.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; DE OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; DA SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80. 2009.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further Researches. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 181-184. 1967.

CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRIGUEZ-GOMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654. 2005.

CHAUHAN, M.; CHAUHAN, R. S.; GARLAPATI, V. K. Evaluation of a new lipase from *Staphylococcus* sp. for detergent additive capability. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1-6. 2013.

CHEN, Z.; FRANCO, C. F.; BAPTISTA, R. P.; CABRAL, J. M. S.; COELHO, A. V.; RODRIGUES JR, C. J.; MELO, E. P. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1306-1313. 2007.

CHRISTIE, W. W. Gas Chromatography and Lipids: a practical guide. Dundee: The oily press, 1989. 500p.

COCA, J.; DUSTET, J. C. Expression and characterization of lipase produced by *mucor griseocyanus*. **Bioteconología Aplicada**, v. 23, n. 3, p. 224-228. 2006.

COELHO, A. D.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; MENDES, A. A. Produção de concentrados de ácidos graxos por hidrólise de óleos vegetais mediada por lipase vegetal. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1164-1169. 2013.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 881-885. 2006.

CORREA, T. L. R.; ZUBIETA, M. P.; TEIXEIRA, J. A.; DE QUEIROZ, M. V.; DE ARAÚJO, E. F. Carboxyl ester hydrolase from *Penicillium expansum*: cloning, characterization and overproduction by *Penicillium griseoroseum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 114-24. 2013.

DAIHA, K. G.; ANGELI, R.; DE OLIVEIRA, S. D.; ALMEIDA, R. V. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0131624. 2015.

DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 333-347. 1982.

DRORI, N.; KRAMER-HAIMOVICH, H.; ROLLINS, J.; DINOOR, A.; OKON, Y.; PINES, O.; PRUSKY, D. External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3258-3262. 2003.

DUNAEVSKY, Y. E.; MATVEEVA, A. R.; BELIAKOVA, G. A.; DOMASH, V. I.; BELOZERSKY, M. A. Extracellular alkaline proteinase of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biochemistry (Moscow)**, v.72, n.3, p.345-50, mar. 2007.

DYER, J. M.; STYMNE, S.; GREEN, A. G.; CARLSSON, A. S. High-value oils from plants. **The Plant Journal**, v. 54, p. 640-655. 2008.

EN14103:2003; Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl esters contents, European Committee for Standardization: Brussels, 2003.

ETTINGER, W. F.; THUKRAL, S. K.; KOLATTUKUDY, P. E. Structure of cutinase gene, cDNA, and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. **Biochemistry**, v. 26, p. 7883-7892. 1987.

FAOSTAT (2013) ProdSTAT: Crops. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FERNANDES, A. R. M; SAMPAIO, A. A. M.; HENRIQUE, W.; TULLIO, R.R.; DE OLIVEIRA, E. A.; DA SILVA, T. M. Composição química e perfil de ácidos graxos da carne de bovinos de diferentes condições sexuais recebendo silagem de milho e concentrado ou cana-de-açúcar e concentrado contendo grãos de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 4, p. 705-712. 2009.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V.H; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1725-1731. 2007.

GOUJARD, L.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; LECOMTE, J.; PINA, M.; CLAUDE, S.; LE PETIT, J.; FERRÉ, E. A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 161-7. 2009.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 1-21. 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.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAUA, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421-430. 2000.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipase and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1, p. 155-170. 2004.

HUANG, H.; WU, Z.; TIAN, C.; LIANG, Y.; YOU, C.; CHEN, L. Identification and characterization of the endophytic bacterium *Bacillus atrophaeus* XW2, antagonistic towards *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 1361-1371. 2015.

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.

JELLOULI, K.; GHORBEL-BELLAJ, O.; AYED, H. B.; MANNI, L.; AGREBI, R.; NASRI, M. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1248-1256. 2011.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 457-470. 2008.

LAEMMLI U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227 n. 5259, p.680-685. 1970.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology, prospecting and enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 3, p. 1-22. 2012.

LIPP, M.; ANKLAM, E. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate-Part A. Compositional data. **Food Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 73-97. 1998.

MAESTRI, D.; MARTÍNEZ, M.; BODOIRA, R.; ROSSI, Y.; OVIEDO, A.; PIERANTOZZI, P.; TORRES, M. Variability in almond oil chemical traits from traditional cultivars and native genetic resources from Argentina. **Food Chemistry**, v. 170, p. 55-61. 2015.

MIYARA, I.; SHAFRAN, H.; KRAMER-HAIMOVICH, H.; ROLLINS, J.; SHERMAN, A.; PRUSKY, D. Multi-factor regulation of pectate lyase secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on avocado fruits. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, p. 281-291. 2008.

MURTY, R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K.A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 57-66. 2002.

MUSTRANTA, A.; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. **Enzyme Microbial Technology**, v. 15, p. 133-139. 1993.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. São Paulo: Sarvier, 2014. 1336 p.

NGUYEN, L. N.; DAO, T. T.; ZIVKOVIC, T.; FEHRHOLZ, M.; SCHAFER, W.; SALOMONA, S. Enzymatic properties and expression patterns of five extracellular lipases of *Fusarium graminearum* *in vitro*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 46, p. 479-486. 2010.

OLIVEIRA, Débora Torres Mendes. **Lipase extracelular de fungo filamentoso: Isolamento e caracterização parciais**. 2000. 147 f. Dissertação - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

PENCI, M. C.; CONSTENLA, D. T.; CARELLI, A. Free-fatty acid profile obtained by enzymatic solvent-free hydrolysis of sunflower and soybean lecithins. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 332-338. 2010.

PURDY, R. E.; KOLATTUKUDY, P. E. Hydrolysis of plant cuticle by a plant pathogen. Properties of cutinase I, cutinase II and a non-specific esterase isolated from *Fusarium solani f. pisi*. **Biochemistry**, v. 14, p. 2832-2840. 1975.

RIBEIRO, B. D.; DE CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-16. 2011.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44. 2012.

SANGEETHA, R. *et al.* Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* vsg1: production, purification and characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 179-185, jan/mar. 2010.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; FERRAZ, G. M. G.; MONTARROYOS, A. V. V.; SILVA, D. S. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 42-51. 2011.

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

SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAIC, A. K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93-100. 2013.

SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAKANO, H.; NAGAO, T.; SUENAGA, M.; NAKAI, S.; TOMINAGA, Y. Fatty acid specificity of *Rhizopus delemar* lipase in acidolysis. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 321-327. 1997.

SILVA, N. C. A.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on polyhydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139-149. 2014.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520. 2012.

SU, J.; ZHANG, F.; SUN, W.; KARUPPIAH, V.; ZHANG, G.; LI, Z.; JIANG, Q. A new alkaline lipase obtained from the metagenome of marine sponge *Ircinia sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1093-1102. 2015.

SUPAKDAMRONGKUL, P.; BHUMIRATANA, A.; WIWAT, C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 228-235. 2010.

TABELA brasileira de composição de alimentos: TACO. 2. ed. Campinas: NEPA - Núcleo de Estudo e Pesquisa em Alimentação, 2006. 113p.

TAMALAMPUDI, S.; HAMA, S.; TANINO, T.; TALUKDER, M. R.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Immobilized recombinant *Aspergillus oryzae* expressing heterologous lipase: An efficient whole-cell biocatalyst for enantioselective transesterification in non-aqueous medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 48, v. 33-37. 2007.

TAN, S.; OWUSU APENTEN, R. K.; KNAPP, J. Low temperature organic phase biocatalysis using cold-adapted lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* P38. **Food chemistry**, v. 57, n. 3, p. 415-418. 1996.

TENG, Y.; XU, Y. A modified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 2, p. 297-299. 2007.

TORRES-SALAS, P.; PEDRALI, A.; BAVARO, T.; AMBROSINI, S.; MARRUBINI, G.; PAPPALARDO, V. M.; MASSOLINI, G.; TERRENI, M.; UBIALI, D. Preparation of PUFA concentrates as acylglycerols via enzymatic hydrolysis of hempseed oil (*Cannabis sativa* L.) in a homogeneous low-water medium. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 116, p. 1496-1504. 2014.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, p. 183-196. 2010.

ULKER, S.; KARAOGLU, S. A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, p. 385-390. 2012.

VENKATESAGOWDA, B.; PONUGUPATY, E.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 71-80. 2012.

WANG, Y.; SRIVASTAVA, K. C.; SHEN, G-J.; WANG, H. Y. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 433-438. 1995.

WEBER, N.; WEITKAMP, P.; MUKHERJEE, K. D. Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. **Food Research International**, v. 35, p. 177-181. 2002.

WEBER, N.; WEITKAMP, P.; MUKHERJEE, K. D. Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 67-71. 2001.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670. 1979.

YU, X. W.; LU, X.; ZHAO, L. S.; XU, Y. Impact of NH_4^+ nitrogen source on the production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1462-1468. 2013.

CAPÍTULO II CONTEÚDO DE FENOIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Morus alba*

9. INTRODUÇÃO

M. alba, amoreira, é uma planta de grande interesse econômico que pertence à família *Moraceae*, ordem *Urticales* (DONNO *et al.*, 2015). As frutas da amoreira são usadas na alimentação humana enquanto sua folhagem é a única fonte de nutrientes para o crescimento do bicho-da-seda (BUTT *et al.*, 2008). É uma espécie nativa da África embora atualmente seja cultivada de maneira cosmopolita (NODA *et al.*, 2004).

A sericultura é o principal processo que impulsionou o melhoramento genético de *M. alba* levando ao surgimento de inúmeras variedades ao redor do mundo, sendo 90 variedades brasileiras em três coleções de cultura (MARTÍN *et al.*, 2014). Em Cuba, a *Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey* (EPPF-IH) é um dos centros de melhoramento genético de *Morus* para a sericultura e sua coleção de culturas conta com variedades obtidas de diferentes países como Costa Rica, Coreia do Sul, China e Espanha. Dentre as variedades armazenadas na EPPF-IH estão as variedades naturais Cubana, Indonesia, Murcia, Tigreada, University, YU-12, YU-62 e as híbridas IZ 13/6, IZ 15/7, IZ 40, IZ 56/4 e IZ 64, as quais têm sido utilizadas em diferentes estudos agronômicos.

Além do valor nutritivo dos frutos de *M. alba*, outras partes desta planta têm sido relacionadas com atividades biológicas, tais como tronco com atividade antioxidante (NAM *et al.*, 2012), anti-úlceras (AHMAD *et al.*, 2013) e anti-inflamatória (RIVIERE *et al.*, 2014). Para as folhas de *M. alba*, efeito vasodilatador, (KURNIATI *et al.*, 2014) e antiglicemiantes (JESZKA-SKOWRON *et al.*, 2014) são relatados, enquanto, atividade antitirosinase (CHANG *et al.*, 2011) têm sido descrita para galhos de *M. alba*. As frutas também possuem potencial de ativação de macrófagos (KIM *et al.*, 2013) e atividade antioxidante (DONNO *et al.*, 2015). Cascas de raiz também têm demonstrado atividade biológica como hipocolesterolêmica, antioxidante (El-BESHBISHY *et al.*, 2006), anti-inflamatória e anticâncer (EO *et al.*, 2014).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários que protegem as plantas contra danos de patógenos e estresse ambiental (PAREDES-LOPEZ *et al.*, 2010). O consumo humano dessas substâncias, entre os quais estão os flavonoides, tem sido correlacionado com a redução dos efeitos deletérios da produção descontrolada de radicais livres, devido à sua atividade antioxidante (BENVENUTI *et al.*, 2004). Mecanismos de ação antioxidante são muito complexos, incluindo a doação de elétrons, que atuam reduzindo a oxidação de lipídios

(HUANG *et al.*, 2005; El-BESHBISHY *et al.*, 2006). Outros mecanismos incluem doação de hidrogênio para reduzir as espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar alterações no DNA e levar ao aparecimento de cânceres (VILLAÑO *et al.*, 2007).

A concentração dos compostos fenólicos de *M. alba* bem como sua atividade antioxidante pode ser muito afetada pelas condições ambientais, de armazenamento, pela região geográfica, variedade e a parte da planta utilizada na avaliação biológica (PAREDES-LOPEZ *et al.*, 2010). Na literatura, existem apenas alguns relatos sobre as atividades biológicas de extratos da raiz de *M. alba* (El-BESHBISHY *et al.*, 2006; EO *et al.*, 2014). O uso de raízes na alimentação como uma fonte de metabólitos com atividade biológica é subexplorada na literatura, embora seja de grande interesse econômico, uma vez que, por exemplo, rizomas de *Zingiber officinale*, gengibre, são muito utilizadas para compor o aroma e sabor de diversas bebidas. Esse rizoma tem demonstrado atividade antioxidante em níveis mais altos do que substâncias utilizadas como conservantes em alimentos (SINGH *et al.*, 2008).

A toxicidade associada a antioxidantes sintéticos utilizados como conservantes em alguns alimentos, as restrições legais impostas a sua utilização e o conhecimento crescente dos efeitos saudáveis de nutracêuticos na dieta têm levado ao aumento da busca por novos antioxidantes naturais (BUTT *et al.*, 2008; EGEA *et al.*, 2010). Nesse sentido, o objetivo desta parte do presente trabalho foi comparar o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides de extratos preparados a partir de diferentes variedades de *M. alba* e determinar sua atividade antioxidante por diferentes mecanismos, visando descobrir aplicações para raízes de *M. alba*, as quais atualmente podem ser consideradas como resíduo agroindustrial.

10. METODOLOGIA

10.1 Materiais

A avaliação da atividade antioxidante, do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides foram realizados no laboratório de Biotecnologia Vegetal, na Estación Experimental de Pastos y Forrajes *Indio Hatuey*, que pertence à Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, em Cuba, com a colaboração da Professora Dra. Maykelis Días Solares.

Todos os solventes e reagentes utilizados foram obtidos em grau analítico. Os solventes (etanol, metanol e hexano), ácidos e sais foram adquiridos da Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido ascórbico, quecertina, ABTS, DPPH, hidroquinona e

ácido gálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Inc (São Paulo, Brasil). O reagente de Folin-Ciocalteu foi comprado da Merck (Darmstadt, Alemanha).

10.2 Obtenção das plantas e extratos

Todas as plantas utilizadas no presente trabalho foram obtidas na *Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey*, na *Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos*, em Perico, Cuba. Foram utilizadas doze variedades de *Morus alba*: Cubana, Indonesia, IZ 13/6, IZ 15/7 IZ 40, IZ 56/4, IZ 64, Mureia, Tigreada, Universidad, YU-12, YU-62.

As raízes secas de cada variedade (1 kg) foram pulverizadas e extraídas com hexano, etanol e água destilada por percolação. Após extração exaustiva, o solvente foi removido usando o evaporador rotativo a vácuo. Os extratos de cada solvente foram identificados e armazenados sob refrigeração até o momento das análises.

10.3 Atividade antioxidante total (método do fosfomolibdênio)

Para avaliar a atividade antioxidante total dos extratos utilizou-se a metodologia de Prieto *et al.* (1999). O extrato (0,1 mL), dissolvido em solvente (água, etanol ou hexano) foi adicionado a 3 mL de solução reagente (ácido sulfúrico de 0,6 mol.L⁻¹, fosfato de sódio 28 m mol.L⁻¹, molibdato de amônio 4 m mol.L⁻¹). O conteúdo foi misturado e incubado por 90 min a 95 °C. Após arrefecimento à temperatura ambiente, as absorvâncias das amostras foram lidas a 695 nm contra um branco (solvente e solução reagente). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido ascórbico (mmol de ácido ascórbico.L⁻¹ ou g⁻¹ extrato).

10.4 Poder redutor férrico (método do ferrocianeto)

A capacidade antioxidante de reduzir íons de Ferro III foi avaliada por meio do método de Oyaizu *et al.* (1986). A técnica consistiu em misturar entre 0,25 mL de extratos de *M. alba* (100 µg.mL⁻¹), tampão fosfato (0,2 mmol.L⁻¹, pH 6,6) e 0,625 mL ferrocianeto de potássio 1 % (m/v). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 20 min a 50 °C. Em seguida 0,625 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) foi adicionado e a mistura foi centrifugada (3000 rpm, 10 min). Uma alíquota do sobrenadante (0,18 mL) foi coletada e misturada com 1,8 mL de água e 0,36 mL de cloreto férrico (0,1 %, p/v). A leitura de absorvância foi então realizada a 700 nm e os resultados obtidos foram convertidos em % de poder redutor férrico comparado ao padrão, ácido ascórbico.

10.5 Capacidade antioxidante de sequestro de radicais ABTS e DPPH

A avaliação de atividade de captura de radicais livres seguiu duas metodologias. A técnica de captura de radicais 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico] (ABTS) (JOHNSTONE *et al.*, 2006) consistiu na preparação de uma solução ABTS (7 mmol.L⁻¹ ABTS e persulfato de potássio 2,4 mmol.L⁻¹, incubados por 12 h, no escuro) e diluição esta solução em metanol até obter uma absorbância de $0,708 \pm 0,001$ a 734 nm. Em seguida, 1 mL dessa solução reagiu com 1 mL dos extratos (2,5-125 µg.mL⁻¹) por 7 min. As leituras das absorbância a 734 nm foram aferidas.

O método de captura de 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; RE *et al.*, 1999) consistiu em misturar suavemente os extratos (100-1000 µg.mL⁻¹) com DPPH 0,3% (solução metanólica). A reação ocorreu por 30 min, no escuro. Em seguida, a absorbância foi medida a 517 nm. Nos dois ensaios, o ácido ascórbico foi usado como controle positivo, sendo preparado um branco com metanol/etanol no lugar dos extratos e a atividade antioxidante foi expressa como I₅₀, ou seja, a concentração de extrato necessária para capturar 50% dos radicais livres em solução.

10.6 Fenóis totais

A técnica de detecção de fenóis totais utilizada foi o método de Folin-Ciocalteu (GAO *et al.*, 2000). Essa metodologia consistiu em misturar os extratos das variedades de *M. alba* (0,5 mL - 1000 µg.mL⁻¹) com 2,58 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Depois de 3 min, uma solução saturada de carbonato de sódio (0,3 mL) foi adicionada à mistura que, em seguida, foi incubada por 20 min à temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 760 nm e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (g ácido gálico/100 g extrato).

10.7 Flavonoides totais

Os flavonoides totais foram avaliados por meio do método de cloreto de alumínio (YANG *et al.*, 2007). Alíquotas dos extratos (0,5 mL), água (2,5 mL) e nitrito de sódio (150 µL) a 5 % (p/v) foram combinados, fortemente agitados em vórtex (10 s). Depois de 5 min em repouso, 300 µL de cloreto de alumínio 10 % (p/v), 1 mL de NaOH (1 mmol.L⁻¹) e 550 µL de água foram adicionados. Esta mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente

por 15 min. A absorbância das amostras foi lida a 510 nm e os resultados foram expressos em equivalentes de quecertina (μg quecertina. g^{-1} extrato).

10.8 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por ANOVA (*one-way*) e por testes de comparação de médias (Tukey e Dunnett). Microsoft Excel 2010 (Roselle, IL, EUA) foi usado para as avaliações. Correlações entre conteúdo de fenois e atividade antioxidante foram avaliados pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) com $P \leq 0,05$.

11. RESULTADOS

As 12 variedades de *M. alba* foram avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante por diferentes métodos. Os extratos etanólicos apresentaram atividade antioxidante total mais alta do que os extratos hexânicos - os menos ativos - e aquosos, como pode ser observado na Figura 25. Dentre os extratos etanólicos, as variedades IZ 13/6 e IZ 15/7 mostraram as maiores atividades, sendo que a atividade da variedade IZ 15/7 chegou a 891 mmol ácido ascórbico/g extrato (Figura 25). Dentre os extratos hexânicos, as variedades Cubana, IZ 13/6 e Universidad obtiveram os melhores resultados (160, 152,5 e 141,5 mmol ácido ascórbico/g extrato, respectivamente). A atividade dos extratos aquosos neste ensaio foi relevante, chegando quase a se equiparar com a atividade dos extratos etanólicos, como é o caso das variedades Universidad e YU-62.

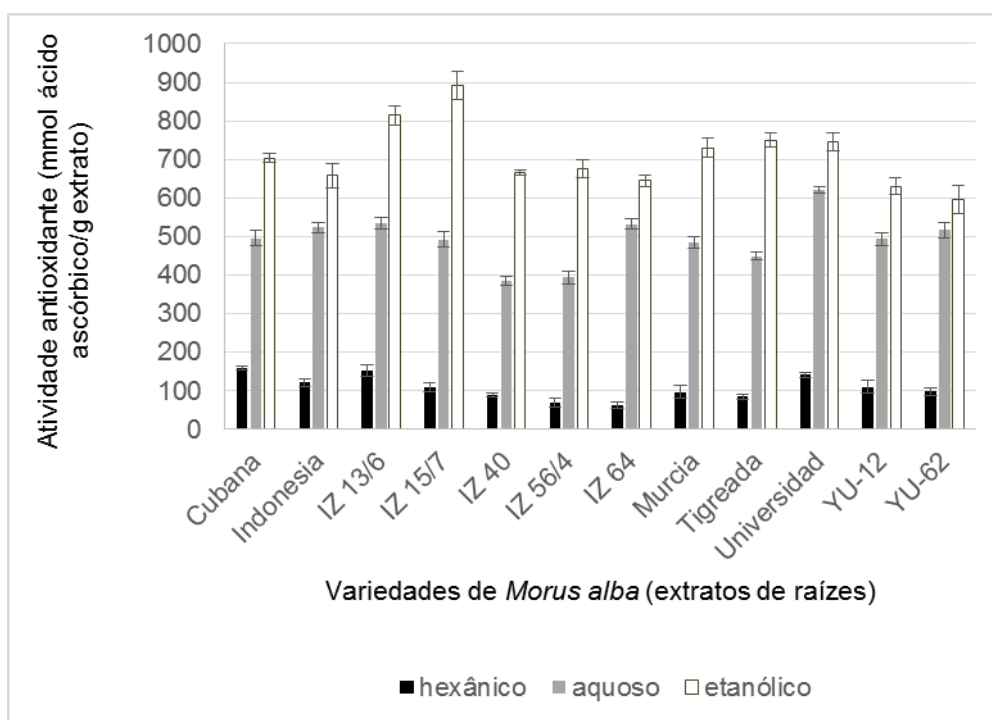


Figura 25 - Atividade antioxidante total dos extratos das raízes de *M. alba* obtidos em diferentes solventes

Na

avaliação quanto ao poder redutor férrico, os extratos etanólicos também obtiveram, em média, valores mais proeminentes do que os demais extratos como mostrado Tabela 6. Dentre estes extratos, as variedades IZ 64, YU-62 e IZ 13/6 demonstraram possuir maior eficiência em reduzir os íons férricos (47,4; 46,2 e 43,2 %, respectivamente) (Tabela 6). As substâncias dessas variedades com capacidade de reduzir os íons férricos foram extraídas junto com outras substâncias não antioxidantes de mesma polaridade e ainda assim alcançaram cerca de 50% de eficiência quando comparado com o padrão ácido ascórbico. As variedades Universidad, Murcia e IZ 64 tiveram maior poder redutor férrico dentre as variedades em extrato aquoso.

Tabela 6 - Poder redutor férrico de raízes de variedades de *M. alba* obtidos em diferentes solventes

Variedades de <i>M. alba</i> / Padrão	Absorbância a 700 nm					
	Extrato hexânico	% ^a	Extrato etanólico	% ^b	Extrato aquoso	% ^c
Ácido ascórbico	1,65	100	1,95	100	2,59	100
Cubana	0,15	9,3	0,81	41,4	0,78	30,2
Indonesia	0,18	11,1	0,66	33,6	0,68	26,1
IZ 13/6	0,09	5,6	0,84	43,2	0,65	25,0
IZ 15/7	0,06	3,7	0,69	35,3	0,68	26,4
IZ 40	0,04	2,4	0,67	34,3	0,64	24,7
IZ 56/4	0,04	2,2	0,56	28,4	0,60	23,2
IZ 64	0,10	6,3	0,92	47,4	0,85	32,6
Murcia	0,05	2,7	0,56	28,8	0,86	33,2
Tigreada	0,06	3,8	0,80	40,9	0,75	28,8

Universidad	0,11	6,6	0,74	37,8	1,01	38,8
YU-12	0,12	7,0	0,67	34,4	0,84	32,2
YU-62	0,11	6,6	0,90	46,2	0,71	27,3
Média		5,6		37,6		29,0

a,b,c

Porcentagens

calculadas considerando a absorvância do ácido ascórbico nas condições de ensaio como 100%.

Na avaliação da captura de radicais livres usaram-se os radicais DPPH e ABTS e os resultados da concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos extratos responsável por capturar 50 % dos radicais em solução (I_{50}) estão expressos na Tabela 7. Nesse ensaio, quanto mais baixo for o valor de I_{50} , mais eficiente em capturar radicais livres é o extrato, ou seja, o I_{50} é inversamente proporcional à sua atividade antioxidante de captura de radicais livres.

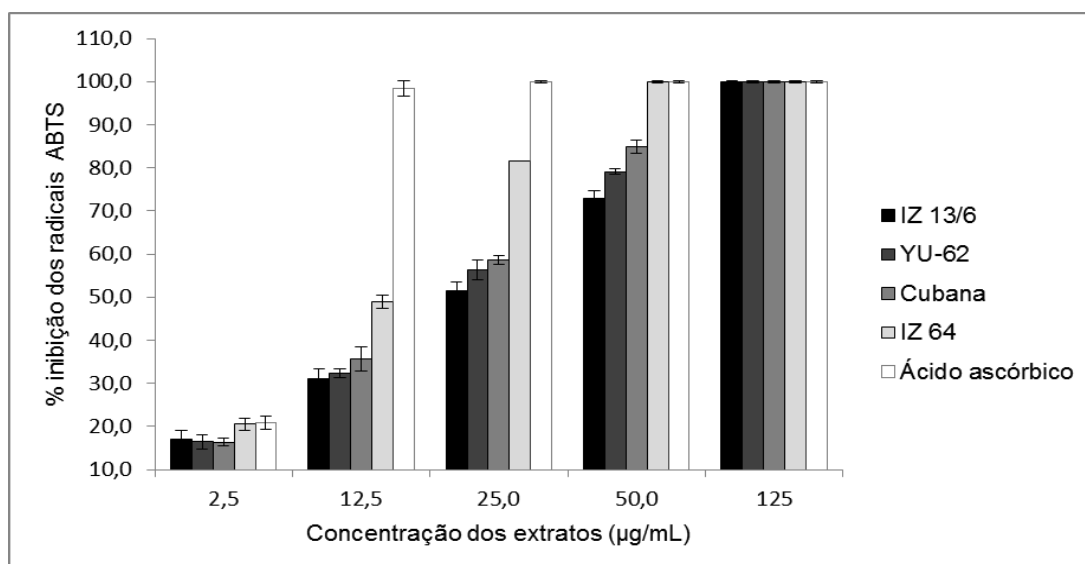
Tabela 7 - Atividade de captura de radicais livres (ABTS/DPPH) de extratos das variedades de *M. alba* obtidos em diferentes solventes

Variedades de <i>M. alba</i>	DPPH^a			ABTS^b		
	Extrato hexânico	Extrato etanólico	Extrato aquoso	Extrato hexânico	Extrato etanólico	Extrato aquoso
Cubana	1824,2	429,0	812,1	326,3	23,8	87,4
Indonesia	1916,6	733,6	1014,0	91,2	34,8	75,1
IZ 13/6	1215,0	642,2	866,8	509,0	29,1	112,3
IZ 15/7	563,4	599,4	654,3	158,6	36,5	87,4
IZ 40	539,6	568,8	791,5	89,9	28,6	69,0
IZ 56/4	1191,3	792,6	839,0	178,2	34,3	83,0
IZ 64	808,8	378,1	717,1	204,6	13,2	53,8
Murcia	593,2	667,7	912,9	169,2	37,8	94,4
Tigreada	1344,9	591,8	615,1	187,7	29,5	85,0
Universidad	2013,5	826,5	842,8	315,2	33,2	85,9
YU-12	1210,0	934,6	1069,8	290,1	32,2	96,6
YU-62	828,5	668,3	1181,2	180,6	26,0	120,5
Ácido ascórbico	63,7	59,2	59,7	48,0	6,3	11,6

^{a,b} Concentração ($\mu\text{g/mL}$) de extratos necessária para causar uma inibição de 50% dos radicais DPPH/ABTS radical, nas condições de ensaio (respectivamente).

Considerando o ensaio usando radicais DPPH, nos extratos etanólicos, as variedades mais ativas foram IZ 64 e Cubana. Dentre os extratos aquosos foram das variedades Tigreada, IZ 15/7 e IZ 64, enquanto em extratos hexânicos as mais ativas foram as variedades IZ 40, IZ 15/7, Murcia, IZ 64 e YU-62.

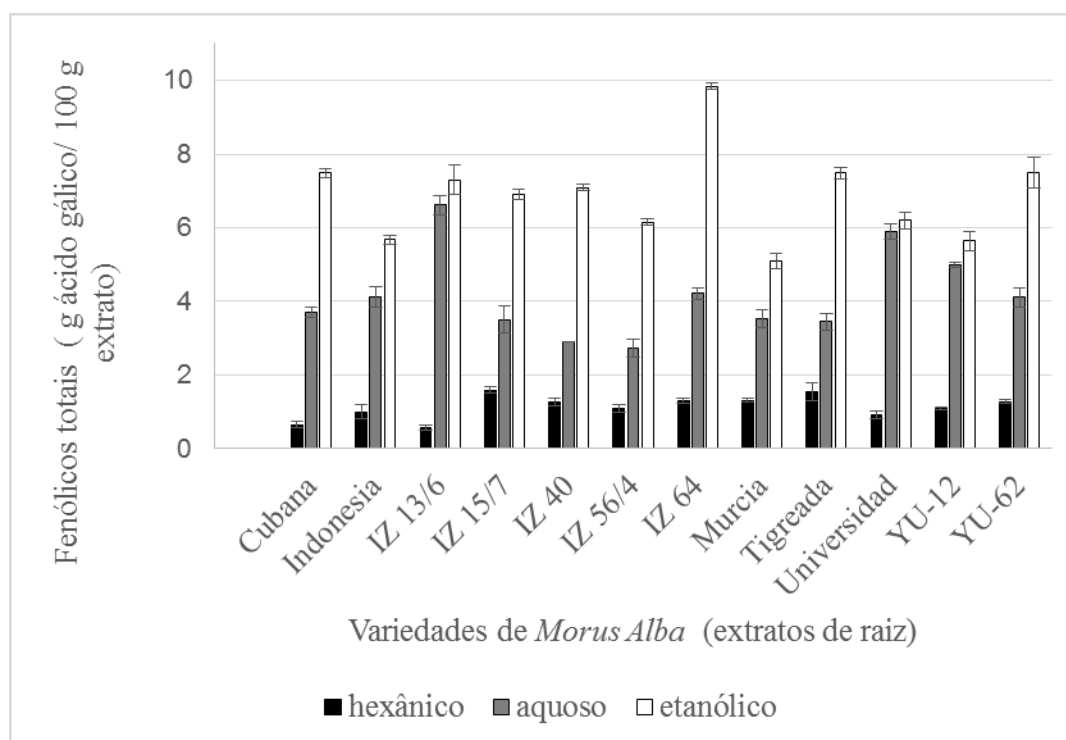
Ainda observando a capacidade de captura de radicais livres o teste com o ABTS foi realizado e a variedade IZ 64 foi mais ativa, independente do solvente de extração utilizado (hexano, etanol e água), como pode ser visto na Tabela 7. A menor concentração de extrato necessária para inibir 50% dos radicais ABTS em solução, entretanto, foi obtida quando se empregou o extrato etanólico de IZ 64 (Tabela 7). A captura do radical ABTS mostrou-se dose dependente, como representado na Figura 26.



FiFigura 26- Inibição do radical ABTS demonstrada pelos extratos etanólicos de raízes de *M. alba*

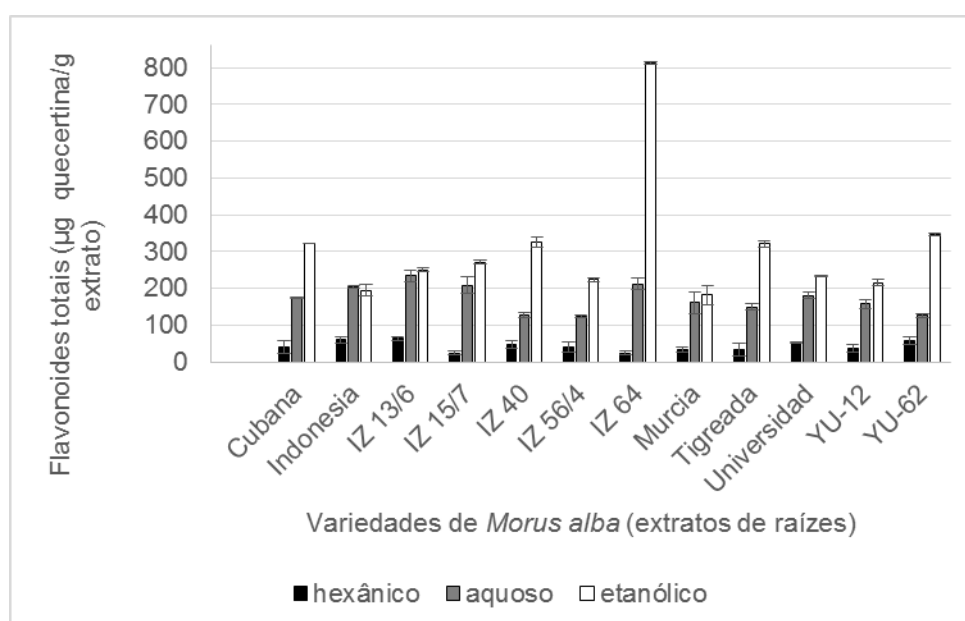
A média dos valores encontrados para os diferentes extratos de raízes de variedades de *M. alba* mostraram que tanto na captura de radicais ABTS quanto DPPH, os extratos etanólicos foram mais eficientes uma vez que obtiveram os menores valores de I_{50} (Tabela 7).

Na determinação de fenois totais, as variedades com os melhores resultados (Figura 27) foram IZ 64 (extrato etanólico), e os extratos aquosos das variedades IZ 13/6, Universidad e YU-12. Pode-se observar também que a maior concentração de fenois foi obtida nos extratos etanólicos, seguido dos aquosos e hexânicos (Figura 27).



FiFigura 27 - Concentração de fenois totais dos extratos das variedades de *M. alba* obtidos em diferentes solventes

Assim como em fenois totais, o maior teor de flavonoides foi observado no extrato etanólicos da variedade IZ 64 (Figura 28). Dentre os extratos aquosos, as maiores concentrações de flavonoides foram observadas nas variedades IZ 13/6, IZ 64, IZ 15/7 e Indonesia (Figura 28).



FiFigura 28 - Conteúdo de flavonoides totais de raízes de *M. alba* obtidos em diferentes solventes

Analisando os extratos aquosos, observou-se uma correlação positiva entre atividade antioxidante total e a concentração de fenois totais ($r = 0,78$). Considerando os extratos etanólicos, observou-se correlação positiva entre a concentração de fenois totais e o poder redutor férrico ($r = 0,82$), assim como uma correlação negativa entre fenois totais e I_{50} de radicais ABTS ($r = - 0,91$), como pode ser visualizado na Figura 29. Dentro dos extratos etanólicos também foi vista uma correlação negativa entre fenois totais e I_{50} DPPH ($r = - 0,77$). Nos extratos hexânicos foi observada uma correlação negativa entre fenois totais e I_{50} de radicais ABTS ($r = - 0,72$) e I_{50} DPPH ($r = - 0,61$).

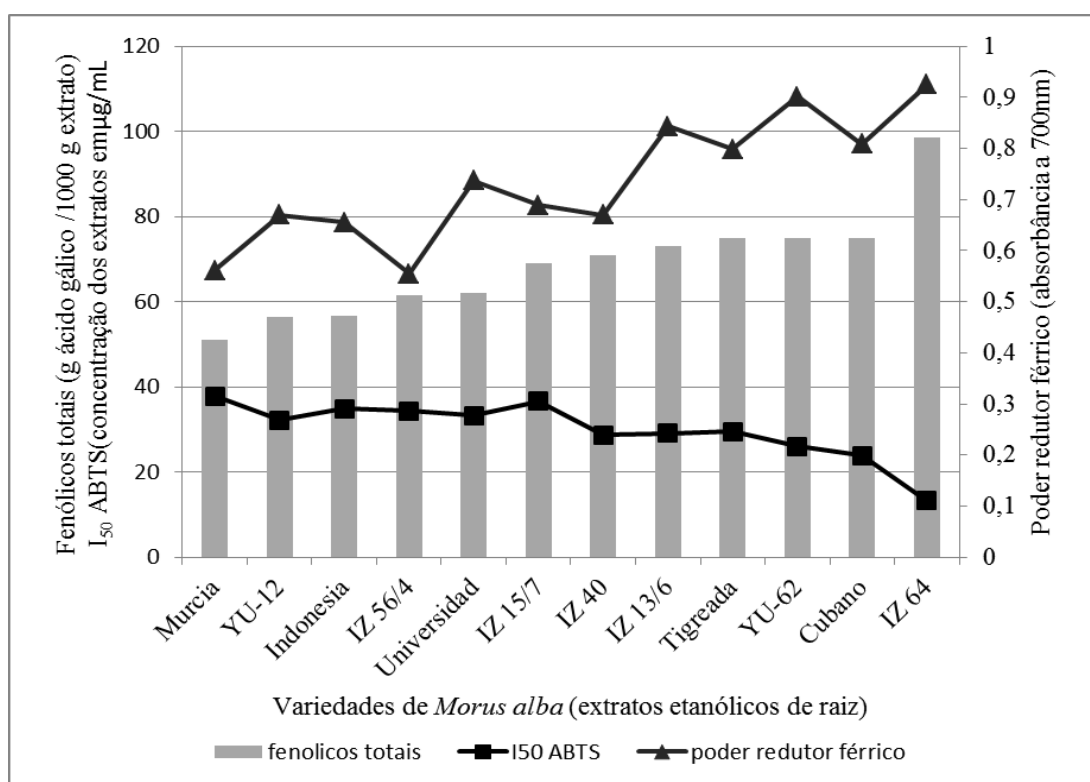


Figura 29 - Correlação entre fenois totais e I_{50} ABTS e poder redutor férrico dos extratos etanólicos de variedades de *M. alba*

12. DISCUSSÃO

O crescente entendimento da correlação de fitocomponentes da dieta com a redução de doenças associadas ao estresse oxidativo têm influenciado a população a consumir mais alimentos de origem natural (EGEA *et al.*, 2010). Além disso, a correlação entre os antioxidantes sintéticos usados em alimentos e a sua toxicidade para humanos leva a restrições de seu uso e impulsiona pesquisas para encontrar antioxidantes de origem natural (CHANG *et al.*, 2011). Assim, muitas plantas têm sido avaliadas quanto à sua atividade antioxidante.

No presente trabalho, 12 variedades naturais e híbridas de *M. alba* foram avaliadas quanto ao seu conteúdo de fenois totais e flavonoides, bem como quanto aos mecanismos de atividade antioxidante que apresentavam, como captura de radicais livres (ABTS e DPPH).

Quando se observou a atividade antioxidante total dos componentes dos extratos das raízes de *M. alba* concluiu-se que os extratos etanólicos foram 1,4 vezes mais ativos do que os extratos aquosos. Estes últimos foram 4,6 vezes mais ativos do que os extratos hexânicos. A alta eficiência do etanol em extrair fitocomponentes com atividade antioxidante repetiu-se em todos os ensaios realizados.

O ensaio do poder redutor férrico avalia a capacidade de componentes dos extratos reduzirem Fe^{+3} para Fe^{+2} (ANDALLU *et al.*, 2014). Nesse contexto, os extratos etanólicos das raízes de *M. alba* foram muito efetivos, superando resultados relatados para extratos etanólicos de folhas de espécies do gênero *Morus* (*M. indica* L.) (ARABSHAHI-DELOUEE e UROOJ, 2007). Esses extratos demonstraram a capacidade de remover esses íons instáveis, os quais, quando presentes em alimentos podem causar ou acelerar a oxidação lipídica em alimentos. Assim, as variedades IZ 64, YU-62, IZ 13/6 (em extratos etanólicos) Murcia, IZ 64, YU-12 e Cubana (em extratos aquoso) demonstraram potencial antioxidante.

A capacidade dos extratos de *M. alba* de estabilizarem radicais livres foi avaliada. Nesse contexto, I_{50} do ABTS dos extratos etanólicos foram menores do que dos extratos aquosos e estes foram menores do que os dos extratos hexânicos. Dentre as variedades observadas com atividade de capturar radicais DPPH, a mais eficiente foi IZ 64 (378 $\mu\text{g/mL}$) em extrato etanólico. Sua ação é menos eficiente do que aquela relatada para um extrato de folhas de *Morus* (79,53 $\mu\text{g/mL}$) (ARABSHAHI-DELOUEE e UROOJ, 2007). O resultado de I_{50} do DPPH do extrato etanólico de IZ 64, associado com a atividade antioxidante total dessa variedade, permite considerar essa parte da planta como potencial ingrediente na formulação

de alimentos nutracêuticos para evitar a iniciação ou propagação da oxidação indesejável em componentes de alimentos.

Os compostos polifenólicos têm sido relatados como fitocomponentes com atividades biológicas como antioxidantes, os quais atuam protegendo lipídeos e proteínas contra o dano oxidativo através da sua capacidade de estabilizar espécies reativas do oxigênio e reduzir metais instáveis (ANDALLU *et al.*, 2014). A correlação encontrada entre os fenóis totais e os testes de atividade antioxidante sugere que estes extratos possuam componentes que atuam por diferentes mecanismos de ação.

A correlação negativa encontrada entre extratos etanólicos de *M. alba* e I_{50} ABTS e DPPH demonstram sua capacidade de capturar e estabilizar radicais livres. A correlação é negativa porque o I_{50} indica a quantidade de extrato necessária para neutralizar 50% dos radicais, logo menos extrato implica em maior atividade. Assim, essa correlação sugere que, mesmo em baixas concentrações, esses extratos são muito eficientes.

A correlação positiva entre os fenóis totais com o poder redutor férrico sugere um segundo mecanismo de ação devido à capacidade de reduzir determinados metais. Esse resultado é interessante porque alguns metais presentes em alimentos podem acelerar oxidações indesejáveis.

Segundo Paredes-Lopez *et al.* (2010), diferentes fatores como variedade genética da planta podem afetar a composição e concentração dos fenóis e, também, a atividade antioxidante, o que foi corroborado no presente trabalho.

Dentre todas as variedades testadas, pode-se concluir que o extrato etanólico da variedade IZ 64 foi a mais eficiente. Essa variedade demonstrou maior poder redutor férrico (Tabela 6) e melhores I_{50} para ABTS e DPPH (Tabela 7). Para o ensaio de captura de radicais ABTS, a variedade IZ 64 apresentou os melhores valores independentes do solvente usado na extração.

Por fim, as atividades altas apresentadas pela variedade IZ 64 está alinhada com o seu alto conteúdo de fenóis (Figura 27, página 92) e flavonoides totais (Figura 28, página 92), sendo, este último, notavelmente mais alto do que o observado para os demais extratos etanólicos.

13. CONCLUSÃO

O potencial de uso da amoreira não está restrito ao consumo do fruto na alimentação humana e folhagem na sericultura. Suas raízes, geralmente consideradas como resíduos, também têm potencial para aplicações na indústria de conservantes de alimentos e nutracêuticos.

Os resultados mostraram que extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de diferentes variedades de *M. alba* têm níveis diferentes de compostos fenólicos e flavonoides que possuem atividade antioxidante por diferentes mecanismos (captura de radicais livres e poder redutor férrico). O etanol foi o melhor solvente para extrair compostos com atividade antioxidante.

A variedade IZ 64 foi a mais promissora para a síntese de um nutracêutico ou conservante antioxidante para alimentos uma vez que apresentou concentrações de fenóis e flavonoides, bem como atividade de captura de radicais livres e poder redutor férrico melhor que as demais variedades. Os resultados dessa variedade também permitiram inferir que há componentes de diferentes polaridade com atividade antioxidante em raízes de *M. alba*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.; GUPTA, G.; AFZAL, M.; KAZMI, I.; ANWAR, F. Antiulcer and antioxidant activities of a new steroid from *Morus alba*. **Life Sciences**, v. 92, p. 202-210. 2013.
- ANDALLU, B.; SHANKARAN, M.; ULLAGADDI, R.; IYER, S. In vitro free radical scavenging and in vivo antioxidant potential of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. **Journal of herbal medicine**, v. 4, p. 10-17. 2014.
- ARABSHAHI-DELOUEE, S.; UROOJ, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1233-1240. 2007.
- BENVENUTI, S.; PELLATI, F.; MELEGARI, M.; BERTELLI, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of rubus, ribes, and aronia. **Journal of Food Science (Food Chemistry and Toxicology)**, v. 69, n. 3, p. FCT164-FCT169. 2004.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30. 1999.
- BUTT, M.S.; NAZIR, A.; SULTAN, M.T.; SCHROËN, K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. **Trends in Food Science**, v. 19, p. 505-512. 2008.
- CHANG, L. W.; JUANG, L. J.; WANGA, B. S.; WANG, M. Y.; TAI, H. M.; HUNG, W. J.; CHEN, Y. J.; HUANG, M. H. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 785-790. 2011.
- DONNO, D.; CERUTTI, A. K.; PRGOMET, I.; MELLANOVA, M. G.; BECCAROA, G. L. Foodomics for mulberry fruit (*Morus* spp.): Analytical fingerprint as antioxidants' and health properties' determination tool. **Food Research International**, v. 69, p. 179-188. 2015.
- EGEA, I.; SÁNCHEZ-BEL, P.; ROMOJARO, F.; PRETEL, M. T. Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, p. 121-129. 2010.
- EL-BESHBISHY, H. A.; SINGAB, A. N. B.; SINKKONEN, J.; PIHLAJA, K. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. **Life Sciences**, v. 78, p. 2724-2733. 2006.
- EO, H. J.; PARK, J. H.; PARK, G. H.; LEE, M. H.; LEE, J. R.; KOO, J. S.; JEONG, J. B. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of mulberry (*Morus alba* L.) root bark. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 200. 2014.
- GAO, X.; OHLANDER, M.; JEPSSON, N.; BJÖRK, L.; TRAJKOVSKI, V. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 1485-1490. 2000.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856. 2005.

JESZKA-SKOWRON, M.; FLACZYK, E.; JESZKA, J.; KREJPCIO, Z.; KRÓL, E.; BUCHOWSKI, M. S. Mulberry leaf extract intake reduces hyperglycaemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats fed high-fat diet. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 9-17. 2014.

JOHNSTONE, C.; DAY, J. G.; STAINES, H.; BENSON, E. E. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolourisation assay for evaluating total antioxidant status in an alga used to monitor environmental impacts in urban aquatic habitats. **Ecological indicators**, v. 6, p. 280-289. 2006.

KIM, S. B.; CHANG, B. Y.; JO, Y. H.; LEE, S. H.; HAN, S. B.; HWANG, B. Y.; KIM, S. Y.; LEE, M. K. Macrophage activating activity of pyrrole alkaloids from *Morus alba* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 393-396. 2013.

KURNIATI, N. F.; SURYANI, G. P.; SIGIT, J. I. Vasodilator effect of ethanolic extract of mulberry leaves (*Morus alba* L.) in rat and rabbit. **Procedia Chemistry**, v. 13, p. 142-146. 2014.

MARTÍN, G.; NODA, Y.; ARIAS, Y.; PENTÓN, G.; PRIETO, M.; BRUNET, J.; CASTAÑEDA, L. Evaluación de la capacidad de reproducción vegetativa de variedades de morera (*Morus alba* L.). **Pastos y forrajes**, v. 37, n. 2, p. 151-157. 2014.

NAM, S.; JANG, H. W.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of extracts from teas prepared from medicinal plants, *Morus alba* L., *Camellia sinensis* L., and *Cudrania tricuspidata*, and their volatile components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9097-9105. 2012.

NODA, Y.; PENTÓN, G.; MARTÍN, G. Comportamiento de nueve variedades de *Morus alba* (L.) durante la fase de vivero. **Pastos y forrajes**, v. 27, n. 2, p. 131-138. 2004.

Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315. 1986.

PAREDES-LOPEZ, O.; CERVANTES-CEJA, M. L.; VIGNA-PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life - a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, n. 65, p. 299-308. 2010.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341. 1999.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237. 1999.

RIVIERE, C.; KRISA, S.; PÉCHAMAT, L.; NASSRA, M.; DELAUNAY, J. C.; MARCHAL, A.; BADO, A.; WAFFO-TÉGUO, P.; MÉRILLON, J. M. Polyphenols from the stems of *Morus alba* and their inhibitory activity against nitric oxide production by lipopolysaccharide activated microglia. **Fitoterapia**, v. 97, p. 253-260. 2014.

SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, P.; DE HELUANI, C. S.; DE LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential

oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3295-3302. 2008.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; MOYÁ, M. L.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, p. 230-235. 2007.

YANG, J.; PAULINO, R.; JANKE-STEDRONSKY, S.; ABAWI, F. Free-radical-scavenger activity and total phenols on noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and poder in procesing and storage. **Food chemistry**, v. 102, p. 302-308. 2007.

14. CONCLUSÕES GERAIS DA TESE

Foi obtido um preparado enzimático a partir de FSL de *C. gloeosporioides* em um meio de cultivo sem glicose, contendo óleo de oliva como fonte de carbono e indutor da produção de enzimas. A presença de lipase foi determinada no preparado a partir de um teste de hidrólise usando o *p*NPP como substrato da enzima e, a atividade máxima da lipase foi obtida com 48 h de fermentação. Uma sequência de ultrafiltração com corte de 10 kDa, filtração em gel e cromatografia de afinidade com benzamidina possibilitou a purificação parcial da lipase do preparado e, dentre as frações obtidas, a fração “1” continha maior quantidade de lipase e alcançou a melhor combinação rendimento/fator de purificação, apresentando pH ótimo em condições alcalinas.

A massa molecular da lipase presente no preparado foi estimada e a enzima foi estável em soluções com diferentes concentrações de sais e solventes, além de tolerar desde pH levemente ácido até mais alcalino (pH 11). Além disso, a lipase no preparado enzimático mostrou atividade hidrolítica e de esterificação sobre diferentes substratos, com grande capacidade de formação de butirato de butila (éster aromático).

A quantidade de componentes fenolicos e os flavonoides variou nas raízes de 12 variedades de *M. alba* e os extratos etanólicos, em detrimento dos aquosos e hexânicos, obtiveram as maiores atividades antioxidantes mostrando a eficiência do etanol na extração dessas substâncias.

Os extratos de *M. alba* apresentaram atividade antioxidante por diferentes mecanismos de ação como redução férrica e sequestro de radicais livres (ABTS e DPPH) e essa atividade apresentou correlação com a concentração de compostos fenolicos nesses extratos. A variedade IZ 64 apresentou os maiores conteúdos de fenois totais e flavonoides, bem como grande atividade de redução de ferro e sequestro de radicais livres.

REFERÊNCIAS DA TESE

ABDELMOEZ, W.; MOSTAFA, N. A.; MUSTAFA, A. Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 59, p. 290-297. 2013.

ABRANCHES, J.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER A. N. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 328-336. 1997.

ABRIL, Paulo Antônio Sette de. **Transesterificação enzimática de óleo de soja utilizando concentrado bruto contendo lipase, obtido do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: uma abordagem alternativa ao uso de lipases comerciais**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

AKOH, C. C. Enzymatic production of Betapol and other specialty fats. In. KUO, T. M.; GARDNER, H. **Lipid Biotechnology**. 1. ed. New York: Marcel Dekker inc, 2002. p. 461-463.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139. 2014.

AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species. **Phytopathology**, v. 93, n. 5, p. 579-587. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC 18 de 30 de abril de 1999**. São Paulo: 2000. 62 p.

AHMAD, A.; GUPTA, G.; AFZAL, M.; KAZMI, I.; ANWAR, F. Antiulcer and antioxidant activities of a new steroid from *Morus alba*. **Life Sciences**, v. 92, p. 202-210. 2013.

AKIMOTO, M.; NAGASHIMA, Y.; SATO, D. A kinetic study on lipase catalyzed interesterification of soybean oil with oleic acid in a continuous packed-bed reactor. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 131-142. 1999.

ALONSO, F. O. M.; OLIVEIRA, E. B. L.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; PEREIRA-MEIRELLES, F. V. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 9-18. 2005.

AMMAR, I.; ENNOURI, M.; ATTIA, H. Phenolic content and antioxidant activity of cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) flowers are modified according to the extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 97-104. 2015.

ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: review. **Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 100-118. 2012.

ARABSHAHI-DELOUEE, S.; UROOJ, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1233-1240. 2007.

ARAUJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Viçosa: editora UFV, 2008. 596 p.

ARAVIDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 141-158. 2007.

BALAJI, V.; EBENEZER, P. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 7, p. 1-8. 2008.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29. 2010.

BENVENUTI, S.; PELLATI, F.; MELEGARI, M.; BERTELLI, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of rubus, ribes, and aronia. **Journal of Food Science (Food Chemistry and Toxicology)**, v. 69, n. 3, p. FCT164-FCT169. 2004.

BOSCHINI, C.; DORMOND, H.; CASTRO, A. Producción de biomasa de la morera (*Morus alba*) em la Meseta Central de Costa Rica. **Agronomía Mesoamericana**, v. 9, n. 2, p. 31-40. 1998.

BRIZZIO, S.; TURCHETTI, B.; DE GARCÍA, V.; LIBKIND, D.; BUZZINI, P.; VAN BROOCK, M. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeast isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 519-525. 2007.

BUTT, M.S.; NAZIR, A.; SULTAN, M.T.; SCHROËN, K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. **Trends in Food Science**, v. 19, p. 505-512. 2008.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; DE OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; DA SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80. 2009.

CHANG, L. W.; JUANG, L. J.; WANGA, B. S.; WANG, M. Y.; TAI, H. M.; HUNG, W. J.; CHEN, Y. J.; HUANG, M. H. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 785-790. 2011.

CHAPLA, V. M.; ZERAIK, M. L.; LEPTOKARYDIS, J. H. C.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; ARAÚJO, A. R. Antifungal Compounds Produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus from *Michelia champaca*. **Molecules**, v. 19, p. 19243-19252. 2014.

CHEN, Z.; FRANCO, C. F.; BAPTISTA, R. P.; CABRAL, J. M. S.; COELHO, A. V.; RODRIGUES JR, C. J.; MELO, E. P. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1306-1313. 2007.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438-443. 2003.

CHI, Z.; CHI, Z.; ZHANG, T.; GUANGLEI, L.; JING, L.; XIANGHONG, W. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 236-255. 2009.

COELHO, A. D.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; MENDES, A. A. Produção de concentrados de ácidos graxos por hidrólise de óleos vegetais mediada por lipase vegetal. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1164-1169. 2013.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 881-885. 2006.

CORREA, T. L. R.; ZUBIETA, M. P.; TEIXEIRA, J. A.; DE QUEIROZ, M. V.; DE ARAÚJO, E. F. Carboxyl ester hydrolase from *Penicillium expansum*: cloning, characterization and overproduction by *Penicillium griseoroseum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 114-24. 2013.

COULTATE, T. P. **Food: The chemistry of its components**. 5. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. 501p.

DAIHA, K. G.; ANGELI, R.; DE OLIVEIRA, S. D.; ALMEIDA, R. V. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0131624. 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

DARVISHI, F.; DESTAIN, J.; NAHVI, I.; THONART, P.; ZARKESH-ESFAHANI, H. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 756-760. 2011.

DE, K.; PATEL, J. Modification of palm oil by chemical and enzyme catalyzed interesterification. **Journal of Oil Science**, v. 59, n. 6, p. 293-8. 2010.

DONNO, D.; CERUTTI, A. K.; PRGOMET, I.; MELLANOVA, M. G.; BECCAROA, G. L. Foodomics for mulberry fruit (*Morus* spp.): Analytical fingerprint as antioxidants' and health properties' determination tool. **Food Research International**, v. 69, p. 179-188. 2015.

DRORI, N.; KRAMER-HAIMOVICH, H.; ROLLINS, J.; DINOOR, A.; OKON, Y.; PINES, O.; PRUSKY, D. External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3258-3262. 2003.

DUNAEVSKY, Y. E.; MATVEEVA, A. R.; BELIAKOVA, G. A.; DOMASH, V. I.; BELOZERSKY, M. A. Extracellular alkaline proteinase of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biochemistry (Moscow)**. v.72, n.3, p.345-50, mar. 2007.

EGEA, I.; SÁNCHEZ-BEL, P.; ROMOJARO, F.; PRETEL, M. T. Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, p. 121-129. 2010.

EL-BESHBISHY, H. A.; SINGAB, A. N. B.; SINKKONEN, J.; PIHLAJA, K. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. **Life Sciences**, v. 78, p. 2724-2733. 2006.

EO, H. J.; PARK, J. H.; PARK, G. H.; LEE, M. H.; LEE, J. R.; KOO, J. S.; JEONG, J. B. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of mulberry (*Morus alba* L.) root bark. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 200. 2014.

FARIA, Luciana Amaral. **Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloeosporioides* produzida por fermentação em substrato líquido**. 2010. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FICKERS, P.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of applied Microbiology**, v. 96, p. 742-749. 2004.

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipase from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology advances**, v. 9, n. 6, p. 632-644. 2011.

FONSECA, A. S.; FONSECA, T. C.; CUNHA, E. A.; SCHAMMASS. Competição de variedades, híbridos naturais e híbridos artificiais de amoreira - IV. **Boletim de Indústria Animal**, v. 4, n. 2, p. 329-334. 1987.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. **Caderno de Saúde Pública**, v. 11, n. 3, p. 495-500. 1995.

GOMES, Rafael Aparecido. **Produção e valor nutricional de híbridos de Amoreira (*Morus alba* L.) colhidos em diferentes idades de crescimento**. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, 2011.

GONÇALVES, Flávia Augusto Guilherme. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

GOSWAMI, D.; BASU, J. K.; DE, S. Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 81-96. 2013.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International**, v. 2013, n. 329121, 2013.

HAN, L.; XU, Z.; HUANG, J.; MENG, Z.; LIU, Y.; WANG, X. Enzymatically catalyzed synthesis of low-calorie structured lipid in a solvent-free system: optimization by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12635-12642. 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.

HORCHANI, H.; AISSA, I.; OUERTANI, S.; ZARAI, Z.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Staphylococcal lipases: biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 125-132. 2012.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipase and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1, p. 155-170. 2004.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856. 2005.

JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351. 1999.

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.

JESZKA-SKOWRON, M.; FLACZYK, E.; JESZKA, J.; KREJPCIO, Z.; KRÓL, E.; BUCHOWSKI, M. S. Mulberry leaf extract intake reduces hyperglycaemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats fed high-fat diet. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 9-17. 2014.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 457-470. 2008.

KAKI, S. S.; ADLERCREUTZ, P. Lipase-catalyzed synthesis and characterization of 1-butanoyl-2-palmitoyl phosphatidyl choline, a potential lipidic prodrug of butyric acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 164, n. 3, p. 246-250. 2011.

KAR, T.; DELVIGNE, F.; MASSON, M.; DESTAIN, J.; THONART, P. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 1053-1059. 2008.

KEMPKA, A. P.; LIPKE, N. L.; PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M.; DE OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119-125. 2008.

KIM, J. T.; KANG, S. G.; WOO, J. H.; LEE, J. H.; JEONG, B. C.; KIM, S. J. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180 **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, n. 4, p. 820-828. 2007.

KIM, M-H.; KIM, H-K.; LEE, J-K.; PARK, S-Y.; OH, T-K. Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high-level production, purification and calcium-dependent thermostability. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 280-286. 2000.

KIM, S. B.; CHANG, B. Y.; JO, Y. H.; LEE, S. H.; HAN, S. B.; HWANG, B. Y.; KIM, S. Y.; LEE, M. K. Macrophage activating activity of pyrrole alkaloids from *Morus alba* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 393-396. 2013.

KIM, S. B.; CHANG, B. Y.; HWANG, B. Y.; KIM, S. Y.; LEE, M. K. Pyrrole alkaloids from the fruits of *Morus alba*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 5656-5659. 2014

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351. 2002.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650. 2002.

KRAMER-HAIMOVICH, H.; SERVI, E.; KATAN, T.; ROLLINS, J.; OKON, Y.; PRUSKY D. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on pelB activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1034-1039. 2006.

KURNIATI, N. F.; SURYANI, G. P.; SIGIT, J. I. Vasodilator effect of ethanolic extract of mulberry leaves (*Morus alba* L.) in rat and rabbit. **Procedia Chemistry**, v. 13, p. 142-146. 2014.

LEE, G.; JOO, H.; KIM, J.; LEE, J. H. Development of magnetically separable immobilized lipase by using cellulose derivatives and their application in enantioselective esterification of ibuprofen. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 465-471. 2008.

LUBBE, C. M.; DENMAN, S.; CANNON, P. F.; GROENEWALD, J. Z. E.; LAMPRECHT, S. C.; CROUS, P. W. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of Proteaceae. **Mycologia**, v. 96, n. 6, p. 1268-1279. 2004.

MAFAKHER, L.; MIRBAGHERI, M.; DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; EMTIAZI, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. **New Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 337-340. 2010.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS III, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38. 2003.

MARTIN, C.; BUTELLI, E.; PETRONI, K.; TONELLI, C. How can research on plants contribute to promoting human health? **The Plant Cell**, v. 23, p. 1685-1699. 2011.

MARTÍN, G.; NODA, Y.; ARIAS, Y.; PENTÓN, G.; PRIETO, M.; BRUNET, J.; CASTAÑEDA, L. Evaluación de la capacidad de reproducción vegetativa de variedades de morera (*Morus alba* L.). **Pastos y forrajes**, v. 37, n. 2, p. 151-157. 2014.

MEDINA, M. G.; GARCÍA, D. E.; MORATINOS, P.; COVA, L. J.; La morera (*Morus* spp.) como recurso forrajero: avances y consideraciones de investigación. **Zootecnia Tropical**, v. 27, n. 4, p. 343-362. 2009.

MEIER, R.; DREPPER, T.; SVENSSON, V.; JAEGER, K-E.; BAUMANN U. A calcium-gated lid and a large roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 43, p. 31477-31483. 2007.

MENEGUIM, A. M.; LOVATO, L.; DA SILVA, R. Z.; YAMAOKA, R. S.; NAGASHIMA, G. T.; PASINI A. Influência de cultivares de Amoreira *Morus* spp. sobre a produção e qualidade de casulos de bicho-de-seda, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 5, p. 670-674. 2007.

MENEGUIM, A. M.; LUSTRI, C.; DE OLIVEIRA, D. D.; YADA, I. F. U.; PASINI, A. Caracterização bromatológica de cultivares de amoreira, *Morus* spp., e determinação dos índices nutricionais de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera:bombycidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 506-512. 2010.

MIRANDA, J. E.; BONACIN, G. A.; TAKAHASHI, R. Produção e qualidade de folhas de amoreira em função da época do ano e de colheita. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 499-504. 2002.

MORAN, A.; BURGUILLO, F. J.; LÓPEZ, M.C.; DOMÍNGUEZ, A. Kinetic properties of derepressible acid phosphatase from the yeast from of *Yarrowia lipolytica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, n. 3, p. 288-296. 1989.

MURTY, R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K.A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 57-66. 2002. NAGARAJAN S. New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 5, p. 1163-1196. 2012.

NAM, S.; JANG, H. W.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of extracts from teas prepared from medicinal plants, *Morus alba* L., *Camellia sinensis* L., and *Cudrania tricuspidata*, and their volatile components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9097-9105. 2012.

NODA, Y.; PENTÓN, G.; MARTÍN, G. Comportamiento de nueve variedades de *Morus alba* (L.) durante la fase de vivero. **Pastos y forrajes**, v. 27, n. 2, p. 131-138. 2004.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e tecnologia de alimentos**. 1. ed. Barueri: Manole, 2006. 612p.

OLIVEIRA, Débora Torres Mendes de. **Lipase extracelular de fungo filamentoso: Isolamento e caracterizações parciais**. 2000. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, n. 2, p. 119-131. 1999.

PAQUES, F. W.; MACEDO G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99. 2006.

PAREDES-LÓPEZ, O.; CERVANTES-CEJA, M. L.; VIGNA-PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life - a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, n. 65, p. 299-308. 2010.

PENCI, M. C.; CONSTENLA, D. T.; CARELLI, A. Free-fatty acid profile obtained by enzymatic solvent-free hydrolysis of sunflower and soybean lecithins. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 332-338. 2010.

RAMPERSAD, S. N. Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. **Phytopathology**, v. 103, n. 2, p. 182-189. 2013.

RIVIERE, C.; KRISA, S.; PÉCHAMAT, L.; NASSRA, M.; DELAUNAY, J. C.; MARCHAL, A.; BADO, A.; WAFFO-TÉGUO, P.; MÉRILLON, J. M. Polyphenols from the stems of *Morus alba* and their inhibitory activity against nitric oxide production by lipopolysaccharide activated microglia. **Fitoterapia**, v. 97, p. 253-260. 2014.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1. ed. Campinas: casa do pão editora, 2009. 325p.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44. 2012.

SAXENA, R. K.; GHOSH. P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. Microbial lipases: potencial biocatalysts for future industry. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 101-115. 1999.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of microbiological methods**, v. 52, n. 1, p. 1-18. 2003.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; FERRAZ, G. M. G.; MONTARROYOS, A. V. V.; SILVA, D. S. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 42-51. 2011.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v. 44, n. 3, p. 158-163. 2000.

SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAIC, A. K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93-100. 2013.

SHENBERG, A. C. G. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 7-17. 2010.

SHNAIDERMAN, C.; MIYARA, I.; KOBILER, I.; SHERMAN, A.; PRUSKY, D. Differential activation of ammonium transporters during the accumulation of ammonia by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressoria formation and pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 3, p. 345-55. 2013.

SILVA, M. F.; FREIRE, D. M.; DE CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D. Concentration, partial

characterization, and immobilization of lipase extract from *P. brevicompactum* by solid-state fermentation of babassu cake and castor bean cake. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 6, p. 755-766. 2011.

SILVA, N. C. A.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139-149. 2014.

SILVA, R. C.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1535-1538. 2007.

SOUZA, R. F.; GOMES, R. C.; COELHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, n. 1, p. 45-50. 2003.

STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T.; GOMES, R. C.; AMARA, M. P. H. A.; CARVALHO, A. F.; VILELA, M. A. P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 181-194. 2007.

SU, J.; ZHANG, F.; SUN, W.; KARUPPIAH, V.; ZHANG, G.; LI, Z.; JIANG, Q. A new alkaline lipase obtained from the metagenome of marine sponge *Ircinia sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1093-1102. 2015.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 459-465. 2003.

TENG, Y.; XU, Y. A modified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 2, p. 297-299. 2007.

TIWARI, P.; UPADHYAY, M. K.; SILAWAT, N.; VERMA, H. N. Optimization and characterization of a thermo tolerant lipase from *Cryptococcus albidus*. **Der Pharma Chemica**, v. 3, n. 4, p. 501-508. 2011.

TORRES-SALAS, P.; PEDRALI, A.; BAVARO, T.; AMBROSINI, S.; MARRUBINI, G.; PAPPALARDO, V. M.; MASSOLINI, G.; TERRENI, M.; UBIALI, D. Preparation of PUFA concentrates as acylglycerols via enzymatic hydrolysis of hempseed oil (*Cannabis sativa* L.) in a homogeneous low-water medium. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 116, p. 1496-1504. 2014.

VENKATESAGOWDA, B.; PONUGUPATY, E.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 71-80. 2012.

WAN SEMAN, W. M.; BAKAR, S. A.; BUKHARI, N. A.; GASPAR, S. M.; OTHMAN, R.; NATHAN, S.; MAHADI, N. M.; JAHIM, J.; MURAD, A. M.; BAKAR, F. D. High level expression of *Glomerella cingulata* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 184, p. 219-228. 2014.

WANG, X.; RADWAN, M. M.; TARÁWNEH, A. H.; GAO, J.; WEDGE, D. E.; ROSA, L. H.; CUTLER, H. G.; CUTLER, S. J. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4551-4555. 2013.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, n. 1, p. 115-180. 2012.

YANO, Y.; OIKAWA, H.; SATOMI, M. Reduction of lipids in fish meal prepared from fish waste by a yeast *Yarrowia lipolytica*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 302-307. 2008.

ZHANG, G.; WANG, W.; ZHANG, X.; XIA, Q.; ZHAO, X.; AHN, Y.; AHMED, N.; COSOVEANU, A.; WANG, M.; WANG, J.; SHU, S. De novo rna sequencing and transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* ES026 reveal genes related to biosynthesis of huperzine A. **Plos One**, v. 10, n. 3. p. e0120809. 2015.