

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**ELAINE CRISTINA DA COSTA**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
POTENCIALMENTE PRODUTORES DE ENZIMAS  
LIPOLÍTICAS APLICÁVEIS NA ÁREA DE ALIMENTOS**

**BELO HORIZONTE  
2016**

**ELAINE CRISTINA DA COSTA**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
POTENCIALMENTE PRODUTORES DE ENZIMAS  
LIPOLÍTICAS APLICÁVEIS NA ÁREA DE ALIMENTOS**

Dissertação 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 Mestre em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Prof. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda

Co-orientadora: Prof. Dra. Evelyn de Souza Oliveira Lopes

Colaborador: Prof. Dr. Gecernir Colen

**BELO HORIZONTE  
2016**

C837b Costa, Elaine Cristina da.  
Bioprospecção de fungos endofíticos potencialmente produtores de enzimas lipolíticas aplicáveis na área de alimentos / Elaine Cristina da Costa. – 2016.  
97 f. : il.

Orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.  
Coorientadora: Evelyn de Souza Oliveira Lopes.  
Colaborador: Gecernir Colen.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Sementes oleaginosas – Teses. 2. Fungos endofíticos – Teses. 3. Enzimas lipolíticas – Teses. 4. Fermentação – Alimentos – Teses. 5. Fermentação submersa – Teses. 6. Esterificação (Química) – Teses. 7. Acetato de butila – Teses. I. Lacerda, Inayara Cristina Alves. II. Lopes, Evelyn de Souza Oliveira. III. Colen, Gecernir. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 660.62



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG  
Faculdade de Farmácia  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

ELAINE CRISTINA DA COSTA

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POTENCIALMENTE  
PRODUTORES DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS APLICÁVEIS  
NA ÁREA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29 DE FEVEREIRO DE 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

*Beatriz Martins Borelli*

Profa. Dra. BEATRIZ MARTINS BORELLI

*Evelyn de S. O. Lopes*

Profa. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES

Coorientadora

*Inayara C. Alves Lacerda*

Profa. Dra. INAYARA CRISTINA ALVES LACERDA  
Orientadora e Presidente da Comissão

*Raquel Linhares Bello de Araújo*

Profa. Dra. RAQUEL LINHARES BELLO DE ARAÚJO

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma se fizeram presentes e contribuíram em minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, por me permitir uma vida de aprendizados, dando forças para cumprir mais uma fase, cuidando sempre de mim e estando sempre presente em minha vida.

À Professora Doutora Inayara Cristina Alves Lacerda, pela orientação, pelos ensinamentos, otimismo, disponibilidade e amizade. Por acreditar em mim e ter sempre uma fala tranquilizante.

À Professora Doutora Evelyn de Souza Oliveira Lopes pela co-orientação, incentivo e ensinamentos.

Ao Professor Doutor Gecernir Colen, pela colaboração, pelos valiosos ensinamentos e por confiar em meu trabalho.

À Denise Sande pela amizade, disponibilidade, companheirismo, orientação e generosidade em compartilhar seus conhecimentos e os momentos de aflição e alegria. Por ser uma verdadeira amiga.

À Julielle Barbosa pela dedicação e responsabilidade, pela amizade e parceria. Por ser meus braços direito e esquerdo neste trabalho.

Ao Professor Doutor Luiz Henrique Rosa pela colaboração e por disponibilizar o Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG; e a Lívia e Vivian por ajudar na execução da identificação molecular.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo e Profa. Dra. Beatriz Martins Borelli, pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela contribuição em minha formação científica, especialmente aos professores da microbiologia.

À minha mãe pela minha formação, incentivo, apoio e amor; ao meu pai, hoje ausente mas que sempre acreditou em mim. Ao meu irmão e irmã, cunhado e cunhada pelo apoio e compreensão nos momentos necessários. Ao meu sobrinho Miguel, pela curiosidade e incentivo em sempre querer fazer “ciências”.

À Fernanda Penido, pelo apoio e incentivo. Pela ajuda em todos os momentos práticos, estatísticas e traduções. Pelo companheirismo nas viagens para congressos e sobre tudo pelo carinho e amizade verdadeira.

À amiga Luciana Faleiro, pelo companheirismo e otimismo. Por sempre acreditar em mim, por ser orientadora, conselheira, confidente, psicóloga e acima de tudo amiga. Por ser um grande exemplo de persistência, de profissionalismo e de pessoa.

Ao Cosme Barbosa, pelo incentivo e parceria desde o começo. Por fazer parte do meu desenvolvimento sempre com muita alegria, compartilhar momentos de descontração e pela grande amizade.

À Beatriz Silva (Bernucci) por ser sempre uma presença de paz, pela tranquilidade que transmite, pelos bons conselhos, por estar presente desde o começo de tudo, e pela amizade.

À Murielle e Vanessa por serem sempre amigas, companheiras e presentes nos momentos de trabalho e lazer. À Verônica e Bárbara, companheiras de mestrado compartilhando todos os aprendizados e momentos.

À Profa. Dra. Roseane Batitucci Passos de Oliveira pelo carinho, incentivo e pelas conversas com toques de ensinamentos práticos.

À Ronália, por ser amiga e companheira nos momentos de mestrado, de trabalho e de descontração. À Raimunda pelo apoio, acolhimento e incentivo, por ser parceira e amiga. Às secretárias e amigas Maria Ângela e Úrsula pela ajuda nas questões administrativas e principalmente pela amizade e incentivos constantes. Ao Gabriel Barbosa pelo incentivo, por ser um exemplo e pela ajuda nas análises cromatográficas, nestas análises agradeço também a ajuda do Gustavo Cosenza.

A todos os alunos de iniciação científica, monitoria, mestrado e doutorado que passaram pelo LAMIB e deixaram sua contribuição neste trabalho e na vida.

## EPÍGRAFE

*Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.*

*Fernando Pessoa*



## RESUMO

Fungos endofíticos provenientes de sementes oleaginosas interagem fisiologicamente com seu hospedeiro e, para isto, dependem de inúmeros metabólitos como as enzimas lipolíticas. As reações de esterificação entre álcoois e ácidos orgânicos catalisadas por enzimas lipolíticas podem ser utilizadas na produção de ésteres, os quais são usados como *flavor* em alimentos, bebidas, fármacos e cosméticos. O objetivo do presente trabalho foi isolar e selecionar fungos endofíticos de sementes de baru (*Dipteryx alata*), cacau (*Theobroma cacao* L.), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) e macaúba (*Acrocomia aculeata*), potencialmente produtores de enzimas lipolíticas aplicáveis na área de alimentos. Foram isolados 16 fungos filamentosos endofíticos a partir de sementes oleaginosas, dentre os quais três apresentaram halos de hidrólise em meio seletivo contendo óleo de oliva, sendo estes fungos provenientes de sementes de baru, macaúba e jervá (B1, M6 e J4) com Índice de Atividade Enzimática (IAE) 3,82; 1,89 e 1,28, respectivamente. O fungo isolado da semente de jervá se destacou nos valores de atividade lipolítica ( $1,2 \text{ U.L}^{-1}$ ) avaliada pelo teste de hidrólise de pNPP e foi identificado molecularmente como *Fusarium* sp. O preparado bruto enzimático contendo enzima lipolítica (PBE) produzido por esse fungo foi capaz de promover a conversão de ácido acético e ácido butírico em acetato de butila e butirato de butila por esterificação (87,96% e 31,87% de taxa de conversão, respectivamente) em 24 h. A partir da otimização da reação de síntese do acetato de butila foi possível produzir este éster com 87,25% de taxa de rendimento em  $\frac{1}{4}$  do tempo com 0,9 g de enzima e  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ácido acético e butanol. A detecção e identificação do acetato de butila sintetizado foram realizadas por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Esse trabalho permitiu verificar o potencial de uso de enzimas lipolíticas de *Fusarium* sp. isolado de jervá na síntese de acetato de butila, um éster com aroma de abacaxi, utilizado na indústria de alimentos. Estudos de purificação, imobilização e capacidade de reação de esterificação com outros substratos podem levar a futuras aplicações biotecnológicas desta enzima lipolítica.

**Palavras-chave:** sementes oleaginosas, fungo endofítico, enzima lipolítica, fermentação submersa, esterificação, acetato de butila, otimização

## ABSTRACT

Endophytic fungi from oilseed plants physiologically interact with their host and, therefore, depend on numerous metabolites such as lipolytic enzymes. The esterification reactions between alcohols and organic acids catalyzed by lipolytic enzymes can be used in the manufacture of esters which are used as *flavor* in foods, beverages, pharmaceuticals and cosmetics. The present work aimed to isolate and select endophytic fungi from baru (*Dipteryx alata*), cocoa (*Theobroma cacao* L.), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) seeds, that are potential producers of lipolytic enzymes applicable in the food area. Sixteen endophytic filamentous fungi were isolated from oilseeds, three of them showed hydrolysis halo in selective medium containing olive oil. These fungi were from baru, macaúba and jervá seeds (B1, M6 and J4) with enzymatic activity index (EAI) 3.82; 1.89 and 1.28, respectively. The isolated fungus from jervá seed stood out for its lipase activity values (1.2 U.L<sup>-1</sup>) evaluated by pNPP hydrolysis test and was identified molecularly as *Fusarium* sp. The lipolytic enzyme produced by this fungus was able to promote the synthesis of butyl acetate and butyl butyrate by esterification (conversion rates of 87.96% and 31.87%, respectively) for 24 h. It was possible to produce this ester with a yield rate of 87.25% in a quarter of the time with 0.9 g of enzyme and 200 mmol.L<sup>-1</sup> of acetic acid and butanol, from the optimization of butyl acetate synthesis reaction. The confirmation of synthesized butyl acetate were performed by gas chromatography-mass spectrometry. This work has shown potential use of lipolytic enzymes from *Fusarium* sp. isolated from jervá in synthesis of butyl acetate, an ester with pineapple *flavor*, used in the food industry. Studies of purification, immobilization of this enzyme and its esterification reaction with other substrates may lead to future biotechnology applications of this lipolytic enzyme.

**Keywords:** oilseeds, endophytic fungus, lipolytic enzyme, submerged fermentation, esterification, butyl acetate, optimization

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Frutos e sementes de baru (1A), cacau (1B), jerivá (1C) e macaúba (1D) .....	22
Figura 2 – Taxol, substância anticâncer produzida pelo fungo <i>Taxomyces andreanae</i> .....	26
Figura 3 – Quadro de classificação internacional de enzimas.....	29
Figura 4 – Quadro com aplicações de enzimas em indústrias de alimentos....	32
Figura 5 – Hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos livres.....	36
Figura 6 – Reações catalisadas por lipase.....	37
Figura 7 – Mecanismo de ativação interfacial de lipase em interfaces hidrofóbicas.....	39
Figura 8 – Quadro de aplicações industriais de lipase.....	41
Figura 9 – Reação de esterificação catalisada por lipases.....	45
Figura 10 – Ésteres utilizados na indústria de alimentos.....	46
Figura 11 – Ágar PDA com fragmentos de sementes.....	54
Figura 12 – Meio seletivo inoculado com culturas puras de forma pontual.....	56
Figura 13 – Meio para fermentação submersa .....	57
Figura 14 – Quadro de composições dos meios de fermentação submersa....	57
Figura 15 – Fungos isolados de baru, cacau, jerivá e macaúba.....	64
Figura 16 – Produção de halos de hidrólise em meio seletivo contendo óleo de oliva por fungos endofíticos isolados de sementes oleaginosas.....	65
Figura 17 – Produção de halo de hidrólise em meio seletivo contendo óleo de oliva por fungo endofítico (J4) isolado de semente de jerivá.....	66
Figura 18 – Comparação das condições de fermentação: fungos B1 e M6 (17A); J4 (17B) .....	68
Figura 19 – J4: <i>Fusarium</i> sp. isolado de semente de jerivá.....	69
Figura 20 – Gráfico de esterificação enzimática dos ácidos acético, butírico e oleico.....	71
Figura 21 – Gráfico de Pareto da otimização da reação de esterificação.....	74
Figura 22 - Gráfico de superfície de resposta dos efeitos combinados de quantidade de enzima e tempo sobre a resposta conversão em éster.....	75
Figura 23 – Gráfico de superfície de resposta dos efeitos combinados de concentração molar dos reagentes e quantidade de enzima sobre a resposta conversão em éster.....	76
Figura 24 – Resultados do teste de estabilidade enzimática frente ao ácido acético.....	77
Figura 25 – Cromatograma representando acetato de butila, butanol e ácido acético.....	79
Figura 26 – Espectro de massas do acetato de butila obtido a partir da esterificação.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela dos valores codificados e reais das variáveis no delineamento experimental.....	61
Tabela 2 – Delineamento experimental para a produção enzimática de acetato de butila em meio orgânico.....	62
Tabela 3 – Seleção de fungos endofíticos com potencial de produção de lipase.....	66
Tabela 4 – Resultado do delineamento experimental para a produção enzimática de acetato de butila em meio orgânico.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B1	Fungo isolado de baru
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Enzyme Commission Number
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
GRAS	Generally Recognized As Safe
IAE	Índice de Atividade Enzimática
J4	Fungo isolado de jerivá
LAMAC	Laboratório Multiusuários de Análises Cromatográficas
LAMIB	Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Microbiologia Industrial e Biocatálise
M6	Fungo isolado de macaúba
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
NIST	National Institute of Standards and Technology
PBE	Preparado Bruto Enzimático contendo enzima lipolítica
PDA	Potato Dextose Ágar
pH	Potencial Hidrogeniônico
pNP	<i>para</i> -nitrofenol
pNPP	<i>para</i> -nitrofenil palmitato
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
YM	Extrato de malte - extrato de levedura

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 – REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 – Bioprospecção.....	18
2.2 – Plantas com Semente Oleaginosa.....	19
2.3 – Microrganismos Endofíticos.....	22
2.3.1 – Fungos Endofíticos.....	23
2.3.2 – Metabólitos Secundários de Fungos Endofíticos.....	25
2.4 – Enzimas.....	28
2.4.1 – Uso Industrial de Enzimas.....	30
2.4.2 – Enzimas na indústria de alimentos.....	32
2.4.3 – Processos fermentativos para obtenção de enzimas.....	34
2.5 – Lipases.....	35
2.5.1 – Produção de lipase .....	39
2.5.2 – Aplicações industriais de lipase .....	41
2.5.3 – Lipases na área de alimentos.....	44
2.5.4 – Esterificação por lipases .....	45
2.6 – Otimização (Delineamento experimental e Metodologia de superfície de resposta).....	48
2.7 – Ferramentas de detecção (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas CG-EM).....	50
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	52
3.1 – Objetivo geral.....	52
3.2 – Objetivos específicos.....	52
<b>4 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
4.1 – Materiais químicos.....	53
4.2 – Coleta do material biológico .....	53
4.3 – Isolamento e preservação de fungos endofíticos.....	54
4.4 – Seleção de fungos endofíticos com atividade lipolítica.....	55
4.4.1 – Índice de atividade enzimática –IAE (Seleção primária) .....	55
4.4.2 – Seleção por fermentação submersa (Seleção secundária) .....	56
4.4.2.1 – Método espectrofotométrico.....	58

4.5 – Identificação molecular do fungo.....	58
4.6 – Reação de esterificação.....	60
4.6.1 – Titulometria de neutralização.....	60
4.7 – Otimização da esterificação usando metodologia de superfície de resposta.....	61
4.8 – Teste de estabilidade do PBE frente ao ácido utilizada na esterificação.....	62
4.9 – Análise cromatográfica.....	63
4.10 – Análise estatística .....	63
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
5.1 – Isolamento e seleção fungos endofíticos.....	64
5.2 – Atividade lipolítica de fungos endofíticos.....	67
5.3 – Identificação molecular do fungo endofítico.....	69
5.4 – Esterificação.....	70
5.5 – Otimização da reação de esterificação.....	72
5.6 – Detecção do acetato de butila .....	78
<b>6 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

Uma das maneiras de se extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção, termo que academicamente pode ser entendido como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e, eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto (SACCARO JÚNIOR, 2011).

Os fungos são organismos que apresentam diversidade na sua preferência por “habitats” e constituem um elemento necessário em ecossistemas. Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior dos tecidos da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007). Podem ser encontrados habitando inter e intracelularmente os tecidos vegetais, sendo encontrados em todas as espécies de plantas já investigadas (TAN e ZOU, 2001). Fungos endofíticos vivem em mutualismo com plantas hospedeiras, recebendo nutrientes e produzindo compostos químicos que protegem e auxiliam a planta em certas condições de estresse. E, ainda, podem produzir compostos de importância biotecnológica (SANTOS *et al.*, 2013).

A busca por novos composto produzidos por fungos endofíticos pode ser direcionada pelo ambiente em que se encontram, uma vez que a planta hospedeira tem grande importância no metabolismo geral dos microrganismos endofíticos (BILLS *et al.*, 2002). Muitas espécies de plantas tropicais mostram-se como promissoras fontes de compostos bioativos. As sementes abrigam fungos, que estão presentes no seu ciclo de vida e são transmitidos sem causar quaisquer sintomas externos (PETRINI, 1986). O interesse por plantas oleaginosas tem aumentado, e plantas como baru, cacau, jerivá e macaúba que possuem sementes oleaginosas são promissoras. O baru é uma espécie do cerrado com grande potencial econômico, sua semente possui ácidos de interesse industrial e elevado teor de lipídeos (TOGASHI e SGARBIERI, 1994). O cacau é um fruto de grande importância econômica, além da produção de chocolate, suas amêndoas podem ser utilizadas em outras formulações em diversas indústrias (LENCI, 2002). O jerivá possui uma semente oleaginosa composta de 52% de óleo, apresentando-se como potencial fonte alternativa de óleo (MOREIRA, 2011). A macaúba é uma palmeira de grande interesse socioeconômico,



sua semente apresenta alto teor lipídico e também pode ter várias aplicações industriais (FARIA, 2010).

A versatilidade de fungos em se estabelecer em nichos ecológicos pode ser devida, em parte, à capacidade de produzirem eficientemente enzimas extracelulares, o que permite que se adaptem às condições ambientais (GOPINATH *et al.*, 2005). Assim, é grande a possibilidade de se encontrar fungos produtores de enzimas relacionadas aos substratos presentes em plantas (como lipídeos, celulose, entre outros) que podem ser explorados comercialmente (STROBEL *et al.*, 2004).

As enzimas são biocatalisadores ativos e versáteis que executam reações de maneira rápida, específica, em condições brandas de reação (GONÇALVES, 2007). Podem ter origem animal, vegetal ou microbiana (MARTINS *et al.*, 2008), estas últimas apresentam grande potencial biotecnológico, sendo empregadas em diversas indústrias como a têxtil, de papel, de detergentes e alimentícia, entre outras (JOSEPH *et al.*, 2008; KIRK *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; VAN BEILEN e LI, 2002).

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis fornecendo diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres e apresentam uma capacidade única de agir na interface orgânico-aquosa (BON *et al.*, 2008). Entretanto, essas enzimas também apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes orgânicos, facilitando a catálise de muitas reações, tais como esterificação e transesterificação (MARTINS *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2009). As lipases, produzidas por microrganismos em meio líquido ou em meio sólido, apresentam amplas aplicações industriais, tais como indústria de cosméticos e perfumarias, químicas e farmacêutica, na indústria de combustíveis e no processamento de alimentos (WENZEL *et al.*, 2013). Na indústria alimentícia, estas enzimas podem ser empregadas na hidrólise seletiva de óleos e gorduras para obtenção de ácidos graxos livres que influenciam as propriedades sensoriais, físico-químicas e nutricionais dos produtos (JAEGER e REETZ, 1998). As lipases também podem participar da aceleração do processo de maturação de queijos, na hidrólise da gordura do leite e, ainda, no processo de panificação (CASTRO *et al.*, 2004).

A capacidade de catalisar reações de esterificação em meio orgânico é uma das aplicações das lipases de grande interesse na indústria de alimentos para a síntese de ésteres de aromas. Estes ésteres, presentes naturalmente em frutas, podem ser obtidos pela esterificação de álcoois e ácidos orgânicos e são usados como

*flavor* e fragrâncias em alimentos, bebidas, fármacos e cosméticos (SILVA *et al.*, 2014). Essa diversidade de áreas comerciais onde podem ser aplicadas lipases tem levado a um aumento nas buscas por enzimas microbianas com propriedades novas e adaptadas a diferentes condições. Vários estudos demonstraram a obtenção de ésteres sintetizados por lipases de origem microbiana (ARAGÃO *et al.*, 2009; MAHAPATRA *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2011; SALAH *et al.*, 2007; SALIHU *et al.*, 2014; SKORONSKI *et al.*, 2013), e o estudo do potencial lipolítico de fungos endofíticos torna-se muito promissor em processos biotecnológicos, especialmente na área de síntese de aromas. Desta forma, este trabalho tem como objetivo isolar e selecionar fungos endofíticos de sementes oleaginosas de baru, cacau, jerivá e macaúba, potencialmente produtores de enzimas lipolíticas aplicáveis na área de alimentos. E, ainda avaliar a produção e a capacidade destas enzimas em realizar reação de esterificação para conversão em ésteres aromáticos.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bioprospecção

Uma das maneiras de se extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção, termo que academicamente pode ser entendido como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e, eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto (SACCARO JÚNIOR, 2011).

Segundo o inciso VII do artigo 7º da Medida Provisória n.º 2.186-16/2001, bioprospecção é qualquer atividade exploratória que visa identificar componente do Patrimônio Genético e informação sobre Conhecimento Tradicional Associado, com potencial de uso comercial.

Em 2003, estimava-se que cerca de 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica eram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003). Em 2011, esse valor já cresceu para cerca de 50% (SACCARO JÚNIOR, 2011), sendo que, no caso dos medicamentos anticâncer acredita-se que dois terços destes sejam de origem natural, provenientes de organismos marinhos e terrestres (UNU-IAS, 2005). Considerando a grande quantidade de metabólitos atuais desenvolvidos a partir de moléculas biológicas, torna-se evidente o papel da bioprospecção no desenvolvimento tecnológico.

De acordo com o art. 1º da Orientação Técnica nº 6 do CGEN, para fins de aplicação do disposto no art. 7º, inciso VII, da Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, considera-se identificado o “potencial de uso comercial” de determinado componente do Patrimônio Genético no momento em que a atividade exploratória confirme a viabilidade de produção industrial ou comercial de um produto ou processo a partir de um atributo funcional desse componente.

## 2.2 Plantas Com Sementes Oleaginosas

As oleaginosas são plantas que contêm um alto teor de óleo que podem ser obtidos tanto a partir de suas sementes (soja, canola, girassol) como a partir de seus frutos (palma, babaçu, coco), podendo ser utilizadas para a produção de óleo vegetal e em diferentes aplicações como, por exemplo, na alimentação e biocombustíveis (MEDEIROS, 2006). Estas plantas são importantes fontes de óleo vegetal que são utilizados, como matéria prima, nas indústrias farmacêutica e alimentícia, representando o segundo grupo de plantas cultivadas no mundo, tanto do ponto de vista econômico-social como nutricional (ALMEIDA *et al.*, 2010). A diversidade de culturas oleaginosas a serem empregadas é grande e varia conforme as características de cada região. O Brasil é um país de grande biodiversidade, o que explica sua riqueza em plantas oleaginosas. Entretanto, suas culturas são restritas à fins alimentícios, subutilizando algumas espécies com alto rendimento lipídico (OLIVEIRA e COSTA, 2003).

Strobel e Daisy (2003) afirmaram que a seleção de plantas para o isolamento de fungos endofíticos interessantes do ponto de vista químico e biológico, deveria ser baseada em alguns critérios. Dentre estes critérios, as plantas hospedeiras deveriam ser relevantes para uma população, ter sua origem e histórico conhecidos, serem adaptadas ao meio ambiente e crescer em regiões de alta biodiversidade. A busca por novos metabólitos era feita principalmente pelo rastreio aleatório de isolados. Na otimização da busca de novos metabólitos secundários bioativos, é relevante considerar que os metabólitos sintetizados pelos fungos podem corresponder aos seus respectivos nichos ecológicos. As interações metabólicas podem aumentar a síntese de metabólitos secundários, assim, os fungos rastreados devem ter interações metabólicas com o seu ambiente (SCHULZ *et al.*, 2002).

Bills *et al.* (2002) descreveram uma distinção, através de dados estatísticos, que compara o número de produtos naturais bioativos isolados de endofíticos de regiões tropicais com o número dos isolados de endofíticos de regiões temperadas. Eles descobriram que endofíticos tropicais fornecem produtos naturais mais ativos e numerosos do que os endofíticos de clima temperado. Esta observação sugere a importância da planta hospedeira influenciando o metabolismo geral dos microrganismos endofíticos (BILLS *et al.*, 2002). Muitas espécies tropicais mostram-

se como promissoras fontes de compostos bioativos, como fenólicos, carotenóides e tocoferóis, além de conterem quantidades significantes de ácidos graxos essenciais. As sementes dessas plantas também abrigam fungos endofíticos que estão presentes no seu ciclo de vida e são transmitidos na semente madura sem causar quaisquer sintomas externos (PETRINI, 1986). A fim de estudar as sementes, se faz necessário compreender suas funções fisiológica. Basicamente, as sementes são compostas por duas partes fundamentais: a casca ou tegumento e o núcleo. A casca é a camada externa da semente que recobre o núcleo, sendo este considerado a parte principal da semente. O núcleo tem duas partes: o embrião ou germe que irá formar a nova planta quando a semente germinar e o endosperma, que armazena os nutrientes de reserva que vão alimentar a planta nos primeiros estágios de desenvolvimento (QUETTIER e EASTMOND, 2009).

A deterioração de sementes oleaginosas é um fator crítico durante a colheita e armazenamento de sementes (VENKATESAGOWDA *et al.*, 2012). A presença de fungos nestas sementes durante a estocagem e os altos índices de ácidos graxos livres presentes nos óleos produzidos parecem evidenciar a ação de lipases fúngicas (WARD *et al.*, 1961). Essa observação levou a investigação sobre a produção de lipases por fungos em sementes de girassol (ROBERTS *et al.*, 1987), amêndoa de cacau (GUEHI *et al.*, 2007), amendoim, coco (ISMAIL, 2000), gergelim, e linhaça (MONDAL e NANDI, 1984);

Muitas enzimas são produzidas somente na presença de uma substância indutora, enquanto outras podem ter a sua atividade melhorada. Lipases são produzidas na presença de triglicerídeos, ácidos graxos ou outros lipídeos (SHIMADA *et al.*, 1992; TSUJISAKA *et al.*, 1973). Montesino *et al.* (1996) confirmaram que o ácido oleico é o principal indutor da produção de lipase. Neste contexto, as plantas com sementes oleaginosas podem ser promissoras para o isolamento de fungos produtores de enzimas lipolíticas, uma vez que possuem alto teor de lipídeos em sua composição. Podemos citar como sementes oleaginosas de interesse o baru, cacau, jerivá e macaúba.

O baru (*Dipterix alata*) é uma das espécies do cerrado com relevante potencial econômico devido ao seu uso múltiplo: madeireiro, alimentar e industrial entre outros. A semente (Figura 1A) possui alto teor de ácido oleico e linoleico de grande utilização na indústria farmacêutica e alimentícia. O ácido oleico pode ser usado em inúmeras aplicações industriais como lubrificante para equipamentos,

cosméticos e intermediários químicos (ésteres, aminas, amidas) minimizando subprodutos indesejáveis (SANO *et al.*, 2004; VERA *et al.*, 2009). A semente contém valor energético mais elevado que a polpa, na sua maioria composta de lipídeos (40,2%) e proteínas (29,6%), fibras solúveis e menor quantidade de açúcares (TOGASHI *et al.*, 1994).

O cacau (*Theobroma cacao* L.) (Figura 1B) é uma alternativa econômica de grande importância para o sul da Bahia. A manteiga de cacau é a gordura comestível natural da semente do cacau, em função da sua composição química e características físicas. A composição do cacau é 49% lipídeos, 27% proteínas, 18% carboidratos e 8% fenóis totais (LENCI, 2002). Além de ser usada como ingrediente na fabricação do chocolate é muito aplicada em formulações cosméticas e dermatológicas, sendo, portanto, de grande importância para a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

O jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) é da família Arecaceae, sendo conhecida popularmente como coco-de-cachorro, baba-de-boi, coco-de-catarro, coco-de-babão e distribuiu-se em toda a América do Sul (LORENZI, 2000). O fruto (Figura 1C) é amarelo e ovalado, a parte externa, carnosa, é composta de uma mucilagem adocicada muito apreciada por alguns animais, ou mesmo pelo ser humano. Internamente possui uma pequena amêndoa bem parecida com a do coco-da-baía rica em lipídeos e proteínas (COIMBRA, 2010). A amêndoa do jerivá contém em média 52,4% de volume de óleo, sendo este constituído principalmente por ácidos graxos saturados, totalizando 57,2% de massa. Essa característica, evidenciada no baixo índice de iodo (39,27 g I<sub>2</sub>/100 g), confere ao óleo uma elevada estabilidade à oxidação. O índice de acidez, por sua vez, apesar de ser um pouco elevado (4,9 mg KOH/g) não impede a realização da transesterificação alcalina. A caracterização físico-química preliminar demonstrou que o jerivá possui potencial considerável como fonte alternativa de óleo para a produção de biodiesel (MOREIRA, 2011).

A macaúba, (*Acrocomia aculeata*), é uma palmeira da família Arecaceae, está amplamente espalhada pela área do cerrado, ocorrendo no estado de Minas Gerais em três regiões: Norte, Alto Paranaíba e Zona Metalúrgica (MOTTA *et al.*, 2002). A planta é conhecida popularmente como bocaiúva, ou coco-de-macaúba. A polpa do fruto pode ser consumida *in natura* e a amêndoa (Figura 1D) oferece um óleo claro de boa qualidade nutricional (LORENZI, 2002). A amêndoa deste fruto tem despertado grande interesse socioeconômico e é referenciada como fonte de ácidos

graxos, tais como o oleico, láurico e palmítico (HIANE *et al.*, 2005). As amêndoas da macaúba, apresentam alto teor lipídico (51,7%), teores de proteína e fibra em cerca de 17,6% e 15,8%, respectivamente (HIANE *et al.*, 2006). Esta apresenta grande potencial econômico, sendo o óleo empregado no setor alimentício, de cosmético e de energia (biodiesel) (FARIA, 2010).



Figura 1 – Frutos e sementes de baru (A), cacau (B), jervá (C) e macaúba (D)

Fonte: (A): Mcientífica, 2015; (B): Portal Arapiraca, 2015; (C): Colecionando Frutas, 2015; (D): Paulo Hilst, 2015.

### 2.3 Microrganismos Endofíticos

Os microrganismos desempenham funções únicas e fundamentais na manutenção de ecossistemas e são essenciais para o meio ambiente como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Entretanto, estima-se que apenas 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (BURCKE *et al.*, 2011).

Os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, entretanto, quem primeiro delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas foi Bary, em 1866 (AZEVEDO *et al.*, 2002). Apenas no fim da

década de 70, os microrganismos endofíticos começaram a adquirir importância científica, quando foi verificado que eles apresentam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, doenças e herbívoros (AZEVEDO *et al.*, 2002). A definição mais ampla de endofíticos diz que "são todos microrganismos, cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar dano ao hospedeiro e que não desenvolvem estruturas externas, excluindo desta maneira bactérias nodulantes e fungos micorrízicos" (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007).

Os estudos sobre microrganismos endofíticos se intensificaram na década de 80, pois apesar de devidamente comprovada a existência da microbiota endofítica, aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessas interações ainda devem ser melhor esclarecidos. Há bactérias, leveduras e fungos filamentosos endofíticos, e o conhecimento da diversidade desses organismos é de extrema importância, visto que os estudos aumentam as informações sobre a microbiota endofítica, elucidando as bases biológicas existentes sobre essas interações (SCHULZ *et al.*, 2002).

### **2.3.1 Fungos Endofíticos**

Os fungos apresentam uma grande diversidade entre si, porém possuem características em comum que os distinguem dos demais reinos (AZEVEDO *et al.*, 2002). São organismos historicamente comparados às plantas, com destacada habilidade para utilizar quase qualquer fonte de carbono como alimento. Realizam nutrição absorptiva liberando enzimas no meio em que habitam, quebrando macromoléculas presentes no meio, tais como carboidratos, proteínas e lipídios, em moléculas menores e mais solúveis, facilitando sua absorção (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Outras fontes como, fósforo, cálcio, potássio, magnésio e elementos traços também são utilizadas por estes microrganismos (KIRK *et al.*, 2002). Outra característica importante é sua fonte primária de reserva de carboidratos que é o glicogênio, ao contrário das plantas que têm o amido para desempenhar esta função. São aeróbios em sua maioria, apesar de alguns estarem envolvidos em processos fermentativos, sendo em alguns casos, capazes de sobreviverem em condições de anaerobiose (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). As paredes celulares fúngicas, principalmente a dos fungos filamentosos, têm quitina em sua composição, tornando-



as rígidas e espessas. Existem fungos não filamentosos, as leveduras, que são unicelulares e reproduzem-se por brotamento. Outros ainda, formam estruturas macroscópicas como os cogumelos comestíveis (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Estima-se que o reino Fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta (AZEVEDO *et al.*, 2002). Entretanto esse número refere-se apenas aos fungos epifíticos ou externos, estando certamente subestimado, tendo em vista que a quase totalidade das plantas vasculares já examinadas abrigam fungos endofíticos, independentemente da diversidade do ecossistema considerado (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Hawksworth e Rossman (1997) sugeriram que uma planta poderia ser habitat de cerca de seis espécies de fungos, mas depois da inclusão de fungos endofíticos, essa relação foi aumentada para cerca de 33 espécies de fungos para cada planta, confirmando o fato de que os endofíticos são um componente importante da diversidade microbiana (STROBEL e DAISY, 2003; TAN e ZOU, 2001). Em quase todas as plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias, estudadas até o momento, foram encontrados bactérias e fungos endofíticos. Normalmente, várias espécies de endofíticos podem ser isolados de uma única planta, sendo que pelo menos um é específico ao hospedeiro (TAN e ZOU, 2001). A taxa dos fungos endofíticos, que são mais frequentemente relatados, tendem a pertencer a grupos de fungos compostos tanto por endofíticos, quanto por parasitas morfológicamente semelhantes (GANLEY *et al.*, 2004).

A biodiversidade dos fungos endofíticos é composta por vários gêneros como: *Arthrobotrys*, *Dendrophora*, *Diatrypella*, *Oudenmansiella*, *Mucor* e *Phlebiopsis*, *Botryosphaeria*, *Coprinus*, *Curvularia*, *Eutypella*, *Fusarium*, *Microdochium* e *Glomerella* (VIEIRA, 2008), e também *Neotyphodium*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Aternaria*, dentre vários outros que são frequentemente relatados em outros trabalhos (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os microrganismos endofíticos podem ser transmitidos à espécie hospedeira de maneira horizontal por lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. A infecção também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o microrganismo endofítico pode se instalar em uma planta por toda sua vida (ALY *et al.*, 2011; MELO

e AZEVEDO, 1998). O mecanismo de relação entre endofíticos e planta não foi totalmente elucidado. Estas relações podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. As relações antagonistas são estudadas pela fitopatologia. Nas interações simbióticas as plantas podem conseguir algumas vantagens, já que os microrganismos podem produzir ou induzir a produção de compostos (metabólitos primários e secundários) que promovam a diminuição da herbivoria, do ataque de insetos, aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (ARAUJO, 1996; SCHARDL *et al.*, 2004).

Fungos endofíticos vivem em mutualismo com plantas hospedeiras, recebendo nutrientes e produzindo compostos químicos, como fitohormônios, alcaloides e antibióticos, entre outros, que protegem e auxiliam a planta em certas condições de estresse, podendo ainda produzir compostos de importância biotecnológica, como enzimas. O isolamento e a utilização destes metabólitos em bioensaios são uma alternativa na busca de compostos bioativos no controle biológico e na produção de compostos com alto valor agregado (SANTOS *et al.*, 2013). Os fungos endofíticos produzem as enzimas necessárias para colonizar seus hospedeiros. O crescimento neste habitat envolve a interação metabólica contínua entre fungo e o hospedeiro (SCHULZ *et al.*, 2002). Assim, a produção do metabólito está intimamente relacionada com o ambiente onde ele se encontra.

### **2.3.2 Metabólitos Secundários de fungos endofíticos**

Considerando-se que apenas um número pequeno de microrganismos endofíticos foram estudados, várias pesquisas estão sendo direcionadas para avaliar o potencial destes microrganismos em processos biotecnológicos, como na produção de compostos bioativos. A pesquisa por novos compostos é de grande interesse e contínua, Schulz *et al.* (2002) sugerem que a busca por novos metabólitos secundários, oriundos da natureza, deve ser feita em organismos que habitam nicho ecológicos ainda pouco explorados, e neste contexto, se inserem os fungos endofíticos.

Os produtos naturais (fitohormônios, antimicrobianos, fungicidas e herbicidas) são metabólitos de grande importância nas interações entre o endofítico e a planta hospedeira e podem atuar em processos de sinalização, defesa e regulação

da simbiose (SCHULZ e BOYLE, 2005). Fungos endofíticos estão em constante interação com a planta hospedeira e são tidos como excelentes fontes de produtos naturais bioativos (SCHULZ *et al.*, 2002).

Uma vantagem em identificar microrganismos endofíticos produtores da mesma substância bioativa produzida pelos vegetais é a eliminação das etapas de plantio, colheita e extração de plantas raras ou de crescimento lento, uma vez que estes compostos podem ser produzidos em processos fermentativos, que são mais rápidos, reduzem o valor do produto e ainda preservam a biodiversidade (STROBEL *et al.*, 2002). A extração de compostos bioativos de fontes naturais está sob a dependência de recursos sazonais, climáticos e possíveis problemas ecológicos envolvidos com a extração, assim se tornam necessárias abordagens inovadoras para se obter tais compostos (BICAS *et al.*, 2009).

STROBEL *et al.* (1996) reportaram a habilidade dos fungos endofíticos produzirem *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira. Um exemplo importante a ser mencionado é o taxol (Figura 2), a primeira droga anticâncer a alcançar um mercado mundial de bilhões de dólares, encontrado inicialmente em pequenas quantidades na casca da planta *Taxus brevifolia*, de crescimento lento na região do noroeste do Pacífico (GUNATILAKA, 2006; STROBEL *et al.*, 2003; STROBEL *et al.*, 1996; TAN e ZOU, 2001). Após a realização de inúmeros estudos envolvendo este vegetal, foi isolado tal composto de um endofítico desta planta, o fungo *Taxomyces andreanae*, capaz de produzir o taxol, resultando em uma nova possibilidade de se produzir e obter a droga por via fermentativa (LI *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1998; STROBEL *et al.*, 1996).

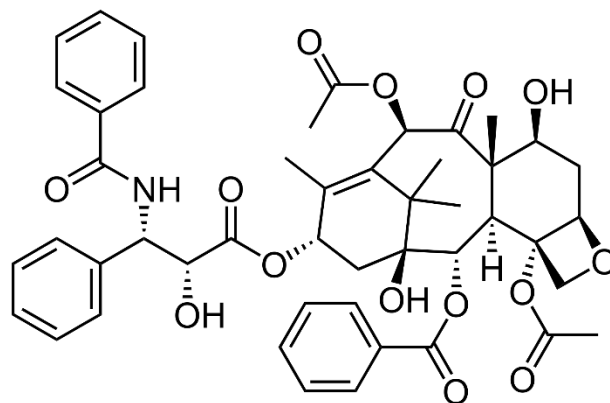


Figura 2 – Taxol, substância anticâncer produzida pelo fungo *Taxomyces andreanae*

Fonte: Strobel e Daisy, 2003

Os fungos endofíticos demonstram ser uma fonte rica de compostos naturais novos, com um amplo espectro de atividades biológicas e um elevado nível de diversidade estrutural (SCHULZ *et al.*, 2002). A utilização de endofíticos como biocatalisadores no processo de biotransformação de produtos naturais assume maior importância. Entretanto, a utilização de microrganismos pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas para a obtenção de compostos de interesse é ainda modesto, considerando a grande disponibilidade de microrganismos úteis e do grande âmbito de reações que podem ser realizadas por eles (PIMENTEL *et al.*, 2010). Cabe ressaltar ainda que grande parte das substâncias bioativas obtidas a partir de extratos fúngicos podem ser empregadas diretamente como fármacos. Diversos compostos produzidos por fungos endofíticos já foram descritos na literatura, como os esteroides (MARINHO *et al.*, 2009), ácidos fenólicos, alcaloides, fenilpropanoides, (ZHANG *et al.*, 2006), citocalasinas, isocumarinas, terpenos, benzopiranos, tetralonas (CHAPLA *et al.*, 2012) e ainda antibióticos, imunossupressores e redutor de colesterol (DEMAIN e FANG, 2000). Outros compostos foram modificados pelo fungo de modo a se obter novas moléculas com diferentes propriedades, tais como o aumento da atividade, toxicidade seletiva e a diminuição de efeitos colaterais indesejáveis. Mesmo quando estas substâncias não apresentam a atividade esperada, elas podem servir como protótipos para o planejamento e desenvolvimento de novas moléculas, o que evidencia ainda mais a importância do estudo de fungos endofíticos como fontes de novas substâncias (VAZ, 2012). Segundo Schulz (2002), 51% dos compostos bioativos isolados de fungos endofíticos possuem estrutura química desconhecida, que podem ser considerados como novos compostos bioativos.

A relação da indústria de alimentos com os fungos filamentosos é muito antiga, os fungos estão associados à tecnologia de alimentos desde os primórdios das civilizações mais antigas conhecidas. Os fungos estão presentes nos processos de preparação de alimentos orientais, bebidas de povos indígenas no continente americano e, na Europa, participam no processamento de alimentos à base de leite. Já é possível conhecer o processo pelos quais os fungos modificam os alimentos, seja pela produção de metabólitos ou pela contaminação de alimentos processados. Os fungos vêm sendo muito utilizados na produção de enzimas, entre as importantes para a indústria alimentícia se destacam as amiloglucosidases, produzidas por linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus*; amilases, que transformam amido em dextrinas e oligossacarídeos e podem ser isoladas por fermentação de linhagens de *A. niger*, e

as lipases, que catalisam reversivelmente a hidrólise de triacilgliceróis sob condições naturais, podendo catalisar a transesterificação e a síntese estereoespecífica de ésteres em um grande número de substratos (MACEDO e PASTORE , 1997).

## 2.4 – Enzimas

As enzimas são biocatalisadores que aceleram as reações, e praticamente todas as reações bioquímicas são catalisadas por enzimas. Elas estão no centro dos processos catalisando a degradação e construção de moléculas, mantendo e modificando energia química a partir de precursores elementares. As enzimas são altamente eficientes, atuam diminuindo a energia de ativação e conseqüentemente aumentando a velocidade das reações (NELSON *et al.*, 2011). Enzimas são proteínas, e sua complexa estrutura molecular pode estar integrada com outras moléculas como carboidratos e lipídeos. Sua atividade catalítica, estabilidade e especificidade dependem de sua estrutura tridimensional, bem como de condições externas tais como pH, temperatura e força iônica do meio (LIMA *et al.*, 2001)

As enzimas são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas, podendo ser: oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases, como mostra a Figura 3 (NELSON *et al.*, 2011). Essas classes são posteriormente divididas em subclasses, para especificar o tipo de reação e a natureza química dos reagentes. Com essas características é definido um número código (EC), o qual foi normatizado pela *Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (ROSEVEAR *et al.*, 1987).

Figura 3 – Quadro de classificação internacional de enzimas

<b>Nº</b>	<b>Classe</b>	<b>Tipo de reação catalisada</b>
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de ligações duplas pela remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula para produzir formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C–C, C–S, C–O e C–N pelas reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: Nelson *et al.*, 2011.

As propriedades únicas de enzimas, tais como alta especificidade, ação rápida e biodegradabilidade permitem que processos na indústria possam ser executado sob condições de reação mais suaves, com melhores rendimentos e redução da geração de resíduos (ADRIO e DEMAINE, 2014).

As enzimas podem ser obtidas de fontes animais, vegetais ou microbianas. Tripsina, quimiotripsina, pancreatina, renina e a catalase são exemplos de enzimas de fonte animal com interesse na indústria (GONÇALVES, 2007). Outros exemplos compreendem a papaína, bromelina, e ficina, enzimas originárias de vegetais (PAQUES e MACEDO, 2006).

O uso de microrganismos como fonte de enzimas vem sendo cada vez mais utilizado em escala industrial por expressarem características desejadas para aplicação biotecnológica permitindo, não só o aumento na produção de enzimas de aplicação conhecida em outros processamentos, mas também a produção de novas enzimas de interesse comercial (GEHARTZ, 1990). Além disso, as enzimas microbianas são capazes de atuar em meio extracelular eficientemente, desde que o pH, a temperatura e o substrato estejam em condições adequadas para que ocorra a reação enzimática (COLEN, 2006).

As enzimas são muito utilizadas nas indústrias devido ao alto grau de especificidade das reações que catalisam, pois efetuam conversões eficientes,

econômicas, podem atuar em concentrações baixas, sob condições brandas de pH e temperatura e, principalmente, são biodegradáveis. As amilases, celulasas, pectinases, lipases e proteases são muito utilizadas em infindáveis aplicações, sendo úteis em vários setores da economia como os de detergentes, fármacos, têxtil e alimentício, o que demonstra a sua importância e potencialidade de usos (MACIEL, 2010; SILVA, 2010).

#### **2.4.1 – Uso Industrial de Enzimas**

Com o avanço das descobertas sobre o conhecimento de substâncias bioativas, o uso das enzimas produzidas por microrganismos deu um salto gigantesco, saindo da pequena escala, para o uso em escala industrial de produção (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2012). A biotecnologia moderna tornou possível fornecer enzimas com maiores atividades e adaptadas às diferentes condições de processo, permitindo uma expansão do seu uso industrial. O resultado é uma indústria altamente diversificada que ainda está crescendo tanto em tamanho quanto em complexidade (KIRK *et al.*, 2002).

As enzimas têm sido usadas desde o início da humanidade e devido à sua aplicação em ampla gama de setores, como indústria de laticínios, indústria agroquímica, fabricação de papel, nutrição, cosméticos, produtos farmacêuticos e biocombustíveis, a tendência é que haja um crescimento constante (RAY, 2012).

Em muitos processos as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas (WANDERLEY *et al.*, 2011). As enzimas possuem uma enorme aplicabilidade industrial e envolvem muito investimento e retorno financeiro com sua utilidade em indústrias, principalmente devido ao seu potencial em substituição aos processos que utilizam catalisadores químicos convencionais, assim tornam-se uma alternativa imprescindível ao desenvolvimento industrial sustentável (VITOLLO, 2001).

As aplicações das enzimas no mercado industrial mundial estão ligadas à Biotecnologia, e visam o uso de novas matérias-primas e a melhoria de processos e

das características físico-químicas de matérias-primas e produtos. Do ponto de vista industrial, uma enzima comercialmente utilizável é aquela que garante a obtenção de um produto final de melhor qualidade que o produto tradicional; a melhoria do processo de produção, reduzindo custos laboratoriais; a produção de produtos disponíveis de forma reduzida ou indisponíveis no mercado e a diminuição de resíduos ao final do processo (NETO *et al.*, 2001.)

No mínimo 75% de todas as enzimas industriais são hidrolíticas, sendo usadas para a degradação de várias substâncias naturais. As proteases dominam o mercado, contando com aproximadamente 40% de todas as vendas de enzimas, devido à sua utilização ampla na indústria de detergentes e panificação. As amilases e celulasas, utilizadas em indústrias como as de amido, têxtil, de detergentes e panificação, representam o segundo maior grupo. As lipases são o terceiro grupo de enzimas mais comercializadas (KIRK *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2001), e muitas empresas têm se dedicado à sua comercialização. A Novozymes, situada na Dinamarca, é a maior produtora seguida pela empresa americana DuPont e Roche com sede na Suíça (RAY, 2012). As principais enzimas microbianas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulasas e xilanases (BORÉM, 2005).

A demanda mundial por enzimas deverá aumentar 6,3 % por ano e será impulsionada pelo aumento da renda per capita nos países em desenvolvimento, o que resultará em ganhos fortes em enzimas associadas com a produção de alimentos e bebidas, produtos de limpeza e ração animal. O mercado total de enzimas industriais atingiu US \$ 3,3 bilhões em 2010 e estima-se chegar a um valor de US \$ 7 bilhões em 2017 (ADRIO e DEMAIN, 2014; FREEDONIA GROUP, 2014).

No segmento têxtil, as enzimas são utilizadas durante o processamento das fibras têxteis, com a vantagem de redução do volume e conteúdo poluente dos efluentes formados e diminuição do consumo de energia. No processamento de couros, as proteases degradam parcialmente a queratina e a elastina presentes (ANDREAU e CAVACO-PAULO, 2008). São utilizadas em todos os tipos de detergentes, e sua função é a degradação de compostos tipicamente proteicos, como sangue, manchas de ovos e leite (MAURER, 2004). Na indústria de papel e celulose, enzimas como as xilanases e celulasas são utilizadas no branqueamento das pastas, em substituição ao cloro, tradicionalmente utilizado para esse fim, porém muito tóxico ao meio ambiente (PAIVA e SÁ-PEREIRA, 2008). Já na indústria de cosméticos (enzimocsmética), as enzimas são utilizadas com o objetivo de facilitar/difícultar as



reações bioquímicas da pele, proteger/reparar a pele, destruir/remover parcial ou totalmente algumas estruturas da pele (SIM *et al.*, 2003)

#### 2.4.2 Enzimas na indústria de alimentos

As enzimas possuem papel importante na indústria de alimentos e bebidas (Figura 4). Elas podem ser utilizadas na produção de pães, queijos, laticínios, sucos, cerveja e produção de açúcar entre outras.

Figura 4 – Quadro com aplicações das enzimas em indústrias de alimentos e os microrganismos que as secretam.

Enzimas	Fonte	Atuação nos alimentos	Aplicação
$\alpha$ -Amilase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Microbacterium imperiale</i>	Hidrólise de goma de trigo, aumento do volume do pão	Amolecimento da massa; auxiliar na produção de açúcares para fermentação
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma spp.</i>	Hidrólise de celulose	Liquefação de frutas para produção de sucos
Lipase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Candida sp.</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol;	Tempero em produtos de queijo; modificação da função da gordura por interesterificação
Pectinase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium funiculosum</i>	Hidrólise da pectina	Clarificação de sucos de frutas por despectinização
Protease	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Cryphomectria parasítica</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Bacillus sp.</i>	Hidrólise de proteínas de animais e vegetais; hidrólise de glúten de trigo	Coagulação do leite para fabricação de queijo; produção de hidrolisados para sopas; melhoria da massa do pão

Fonte: Adaptado de Vitolo, 2001.

As enzimas  $\beta$ -glucanases são empregadas no preparo do mosto para fabricação de cerveja e são adicionadas às rações animais para aumentar a digestibilidade das  $\beta$ -glucanas presentes em grãos como trigo, cevada, aveia e centeio (KIRK, 2002).

Na panificação, o uso de enzimas é um processo necessário já que as farinhas utilizadas como matéria-prima possuem baixa atividade enzimática. O objetivo final da adição de amilases e proteases na massa do pão é facilitar sua manipulação nas máquinas (misturadores, laminadores, forno). As amilases também são responsáveis pelo aumento da disponibilidade de açúcar fermentescível na massa, melhorando o paladar e a qualidade da tostagem do pão (VITOLLO, 2001).

Na produção de laticínios, dentre as enzimas que coagulam o leite, a quimosina é a mais específica e hidrolisa as ligações peptídicas da K-caseína formadas pelos aminoácidos fenilalanina e metionina. Lipases e/ ou proteases também são utilizadas na produção de leites e derivados para modificar as propriedades funcionais das proteínas do leite, desenvolver sabores característicos, alterar a gordura da manteiga utilizada no preparo de caramelos, requeijões e condimentos (molhos). A lipase também é adicionada a ossos moídos para que estes sejam desengordurados previamente antes de servirem de matéria prima para a produção de gelatinas (VITOLLO, 2001). As proteases também têm sido empregadas para reduzir o tempo global da cura do queijo, já que este tempo representa um alto percentual dos custos de produção (USTUNOL e HICKS, 1990).

A dextranase, obtida do fungo *Penicillium funiculosum*, é utilizada para remoção do dextrânio do caldo de cana para a produção de açúcar (VITOLLO, 2001). Outras aplicações de enzimas na produção de alimentos e bebidas são produção de xaropes, eliminação da água oxigenada durante o processamento dos alimentos, desdobramento de óleos e gorduras, principalmente em laticínios; remoção do sabor amargo em cítricos, na fermentação do cacau, extração do óleo de oliva, maceração de polpas e na clarificação e extração de sucos e vinhos (BON *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2001).

### 2.4.3 Processos fermentativos para obtenção de enzimas

Diante das inúmeras vantagens do uso de enzimas mencionadas anteriormente, muitas pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de viabilizar o processo de produção destas em escala industrial, principalmente no que diz respeito à redução do custo de sua aplicação. Os microrganismos apresentam bom rendimento na produção da enzima, são de fácil cultivo, fácil manipulação e, principalmente, são considerados GRAS (Generally Recognized As Safe – Geralmente Reconhecido Como Seguro) (JAEGER e EGGERT, 2002).

Dois tipos básicos de fermentação são utilizados para a produção de enzimas: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). A fermentação submersa é a técnica majoritariamente utilizada para a produção de enzimas, seguidas de processos posteriores de recuperação e purificação do produto, devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (FEITOSA, 2009).

O processo de fermentação submersa consiste na introdução do microrganismo em meio líquido na forma de um inóculo. Nesse meio líquido, a água chega a constituir de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. A água possui várias funções em bioprocessos, tais como difusão de nutrientes, remoção de metabólitos, manutenção de estabilidade e estruturas biológicas entre outras. No cultivo de fungos a limitação da água pode causar desnaturação de enzimas e desequilíbrio nas vias metabólicas, e ainda afetar processos de esporulação, germinação e crescimento (CASTRO e PEREIRA, 2010). Na fermentação submersa o meio fica contido em fermentadores com controle de agitação e aeração, medidores de pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos microrganismos (MALAJOVICH, 2004). As vantagens desse processo são o fácil acompanhamento da formação do produto, consumo do substrato e controle dos parâmetros fermentativos, entretanto, de acordo com Pandey *et al.* (2000), este processo tem como uma desvantagem o grande volume de resíduos gerados.

A fermentação em estado sólido é baseada no crescimento dos microrganismos em suportes sólidos úmidos na ausência de água livre entre as partículas do material. Na FES a fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e

demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas. O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas, o substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais. Além disso, o crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais, o meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo (PINTO *et al.*, 2005). Segundo Aguilar *et al.* (2008) a fermentação em estado sólido possui desvantagens, como o uso restrito de microrganismos capazes de crescerem sob níveis reduzidos de umidade, a dificuldade em determinar parâmetros (pH, umidade, taxa de oxigênio livre e dióxido de carbono) e sua baixa utilização em largas escalas.

A escolha do meio fermentativo deve levar em consideração fatores que visam propiciar ao microrganismo o melhor ambiente para o desenvolvimento de todo o processo de fermentação. Entre os microrganismos, os fungos filamentosos tem melhor capacidade de se desenvolver em fermentação sólida, enquanto leveduras e bactérias, devido ao caráter unicelular, tem maior habilidade em absorver nutriente na fermentação submersa (SHARMA *et al.*, 2001). Para uma produção enzimática por fermentação em larga escala é importante a escolha do substrato, uma vez que substratos de alto custo podem elevar o valor do produto final (FERNANDES, 2004).

## 2.5 – Lipases

De forma geral, as características enzimáticas associadas à sua ampla variedade (oxidases, proteases, amilases, celulasas, lipases, dentre outras) vem despertando um crescente interesse nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia. Dentre estas, as lipases destacam-se cada vez mais no cenário da biotecnologia, devido à sua eficiência catalítica, estabilidade e propriedades (CASTRO *et al.*, 2004).

As enzimas lipolíticas ou lipases são um grupo de enzimas pertencentes a classe das hidrolases (E.C. 3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1) segundo a NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) (TIPTON, 1994). As triacilglicerol lipases (E.C. 3.1.1.3) são

enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis fornecendo diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres (Figura 5).

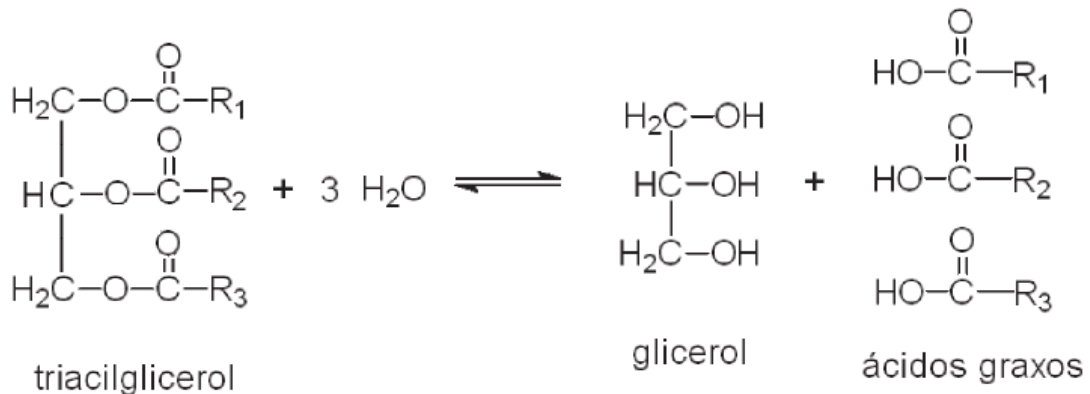


Figura 5 – Hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos livres.

Fonte: Adaptado de Química Nova Interativa, 2015.

Estas enzimas apresentam uma capacidade única de agir na interface orgânico-aquosa (BON *et al.*, 2008). Contudo, ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, facilitando a catálise de muitas reações, tais como esterificação, transesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (MARTINS *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2009). Castro *et al.* (2004) descreveram processos de biotransformação para lipases em reações de esterificação, hidrólise e interesterificação, para obtenção de produtos de interesse industrial do setor de óleos e gorduras (CASTRO *et al.*, 2004). A Figura 6 apresenta os diferentes tipos de reações catalisadas por lipases.

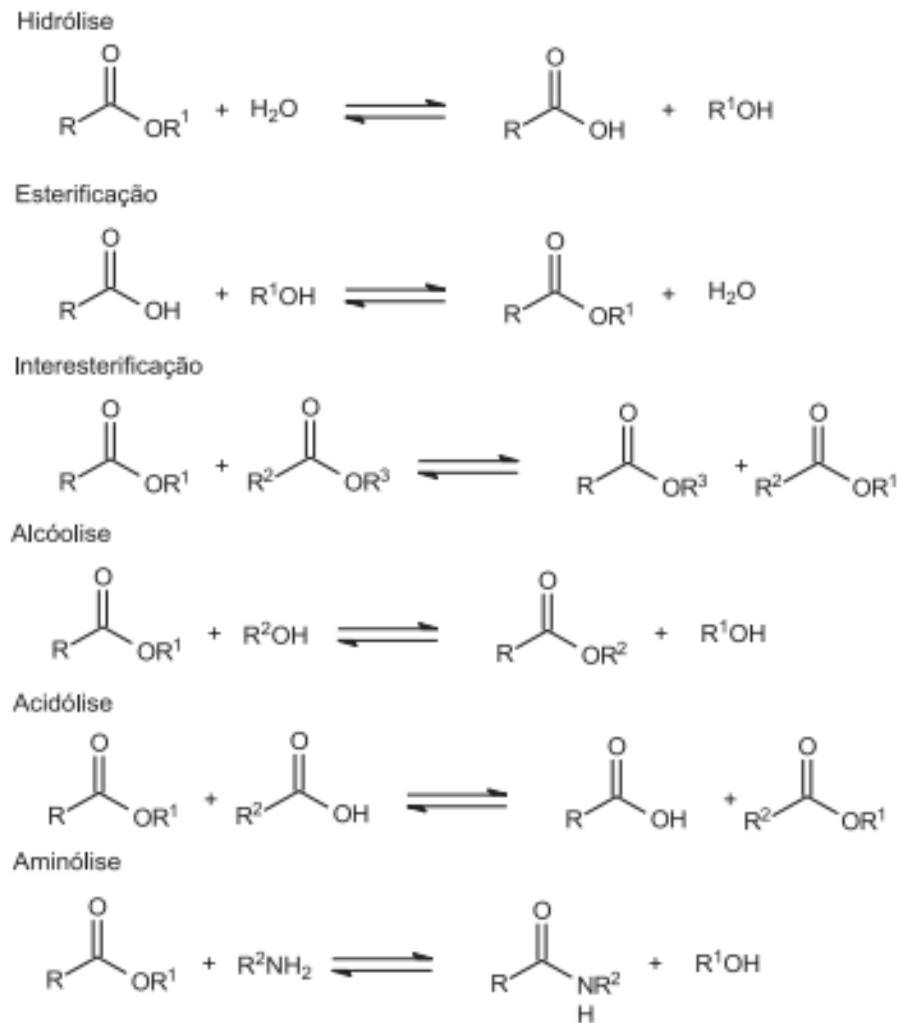


Figura 6 – Reações Catalisadas por lipases

Fonte: Adaptado de Paques e Macedo, 2006

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal e microbiana (bactérias e fungos) (MARTINS *et al.*, 2008). Nos animais, estas enzimas participam do metabolismo de lipídeos, como a digestão, a adsorção, a reconstituição de gorduras e também no metabolismo de lipoproteínas. Nas plantas, são encontradas em tecidos de reserva de energia (SHARMA *et al.*, 2001). No caso das enzimas de origem vegetal há a necessidade de grande quantidade do vegetal para conseguir a enzima desejada, isto se torna um fator limitante considerando a dificuldade do cultivo, do uso da terra e de custos operacionais (COLEN *et al.*, 2006).

Lipases microbianas são largamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade para o substrato, o que as torna fonte potencial para aplicações industriais. O interesse por esta enzima é principalmente devido à sua

ampla aplicação em biotecnologia. As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento à partir do caldo fermentativo apresentam propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (GURUNG *et al.*, 2013). Suas características de estabilidade e crescimento rápido dos microrganismos têm despertado interesse de diversos pesquisadores em descobrir novas fontes através da seleção de microrganismos (GONÇALVES, 2007). A maioria das lipases apresenta atividade ótima na faixa entre 30 e 40 °C e embora suas características de termoestabilidade variem consideravelmente em função da origem, as enzimas de origem microbiana são, em geral, as mais estáveis. Usualmente, não necessitam de cofatores e são ativas em uma ampla faixa de pH (FREIRE e CASTILHO, 2000).

São enzimas que apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade (GUPTA *et al.*, 2004). A versatilidade destas enzimas sugere que sua cadeia polipeptídica seja flexível e possa adotar diferentes conformações dependendo das características físico-químicas do meio (COSTA e AMORIN, 1999). Os sítios catalíticos das lipases são formados por uma serina, uma histidina e um resíduo ácido (aspártico ou glutâmico), compondo a denominada tríade catalítica (BRADY *et al.*, 1990). Dessa forma, para que a catálise tenha início é necessário que ocorra a “ativação interfacial” (BON *et al.*, 2008). Essa ativação pode ser explicada por meio da estrutura tridimensional da lipase. O centro ativo das lipases fica oculto por uma “tampa” (“Lid”) polipeptídica na forma inativa da enzima, isto o faz ficar inacessível às moléculas de substrato isoladas em meio aquoso. A enzima torna-se ativa apenas quando entra em contato com uma interface hidrofóbica, havendo então a abertura dessa “tampa”. Essa abertura consiste na reestruturação conformacional da lipase que cria uma região eletrolítica (cavidade oxianion) em torno do resíduo serina: a tampa helicoidal vira-se para trás encobrindo seu lado hidrofílico em uma cavidade polar, antes preenchida por moléculas de água, expondo totalmente o lado hidrofóbico da tampa (Figura 7). Essa exposição faz com que a superfície apolar em torno do sítio catalítico seja expandida. A cavidade do oxianion é uma região na estrutura proteica capaz de acomodar o estado de transição tetraédrico, além de ser responsável pela estabilização de cargas negativas geradas durante o ataque nucleofílico na ligação carbonila do substrato (BALCAO *et al.* 1996, PAIVA *et al.*, 2000).

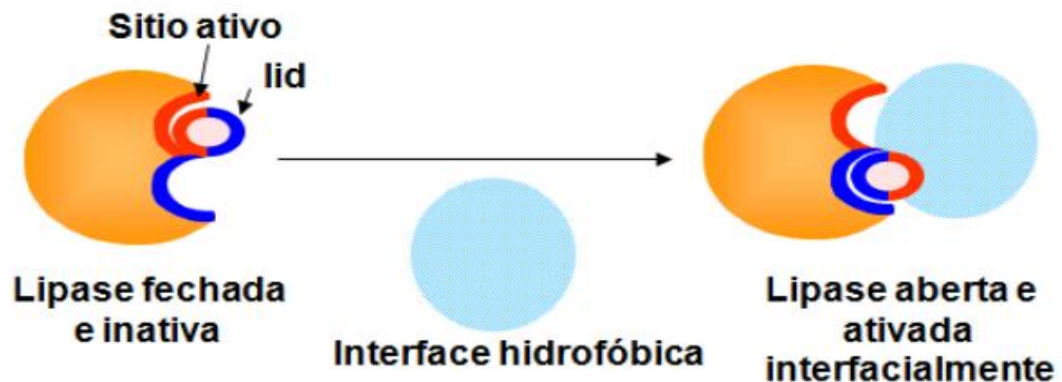


Figura 7 – Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas

Fonte: Rodrigues, 2009

A diferenciação entre lipases e esterases tem sido feita pela diferença de especificidade das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (BROCKMAN, 1984; SALAMEH e WIEGEL, 2007). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER *et al.*, 1994).

### 2.5.1 Produção de lipase

Estudos realizados por Sharma *et al.* (2001), listou 109 espécies microbianas produtoras de lipase, das quais 47 foram obtidas de bactérias, com prevalência do gênero *Bacillus* sp., 42 obtidas de fungos e 20 de leveduras. Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (FEITOSA, 2009).

A produção industrial de enzimas envolve processos de fermentação submersa ou sólida para o cultivo dos microrganismos. No caso da fermentação submersa, o caldo fermentado é centrifugado ou filtrado para a recuperação das



enzimas presentes no sobrenadante das culturas. Já nas fermentações sólidas, os biocatalisadores são extraídos da massa do substrato fermentado (BON *et al.*,2008)

No processo submerso as fermentações são conduzidas em biorreatores aerados e agitados mecanicamente. No cultivo em estado sólido, onde são usados substratos como arroz, milho e resíduos agroindustriais, as fermentações podem ser realizadas sem agitação mecânica ou com agitação esporádica (BON *et al.*,2008). Wolski *et al.* (2009) fizeram um estudo comparativo entre as características da lipase de *Penicillium* sp. produzida em fermentação sólido e submersa. Seus resultados propuseram que enzimas produzidas a partir da fermentação submersa possuem melhores características quanto a estabilidade em pH e temperatura. Neste trabalho em questão, a lipase obtida da fermentação submersa também apresentou maior tempo de meia vida.

Os meios de cultivo são fatores importantes no processo de fermentação. Eles podem ser constituídos de compostos sintéticos ou de matérias primas naturais. Devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, minerais e fatores de crescimento. Na produção de enzimas indutíveis, a presença de um indutor é essencial, por exemplo amido para amilase, uréia para urease e um lipídeo para lipase (LIMA *et al.*, 2001). Das exigências nutricionais requeridas, a fonte de carbono é a mais importante para a síntese de lipases. Tal produção normalmente é induzida pela presença de óleos, ácidos graxos, triacilgliceróis, tweens, sais biliares e glicerol. Outras fontes de carbono, tais como açúcares, soro de leite, polissacarídeos e aminoácidos, também influenciam fortemente a produção de lipase (SHARMA *et al.*, 2001).

Colen (2006) desenvolveu um método para seleção de microrganismos produtores de lipase testando a incorporação de sais biliares e alguns corantes em variadas concentrações e diferentes valores de pH ao meio de cultura contido em placa de Petri. Estas condições padronizadas permitiram a fácil detecção de fungos lipolíticos devido à formação de colônias de tamanho adequado e a potencialização da atividade lipolítica, além de razoável reprodutividade (COLEN, 2006).

Rodrigues (2010) avaliando a atividade lipolítica específica a partir de processos de fermentação submersa e em estado sólido, utilizando como fonte exclusiva de carbono o óleo de soja comercial (10% no substrato), encontrou um bom parâmetro para a atividade lipolítica extracelular dos isolados fúngicos avaliados, permitindo satisfatória seleção.

## 2.5.2 Aplicações industriais de lipases

Pela capacidade de catalisar diversas reações e com possibilidade de diferentes especificidades de substratos, as lipases apresentam um enorme potencial de aplicações, e representam cerca de 20% das enzimas utilizadas nos processos de biotransformação. As lipases se destacam entre as hidrolases devido as suas múltiplas aplicações (Figura 8), sendo utilizadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos, têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (HASAN *et al.*, 2006; HOUDE *et al.*, 2004).

Figura 8 – Quadro de Aplicações industriais de lipases

<b>Indústria</b>	<b>Ação</b>	<b>Produto ou Aplicação</b>
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de óleos
Derivados de Laticínios	Hidrólise da gordura do leite, maturação de queijo, modificação de manteigas	Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite, queijo e manteiga
Panificação	Melhorador de <i>flavors</i>	Prolongar a vida de prateleira
Bebidas	Aromas	Bebidas
Carnes e peixes	Desenvolvimento de <i>flavor</i>	Remoção de gorduras, produtos de carne e peixe
Gorduras e óleos	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarinas, ácidos graxos, glicerol, mono e diacilglicerídeos
Química	Enantiosseletividade, síntese	Construção de blocos quirais
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lipídeos específicos, digestivos
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, umidificantes
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gorduras

Segundo Daiha *et al.* (2015) em estudos sobre o uso de lipase, realizada na plataforma de pesquisa Web of Science entre setembro de 2014 e abril de 2015, foram encontradas 671 patentes de lipases relacionadas com resolução cinética, 554 na produção de alimentos, 456 na produção de detergentes e 156 na produção de biodiesel. A utilização de lipases na indústria de detergentes ocorre desde 1994 e este segmento é considerado indiscutivelmente o maior consumidor destas enzimas, correspondendo a aproximadamente 32% das vendas totais das lipases. São especialmente utilizadas neste setor por satisfazer os seguintes requisitos: (1) uma baixa especificidade de substrato, ou seja, uma capacidade de hidrolisar as gorduras de várias composições; (2) capacidade de resistir a condições de lavagem relativamente severas (pH 10-11, 30-60°C); (3) capacidade para suportar surfactantes e outras enzimas que são ingredientes importantes de muitas formulações de detergente (BON *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009).

Dentre as aplicações na indústria oleoquímica merece destaque a interesterificação de óleos, que permite a valorização de um óleo mais barato por meio da composição em ácidos graxos (CABRAL *et al.*, 2003). O emprego das lipases na produção de biodiesel também é bastante estudado. Nesta reação são produzidos ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, que podem ser empregados como combustível, sem a desvantagem de gerar óxidos de enxofre e de particulados. Comparado ao método químico, o método enzimático simplifica o procedimento para recuperação de ésteres etílicos e metílicos (biodiesel) e dos subprodutos gerados (glicerol), eliminando a geração de resíduos (YANG *et al.*, 2007). Os ésteres metílicos de ácido graxo, ou biodiesel, são fortes candidatos para substituir o diesel de petróleo, já que suas características são semelhantes, não são derivados do petróleo e sim de fontes renováveis, são biodegradáveis e, em relação ao diesel convencional, possuem produtos de combustão com níveis reduzidos de poluentes (AL-ZUHAIR *et al.*, 2006).

Na indústria cosmética a utilização das enzimas vem se intensificando, não apenas na síntese de matérias-primas, mas também como ingredientes ativos nas formulações. Vários exemplos de síntese de fragrâncias utilizando lipase foram relatados, com o mentol sendo o mais proeminente. Uma nova forma de isolar ésteres de mentol enantiomericamente puros é através de uma etapa de transesterificação usando lipase de *Pseudomonas cepacia* (ATHAWALE *et al.*, 2001). Estes ésteres de

cosméticos são utilizados em cremes e loções emulsionadas, cremes anidros (batons, blushes e pomadas) e demaquilantes. São produzidos por rotas químicas, porém, pela capacidade das lipases em agir em reações de síntese, estas também podem ser utilizadas para produção desses ésteres por via enzimática. A produção de palmitato de isopropila, miristato de isopropila e palmitato de octila é usada como emoliente em produtos de cuidados pessoais tais como bronzeador, cremes e óleos de banho (SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012).

As enzimas tem a capacidade de atuar sobre poluentes no tratamento de despejos industriais, esses efluentes gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral possuem elevados teores de demanda bioquímica de oxigênio, tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Neste contexto, processos alternativos de tratamento que visam à recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes, por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídios e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (CASTRO *et al*, 2004). As lipases também são utilizadas no tratamento de resíduos domésticos, na limpeza de tubulações de esgotos e para acelerar a biodegradação de polímeros e lamas de perfuração de poços de petróleo contendo ésteres sintéticos emulsionados em água (BON *et al.*, 2008; JAEGER e REETZ, 1998).

Na indústria farmacêutica, as propriedades fundamentais de lipases exploradas são estereoespecificidade e enantiosseletividade. Lipases estereoseletivas são utilizadas para sintetizar um enantiômeros de moléculas bioativas, enquanto enzimas enantiosseletivas são usadas pela formação preferencial do enantiômero que se manifesta a atividade de interesse (RAY, 2012). Como exemplo, S –Ibuprofeno [ácido ( $\pm$ ) -2 (4-isobutilfenil) propanóico] pode inibir a síntese de prostaglandina 160 vezes mais eficiente do que a sua forma-R (NEUPERT *et al.*, 1997). Foram feitos esforços para obter drogas opticamente ativas através de síntese química assimétrica ou resolução enzimática. Entre estas, a resolução enzimática é preferida sobre a química devido à sua elevada característica enantiosseletiva, fácil separação dos subprodutos e taxa mais rápida de obtenção de substância enantiomericamente puras (MUSTRANTA, 1993; PATEL, 2008).

### 2.5.3 Lipases na área de alimentos

As lipases são as enzimas de escolha para processamento de óleos e gorduras. A posição e o grau de insaturações e o tamanho da cadeia influenciam não somente nas propriedades físico-químicas de um dado triglicerídeo, mas também no seu valor nutricional e sensorial. Lipases tem sido utilizadas para hidrólise seletiva de ácidos graxos, seguida da síntese de novas ligações éster, construindo assim triacilgliceróis com características distintas das originais e de interesse para um dado alimento. Assim, pela ação de uma enzima lipolítica, um triacilglicerol que inicialmente constituía-se dos ácidos palmítico oleico-esteárico, pode tornar-se em esteárico-oleico-esteárico, por exemplo, com modificação das propriedades funcionais do produto (JAEGER e REETZ, 1998).

Na indústria alimentícia, as lipases são utilizadas no melhoramento da textura de pães, otimização do tempo de maturação de salames fermentados e, também para medir as mudanças no ácido graxo de cadeia longa liberado durante o amadurecimento, na hidrólise de gorduras do leite e até para alterar o sabor do leite entre outros (BON *et al.*, 2008; GANDRA *et al.*, 2008). As lipases são empregadas na hidrólise seletiva de óleos e gorduras para obter ácidos graxos livres, estes posteriormente podem sofrer modificações químicas.

Anteriormente, lipases de diferentes fontes microbianas foram usadas para refinação de sabor do arroz, modificando leite de soja, e para melhorar o aroma e acelerar a fermentação do vinho de maçã (HASAN *et al.*, 2006).

A produção de aromas em produtos lácteos é acelerada quando há a formação de ácidos graxos livres e peptídeos solúveis e aminoácidos durante a maturação do produto. A interesterificação e a hidrogenação são técnicas que têm sido utilizadas para a preparação de glicerídeos para fabricação de manteigas e margarinas (HASAN *et al.*, 2006). Na produção de leite e derivados, as lipases aceleram o processo de maturação de queijos e promovem a hidrólise da gordura do leite. A indústria tem procurado alternativas para atender a demanda crescente por leite e derivados com menor teor de gordura. Dessa forma, as lipases tem sido utilizadas na hidrólise seletiva dessa gordura, possibilitando sua utilização na formação de produtos com aroma do queijo tipo Cheddar, na produção de substitutos de manteiga e outros aditivos usados em cereais, balas e aperitivos. A adição desses

hidrolisados confere uma variedade de efeitos sensoriais aos alimentos (VIRTO *et al.*, 2003).

Na panificação as lipases podem degradar os lipídeos do trigo e assim modificar sua interação com o glúten. Além disso, podem condensar a massa, aumentar o volume do pão, melhorar a textura do miolo, melhorar a cor e ainda promover a obtenção de monoacilgliceróis, que são usados como agentes emulsificantes (CASTRO *et al.*, 2004; FREIRE e CASTILHO, 2008). Na fabricação da manteiga de cacau são utilizadas lipases que catalisam a reação de transesterificação, partindo de óleos como o de palma. Há também o processo de interesterificação conduzido na presença de lipase para obtenção de produtos glicéridos, que são utilizados na fabricação de manteigas e margarinas, em substituição ao processo convencional, no qual se aplica sódio ou metilato de sódio como catalisadores (HASAN *et al.*, 2006).

#### 2.5.4 – Esterificação por lipases

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis, mas são também capazes de realizar outros tipos de biotransformação como esterificação, transesterificação e interesterificação. A esterificação é uma reação relativamente simples que consiste na condensação do ácido carboxílico livre e um álcool formando éster e água (Figura 9) (RAJENDRAN *et al.*, 2009).

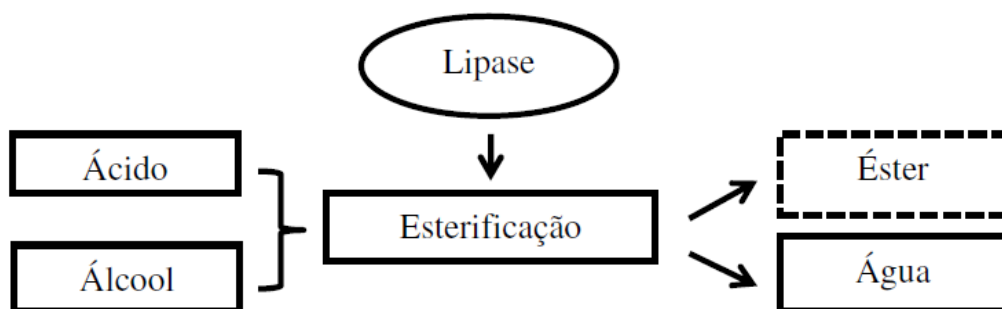


Figura 9 – Reação de esterificação catalisada por lipase

Fonte: Adaptado de Rajendran *et al.*, 2009

Ésteres são compostos orgânicos muito explorados devido a sua aplicação no mercado de bioenergia e na indústria de alimentos, na produção de *flavor*, por exemplo (Figura 10) (ARAGÃO *et al.*, 2009).

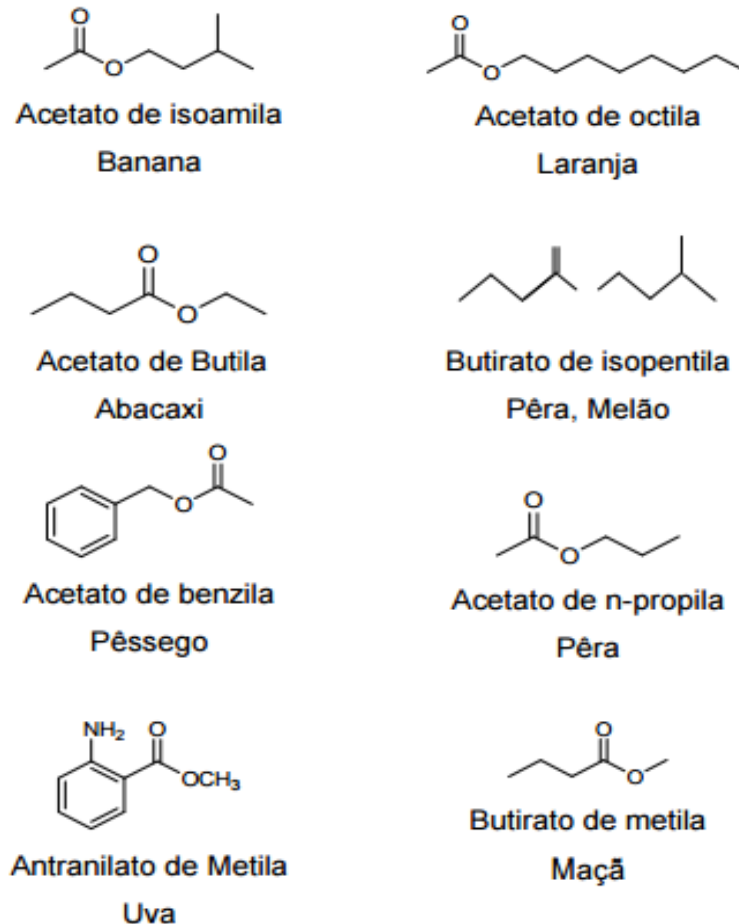


Figura 10 – Ésteres utilizados na indústria de alimentos.

Fonte: Aragão *et al.*, 2009

Os processos biotecnológicos oferecem diversas vantagens e se mostram como uma alternativa competitiva aos métodos químicos devido à alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas e à seletividade dos catalisadores naturais (PIRES-CABRAL *et al.*, 2009). Reações catalisadas por lipases em meio não aquoso aumentam a possibilidade de produção de outros produtos biotecnológicos. Algumas reações que não ocorrem facilmente em meio não aquoso, devido a restrições cinética e termodinâmica, são facilitadas pela ação de lipases. Essas reações apresentam vantagens como maior solubilidade de solventes e compostos orgânicos, maior

estabilidade da lipase e facilidade de recuperação do produto (MENDES *et al.*, 2012 (a)). A compreensão da biossíntese de ésteres pode ajudar no controle de produtos lácteos fermentados (LIU *et al.*, 2004).

A catálise enzimática tem-se mostrado atrativa para a produção de aromas de frutas por se tratar de um processo com baixo consumo de energia e elevada produtividade (MENDES *et al.*, 2012 (b); SILVA *et al.*, 2014). Do ponto de vista industrial, as reações de síntese de ésteres de aromas catalisadas por lipases, são aparentemente menos econômicas que as técnicas convencionais. Entretanto, considerando a possibilidade da obtenção de produtos específicos de grande interesse industrial, empregando estas enzimas, este tipo de processo pode tornar-se tecnicamente e economicamente viável (MENDES *et al.*, 2012 (b); MIRANDA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014). A biotecnologia tem sido considerada uma boa ferramenta na produção destes compostos, uma vez que o aroma obtido por lipases microbianas pode ser considerado como “natural” (ROMERO *et al.*, 2007).

A obtenção destes ésteres através de via enzimática utilizando lipases como biocatalisadores é descrita em diversos sistemas reacionais. A síntese do acetato de butila foi realizada em meio orgânico utilizando diferentes solventes, e também através de sistema livre de solvente orgânico (SALAH *et al.*, 2007). A síntese do butirato de isoamila foi conduzida por Aragão (2009) em diferentes sistemas utilizando solventes orgânicos.

Vários estudos têm demonstrado a obtenção de ésteres sintetizados com altos rendimentos utilizando diversas lipases de origem microbiana (ARAGÃO *et al.* 2009; AHAPATRA *et al.* 2009; PENG *et al.* 2011; SALAH *et al.* 2007; SALIHU *et al.* 2014; SKORONSKI *et al.* 2013). As lipases têm sido utilizadas em reações de esterificação para a produção de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta, os quais apresentam aplicações como flavorizantes, como relatado por Salah *et al.* (2007), que realizaram a produção de acetato de butila, aroma característico de abacaxi, através da lipase produzida por *Rhizopus oryzae*, assim como Martins (2012) que obteve acetato de butila utilizando lipase de *Candida antarctica* e Ozyilmaz e Gezer (2010) usando lipase de *Candida rugosa*.

O aroma, bem como a cor e a textura, tem um papel importante na aceitabilidade de produtos alimentícios pelos consumidores. A conversão de precursores em compostos de aroma não tem somente importância científica, mas também é de interesse para a indústria de alimentos em geral, e seus produtos



representam um elemento crítico no sucesso das indústrias alimentícias que os utilizam como insumos (MELO, 2004). As lipases são aplicadas na indústria de alimentos na síntese de aromas como, por exemplo, o butirato de etila, um éster de ácido graxo volátil responsável pelo aroma de morango, e o acetato de isoamila, que apresenta aroma de banana (KOBLOITZ, 2008;). Outro exemplo é a produção de acetato de butila, que possui aroma de abacaxi, e pode ser realizada pela reação de esterificação entre butanol e ácido acético (HASAN *et al.*, 2006). Esses ésteres são muito utilizados pelo aroma frutado que fornecem, em produtos como geleias, bebidas e em produtos lácteos como iogurte (MARTINS, 2012).

Atualmente, observa-se um aumento do conhecimento dos consumidores sobre as características nutricionais e os efeitos à saúde vinculados ao consumo de determinados ingredientes e insumos utilizados nos produtos industrializados. As indústrias precisam estar preparadas e apresentar inovações que favoreçam o sucesso e aceitação de um produto pelo consumidor (POLÔNIO e PERES, 2009). Nesse contexto, os aditivos naturais tem recebido especial atenção por estes consumidores, uma vez que passam a ideia de produto mais saudável, enquanto aditivos sintéticos e artificiais apresentam um caráter negativo. Todos estes fatores têm estimulado as empresas alimentícias a buscar por ingredientes naturais. Logo é de suma importância a descoberta de novos aromas e de novas tecnologias para seu desenvolvimento (DUBAL, *et al.*, 2008). As tendências à substituição de aditivos que são considerados artificiais, na produção de alimentos industrializados, assim como o crescente uso da biotecnologia, criaram um novo segmento na indústria de aditivos alimentares, os ésteres de aroma por síntese enzimática.

## **2.6 Otimização (Delineamento experimental e Metodologia de superfície de Resposta)**

A determinação dos parâmetros de uma reação normalmente se faz variando um fator de cada vez, enquanto mantem-se os demais constantes. Contudo, esse método não é eficiente quando há interações entre diversas variáveis. A escolha da melhor estratégia do planejamento experimental depende principalmente do número de variáveis independentes ou fatores que se deseja estudar e do conhecimento inicial que se tem sobre o processo (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A finalidade do planejamento experimental é determinar os efeitos dos fatores ou variáveis do processo e da interação entre eles sobre o resultado do experimento. Em geral, dois níveis de fatores são usados em um delineamento fracionado: um menor fator representado pelo sinal (-) e um superior, representado pelo sinal (+), e todas as combinações possíveis destes dois níveis são investigados. O número de experimentos necessários em um delineamento fatorial com dois níveis é dado por  $2^k$ , onde 2 e k representam os níveis e número de variáveis, respectivamente (MONTGOMERY, 2003).

Sabendo-se quais parâmetros avaliados possuem maior efeito sobre a resposta em estudo, a utilização de outra ferramenta estatística é muito eficiente, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Segundo Rodrigues e lemma (2005), o DCCR é um Delineamento Composto Central que tem pontos axiais definidos. De modo geral, em um DCCR com 2 níveis originais, tem-se  $2^k$  pontos fatoriais + 2K pontos axiais + um número arbitrário de pontos centrais.

O Delineamento Composto Central é uma alternativa que possibilita a exploração de todo o espaço amostral com um menor número de ensaios. Este tipo de delineamento possui um valor  $\alpha$  que o particulariza, o mesmo é estabelecido para tornar os coeficientes de regressão ortogonais, ou para dar ao delineamento a propriedade de ser rotacional (DCCR), isto é, todos os pontos são equidistantes do ponto central (MATEUS *et al.*, 2001).

Aliada ao DCCR, outra ferramenta muito utilizada para a otimização de processos é a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), metodologia desenvolvida por Box e Wilson em 1951 (BOX, 1978). De forma geral, consiste em técnicas de análise e planejamento de experimentos para identificar a relação que existe entre os fatores controláveis (variáveis independentes) e as respostas (variáveis dependentes) do sistema analisado (MYERS e MONTGOMERY, 1995). Este é um método estatístico eficaz para a otimização de variáveis e obtenção do ponto ótimo, sendo amplamente utilizado para otimizar os parâmetros de um processo, determinar as condições ótimas para as investigações químicas e maximizar os rendimentos de reações. Em geral a variável resposta é representada por "Y" e é função dos fatores ou variáveis independentes  $X_1, X_2, \dots, X_n$  (MONTGOMERY, 2003).

As vantagens da utilização da MSR incluem a redução do número de ensaios experimentais e a capacidade da ferramenta estatística para identificar interações.

Além disso, há uma redução do número de experimentos tornando-o um método mais rápido e mais barato (GUNAWAN *et al.*, 2005).

Os planejamentos experimentais vêm sendo muito utilizados em experimentos de uma forma geral. A metodologia de Superfície de Resposta tem sido usada na síntese de aromas a fim de estudar os efeitos das variáveis de maior influência no desempenho da reação, assim como a interação entre elas. Friedrich *et al.* (2012) estudaram, através dessa metodologia, duas preparações enzimáticas diferentes como biocatalisador para a reação de esterificação do butirato de etila e obtiveram taxas de conversão de 85% em 2,5 h de reação. Já Pires-Cabral *et al.* (2007) obtiveram taxas de 95% de conversão usando a mesma enzima para a mesma síntese, mas em condições reacionais diferentes e em suportes diferentes. Rajendran *et al.* (2009) utilizaram o fatorial fracionado com o objetivo de elaborar um modelo para a síntese de éster com lipase de *Rhizopus arrhizus* obtendo a sua condição de cultivo mais adequada.

## **2.7 Ferramentas de detecção (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas CG-EM)**

A análise de aromas exige a utilização de métodos bastante seletivos, sensíveis e eficientes pois envolve a separação de um grande número de substâncias, presentes em quantidades muito pequenas, que apresentam grande diferença em suas propriedades físico-químicas por pertencerem a variadas classes de compostos (SCHMIDT e BORNSCHEUER, 2005).

A cromatografia gasosa constitui uma técnica de separação indicada para a análise dos componentes do aroma dos alimentos, pois requer que as substâncias analisadas sejam voláteis. É uma técnica que necessita de pequenas quantidades de amostras para a obtenção de resultados em concentrações muito baixas. A separação baseia-se na migração diferencial dos componentes da amostra em um sistema que compreende uma fase estacionária e uma fase móvel, de acordo com suas propriedades os compostos são retidos em tempos diferentes (SANTOS *et al.*, 2006).

A cromatografia gasosa não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando de técnicas auxiliares para identificação segura dos componentes da amostra. O

acoplamento a um espectrômetro de massas está se tornando a melhor ferramenta na pesquisa de compostos aromáticos, pois contempla técnicas eficientes de separação e identificação. O espectrômetro de massas fornece uma boa estabilidade e sensibilidade para a análise de compostos voláteis. Cada composto conforme sua estrutura química, sofre fragmentações particulares, gerando um espectro de massas característico (RICHMOND e POMBO-VILLAR, 2007).

### 3 – OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Isolar e selecionar fungos endofíticos de sementes de baru (*Dipteryx alata*), cacau (*Theobroma cacao* L.), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) e macaúba (*Acrocomia aculeata*), potencialmente produtores de enzimas lipolíticas aplicáveis na área de alimentos.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Isolar fungos endofíticos de sementes de baru, cacau, jervá e macaúba;
- Selecionar fungos potencialmente produtores de enzimas lipolíticas em meios de cultura com substrato específico (seleção primária);
- Avaliar a produção de enzimas lipolíticas pelos fungos selecionados, em condições de fermentação submersa para obter um preparado enzimático (seleção secundária);
- Avaliar a atividade enzimática do preparado enzimático contendo enzimas lipolíticas extracelulares em reações de esterificação;
- Selecionar o preparado enzimático com maior atividade enzimática e otimizar a reação de esterificação para produção de ésteres aromáticos;
- Avaliar qualitativamente a síntese de ésteres aromáticos formados utilizando o preparado enzimático selecionado na etapa anterior.

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de isolamento e preservação dos fungos endofíticos, seleções primária e secundária e esterificação foram conduzidos nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A identificação molecular do microrganismo selecionado como promissor em produzir enzima lipolítica foi realizada pelo Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

A cromatografia gasosa e espectrometria de massas foram executadas no Laboratório Multiusuários de Análises Cromatográficas (LAMAC) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

### 4.1 Materiais químicos

Os reagentes utilizados foram de grau analítico obtidos da Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, Brasil) e Synth Produtos para Laboratório LTDA (São Paulo, Brasil). Os meios de cultivo Sabouraud, Ágar Batata Dextrose (PDA) e a peptona foram obtidos da Acumedia (Baltimore, EUA). O óleo de oliva foi obtido no comércio da cidade Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil).

### 4.2 Coleta do material biológico

Um total de 10 frutos de cada espécie de planta, aparentemente saudáveis, foram coletados nos estados de Minas Gerais e Bahia. Os frutos de baru (*D. alata*) foram coletados em Montes Claros/MG, o cacau (*T. cacao*) em Ilhéus, na região sul do estado da Bahia, o jerivá (*S. romanzoffiana*) e a macaúba (*A. aculeata*) foram coletadas no campus da UFMG em Belo Horizonte, MG.

As amostras coletadas foram levadas aos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB) da Faculdade de Farmácia da UFMG para o isolamento de fungos endofíticos.

### 4.3 Isolamento e preservação de fungos endofíticos

Os frutos coletados foram abertos e as sementes retiradas. Inicialmente as sementes das plantas, sem manifestação aparente de fitopatógeno, foram lavadas com detergente neutro e enxaguadas abundantemente com água destilada esterilizada. Em seguida, as sementes foram flambadas com auxílio de álcool PA e pinças esterilizadas. As sementes foram fatiadas com o auxílio de um bisturi estéril em fragmentos pequenos e imersas em solução de etanol 70% por 5 segundos, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio (4% de cloro livre) por 60 segundos e enxague com água destilada esterilizada por 10 segundos. Os fragmentos foram secos com papel filtro previamente esterilizado. Todo o procedimento de desinfecção superficial e fragmentação das sementes foi realizado em ambiente estéril, em câmara de fluxo laminar (ROSA *et al.*, 2009).

Após este processo de desinfecção superficial, os fragmentos foram colocados equidistantes sobre diferentes meios de cultura para o isolamento de leveduras e fungos filamentosos. Para o isolamento de fungos filamentosos utilizou-se o ágar batata dextrose (PDA), acrescido de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de cloranfenicol, e essas placas de Petri foram incubadas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 dias (Figura 11). Para o isolamento de leveduras foi utilizado o ágar extrato de malte-extrato de levedura – YM (peptona 0,5% extrato de levedura 0,3%, glicose 1,0%, extrato malte 0,3%, ágar 2,0%) acrescido de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de cloranfenicol e as placas foram incubadas aerobicamente por 3 a 5 dias a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (LOPANDIC *et al.*, 2006).

Alíquotas ( $100 \text{ }\mu\text{L}$ ) da água destilada estéril utilizada no processo de desinfecção também foram plaqueadas em PDA acrescido de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de cloranfenicol, e essas placas de Petri foram incubadas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 dias para assegurar que somente os fungos endofíticos foram isolados.

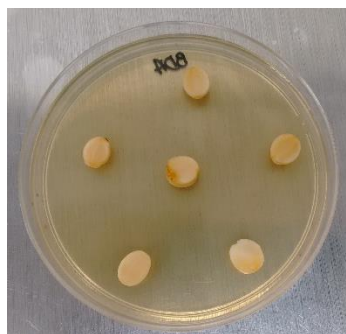


Figura 11 – Ágar PDA com fragmentos de sementes

Após o período de incubação os fungos endofíticos filamentosos obtidos foram purificados em ágar PDA e incubados a temperatura de 30 °C por 7 dias e, após verificar que tratavam-se de culturas puras, foram feitos cortes de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> no ágar, onde haviam esporos dos fungos. Esses cortes foram preservados em água destilada estéril (CASTELLANI, 1967) e também foram mantidos por repiques sucessivos em placas de Petri e tubos inclinados contendo PDA. As leveduras foram purificadas em Ágar Sabouraud (peptona 10 g.L<sup>-1</sup>, dextrose 40 g.L<sup>-1</sup> e ágar 20 g.L<sup>-1</sup>) e conservadas em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%, ágar 2%).

#### 4.4 Seleção de fungos endofíticos com atividade lipolítica

##### 4.4.1 – Índice de atividade enzimática –IAE (Seleção primária)

Para a verificação da produção de enzimas lipolíticas pelos fungos endofíticos foi utilizado um meio seletivo contendo óleo de oliva com a seguinte composição (g.L<sup>-1</sup>): extrato de levedura - 0,5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 5,0; (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO – 2,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 1,0; NaCl – 1,0; sais biliares – 2,0; ágar bacteriológico – 20 e óleo de oliva 10 mL.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, preparado de acordo com Colen *et al.* (2006). Os meios foram inoculados com as culturas puras (Figura 12), e as placas foram incubadas a 30 °C durante 7 dias. Os halos claros, de hidrólise, que apareceram em torno das colônias foram medidos com o auxílio de paquímetro. A partir destes valores foi calculado o Índice de Atividade Enzimática (IAE) (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975), conforme a equação 1:

$$\text{Equação 1:} \quad \text{IAE} = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Como controle positivo para produção de lipase foi utilizado o fungo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides*, reconhecido como produtor de lipase por Colen (2006) e Venkatesagowda *et al.* (2012).





Figura 12 – Meio seletivo inoculado com culturas puras

#### 4.4.2 Seleção por fermentação submersa (Seleção secundária)

Os fungos que apresentaram halos de hidrólise, na etapa anterior, foram submetidos à fermentação submersa para determinação da atividade enzimática do PBE. Seguindo a metodologia descrita por Colen *et al.* (2006), os isolados fúngicos foram crescidos em placas contendo PDA mantidas a temperatura de 30 °C durante 5 a 7 dias. Após esse período foram feitos cortes cilíndricos de 6 mm (discos) de diâmetro da borda das colônias para a contagem de esporos. Suspensões de esporos dos fungos foram preparadas pela adição dos discos de colônias a um tubo contendo 20 mL de água destilada estéril e Tween 80 na concentração de 0,5% (m.v<sup>-1</sup>), sendo este submetido à agitação manual para uma eficiente extração dos esporos, conforme metodologia adaptada de Colen *et al.* (2006). A determinação da quantidade de esporos por mL das suspensões foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Foi padronizado quatro discos, correspondentes à 10<sup>7</sup> esporos por mL, como inóculo (Sande *et al.*, 2015).

As fermentações foram conduzidas em frascos erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura estéril (Figura 13). Para a escolha deste meio foram testados três meios de cultura com diferentes concentrações de peptona e óleo de oliva, bem como diferentes pH. Estas condições foram obtidas em estudos anteriores por Colen (2006); Perdigão (2012) e Sande *et al.*, (2015), conforme composição apresentada na Figura 14.

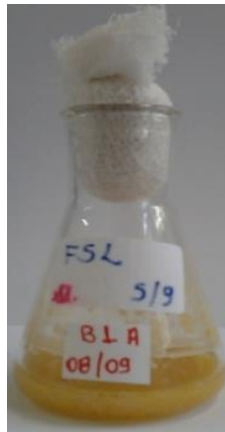


Figura 13 – Meio para Fermentação em Substrato Líquido

Composição (g/L e mL/L)	Condição I	Condição II	Condição III
Referência	Colen (2006)	Perdigão (2012)	Sande <i>et al.</i> (2015)
pH	5,0	6,0	7,0
Peptona (carne, caseína)	70	10	20
Óleo de oliva	7	4	8
Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> )	1	1	1
Fosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1	1	1
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	0,6	0,6	0,6

Figura 14 – Quadro de composições dos meios de fermentação submersa

O meio de cultura que favoreceu a produção do PBE com a maior atividade enzimática foi selecionado. O inóculo dos fungos foi inserido no meio de cultura selecionado e em seguida incubado a 30 °C, durante 72 h sob agitação constante (150 rpm) em incubadora orbital (Tecnal, TE- 424, Brasil). A biomassa fúngica (fungo filamentoso) foi separada por filtração utilizando-se bomba à vácuo (Aspirador Dia Pump, Fanem, Brasil) e papel de filtro Whatman n° 1 para a obtenção do preparado bruto enzimático contendo enzimas lipolíticas (PBE).

O pH do PBE foi determinado utilizando um pHmetro (Quimis, Q-400 A, Brasil) e a atividade enzimática foi avaliada pelo método espectrofotométrico em microplaca.

#### 4.4.2.1 Método Espectrofotométrico

O ensaio espectrofotométrico consistiu na metodologia adaptada de Winkler e Stuckmann (1979). A atividade enzimática foi avaliada usando o para-nitrofenil palmitato (*p*NPP) como substrato. Uma solução 3 mg.mL<sup>-1</sup> de *p*NPP em isopropanol foi misturada na proporção 1:9 com uma solução de tampão TRIS-HCl 0,09 mol.L<sup>-1</sup> em pH 8,0, acrescida de goma arábica (2 mg.mL<sup>-1</sup>) e triton x-100 (14 mg.mL<sup>-1</sup>). A essa mistura adicionou-se 40 µL de PBE e dosou-se imediatamente a absorbância encontrada em 405 nm contra um branco contendo apenas água destilada utilizando uma leitora de microplacas (ThermoPlate, TP Reader, Brasil).

Este procedimento foi repetido após 10 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 mL de solução enzimática, por minuto. Para esses cálculos de atividade enzimática foi feita uma curva padrão usando uma solução de *p*NP em isopropanol (1 mg.mL<sup>-1</sup>). A partir da curva padrão determinou-se a equação da reta (equação 2) utilizada no cálculo da atividade lipolítica.

Equação 2: 
$$X = \frac{Y+17,14}{151,05}$$

#### 4.4.2.2. Dosagem de proteína total e atividade específica

A dosagem de proteínas totais foi determinada seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). O reagente de Bradford foi adicionado em microplacas contendo o preparado bruto enzimático obtido na fermentação submersa. A mistura foi suavemente agitada, deixada em repouso durante 15 min, no escuro, e logo após foi feita a leitura da absorbância a 595 nm. Foi realizada uma curva analítica padrão com albumina de soro bovino para comparação.

A atividade específica foi calculada pela razão entre atividade enzimática total (UI/mL) e o teor de proteínas totais presentes na amostra (Carvalho, 2013).

#### 4.5 Identificação molecular do fungo

O fungo que apresentou o PBE com maior atividade lipolítica foi identificado através de técnicas moleculares. O protocolo de extração de DNA a partir de fungos filamentosos foi realizado como descrito por Rosa *et al.* (2009). O espaçador transcrito interno da região (ITS) foi amplificado com os primers universais ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). A amplificação da região ITS foi realizada como descrito por Rosa *et al.* (2009).

A amplificação do gene  $\beta$ -tubulina foi realizada com os iniciadores Bt2b Bt2a (Glass e Donaldson, 1995). Os ensaios de PCR foram realizados em misturas reacionais de 50  $\mu$ L contendo 1  $\mu$ L de DNA genômico (10 ng mL<sup>-1</sup>), 5  $\mu$ L de tampão de PCR (100 mmol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl, KCl 500 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,8), 2  $\mu$ L de dNTPs (10 mmol.L<sup>-1</sup>) mais 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 mmol.L<sup>-1</sup>), 1  $\mu$ L de cada iniciador (50 pmol. $\mu$ L<sup>-1</sup>), 1  $\mu$ L de sulfóxido de dimetilo (DMSO, Merck, Billerica, MA, EUA), betaína de 2  $\mu$ L (5 H), 0,2  $\mu$ L de polimerase Taq (5 U de DNA-1  $\mu$ L) e 33,8  $\mu$ L de água ultrapura esterilizada. As amplificações de PCR foram realizadas com o termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para a desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 94 °C, hibridação do iniciador durante 1 minuto a 59 °C e extensão de 1,30 min a 72 °C, com um passo de alongamento de 7 minutos finais a 72 °C. Após a amplificação do molde  $\beta$ -tubulina, os iniciadores em excesso e dNTP foram removidos a partir da mistura reacional usando uma coluna GFX comercial com o kit de purificação de PCR de DNA (Amersham Bioscience, Roosendaal, Holanda). Os fragmentos de PCR purificados foram ressuspendidas em 50  $\mu$ L de tampão de Tris-EDTA. O DNA amplificado foi concentrado e purificado utilizando o SV miniprep de DNA sistema Wizard Plus Purificação (Promega, Madison, WI, EUA) e sequenciados utilizando um terminador Kit ET dinâmica numa MegaBACE 1000 / sequenciador automático 96 Capilar ADN (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA).

As sequências de DNA dos fungos endofíticos foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de fungos, depositadas no GenBank e pertencentes a coleções de culturas internacionais, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal 20 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

## 4.6 Reações de esterificação

O preparado bruto enzimático do fungo que apresentou maior atividade enzimática pelo método espectrofotométrico foi submetido ao processo de liofilização para a realização dos testes de esterificação. Para isto, primeiro determinou-se a concentração de proteínas no PBE utilizando o método de Bradford (1976). Em seguida, o PBE foi distribuído em alíquotas de 15 mL em tubos cônicos (tipo falcon) e congelados com nitrogênio líquido. Estes tubos foram acondicionados em liofilizador (Liobrás, Liotop L101, Brasil) e submetido ao processo de liofilização durante 72 h à -52 °C e pressão interna abaixo de 100 mmHg continuamente. O rendimento em gramas de PBE foi calculado pesando-se o tubo cônico contendo o líquido e, após a liofilização, o mesmo tubo cônico contendo o material liofilizado. A atividade lipolítica específica do PBE liofilizado foi calculada pela razão entre a atividade enzimática total em 100 mL de PBE pela quantidade de proteínas totais contida em 100 mL de PBE (Carvalho, 2013).

O PBE liofilizado foi submetido a reação de esterificação seguindo a metodologia adaptada de Silva *et al.* (2014). Uma mistura contendo raio molar de 1:1 de ácido orgânico (acético, butírico ou oleico) e álcool (butanol) diluídos em *n*-heptano foi utilizada como substrato. Ao meio reacional (10 mL) foi adicionado 1,0 g de PBE liofilizado, e foi incubado a 37 °C por 72 h sob contínua agitação em incubadora orbital (Tecnal, TE- 424, Brasil) a 200 rpm. Foi retirada e analisada uma alíquota nos tempos de 2, 24, 48 e 72 horas. A conversão em éster foi quantificada pela medida da concentração residual de ácido na mistura reacional por titulometria de neutralização.

### 4.6.1 Titulometria de neutralização

Uma alíquota (0,5 mL) da reação foi coletada, diluída em uma mistura 1:1 de acetona: etanol e titulada com solução de NaOH (20mmol.L<sup>-1</sup>) usando fenolftaleína como indicador. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. O experimento controle (sem a enzima) foi realizado para avaliar qualquer variação espontânea na concentração do substrato e para fins de cálculo. A conversão foi quantificada conforme equação 3:

$$\text{Equação 3: Taxa de conversão (\%)} = \frac{V_{\text{branco}} - V_{\text{amostra}}}{V_{\text{branco}}} \times 100$$

Onde:  $V_{\text{branco}}$  = volume de NaOH gasto na titulação do branco

$V_{\text{amostra}}$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra

#### 4.7 Otimização da reação de esterificação usando metodologia de superfície de resposta

A reação de esterificação que obteve maior taxa de conversão foi selecionada para ser otimizada, visando melhorar as condições de reação.

Para avaliar os efeitos do tempo de reação, quantidade de enzima (PBE liofilizado) e concentração molar dos reagentes (álcool e ácido) na produção de éster, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR). Foi feito um planejamento completo  $2^3$ , incluindo os seis pontos axiais. Foram realizados também três repetições no ponto central para estimativa do erro experimental. Os níveis e valores reais são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Tabela dos valores codificados e reais das variáveis no delineamento experimental

Variáveis	Variação	Código	Valores codificados e reais				
			-1,68	-1	0	1	+1,68
Tempo (h)	2	X1	1,2	2	4	6	6,8
Enzima (PBE) (g)	0,3	X2	0,118	0,3	0,6	0,9	1,0
Concentração molar dos reagentes (mmol.L <sup>-1</sup> /L)	200	X3	118	200	400	600	682

Cada variável foi avaliada nos níveis -1,68, -1, 0, 1 e 1,68. Foram realizados 17 ensaios, incluindo três repetições do ponto central (no valor codificado como 0), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Delineamento experimental para a produção enzimática de acetato de butila em meio orgânico

Ensaio	Variáveis codificadas			Tempo (h)	Enzima (PBE) (g)	Concentração molar dos reagentes (mmol.L <sup>-1</sup> )
	X1	X2	X3			
1	-1	-1	-1	2	0,3	200
2	+1	-1	-1	6	0,3	200
3	-1	+1	-1	2	0,9	200
4	+1	+1	-1	6	0,9	200
5	-1	-1	+1	2	0,3	600
6	+1	-1	+1	6	0,3	600
7	-1	+1	+1	2	0,9	600
8	+1	+1	+1	6	0,9	600
9	-1,68	0	0	1,2	0,6	400
10	+1,68	0	0	6,8	0,6	400
11	0	-1,68	0	4	0,118	400
12	0	+1,68	0	4	1,0	400
13	0	0	-1,68	4	0,6	118
14	0	0	+1,68	4	0,6	682
15	0	0	0	4	0,6	400
16	0	0	0	4	0,6	400
17	0	0	0	4	0,6	400

Após a determinação das condições de cada ensaio foi realizada a esterificação conforme descrito anteriormente.

#### 4.8 Teste de estabilidade do preparado bruto enzimático

O teste de estabilidade foi realizado para verificar se o PBE mantinha sua atividade enzimática frente ao ácido escolhido para a otimização da esterificação, conforme metodologia Castro-Ochoa *et al* (2005) modificada. Neste ensaio, o PBE foi incubado com cinco diferentes concentrações molares do ácido selecionado (118, 200, 400, 600 e 682 mmol.L<sup>-1</sup>) à 37 °C pelos tempos usados na otimização (1,2; 2; 4; 6 e 6,8 h) e sua atividade de hidrólise foi dosada utilizando pNPP como substrato. A

atividade hidrolítica de uma amostra sem o ácido foi utilizada como controle (100% de atividade).

#### **4.9 Análise cromatográfica**

O éster formado na reação de esterificação foi analisado por cromatografia gasosa (CG), conforme metodologia adaptada de Oliveira *et al.*, (2013). Uma amostra de 1 µL do meio de reação de esterificação na condição otimizada foi injetada em um cromatógrafo Agilent CP 8713, quadrupolo com um detector de massas (MS). O cromatógrafo foi equipado com uma coluna CP WAX 52 CB de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm em um sistema de injeção com divisão de fluxo com relação de 1:20. As temperaturas do detector e injetor foram fixadas a 280 °C e 300 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 30 °C e então programada para elevação a 5 °C/min até 180 °C, onde permaneceu constante durante 3 minutos. O gás Hélio foi usado como gás de arraste em uma taxa de fluxo de 3 mL.min<sup>-1</sup>.

#### **4.10 Análise estatística**

Foi utilizado o software STATISTICA 12.0, (StatSoft, Inc.) como ferramenta para o tratamento de dados resultantes do planejamento experimental e as diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo Teste de Duncan com nível de significância de 0,05.



## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e seleção de fungos endofíticos

O isolamento de fungos produtores de enzimas lipolíticas foi realizado em sementes oleaginosas de quatro tipos de plantas que possuem sementes oleaginosas (baru, cacau, jervá e macaúba). Dentre as sementes utilizadas foram isolados 16 fungos filamentosos endofíticos conforme apresentado na Figura 15 e três isolados de leveduras.

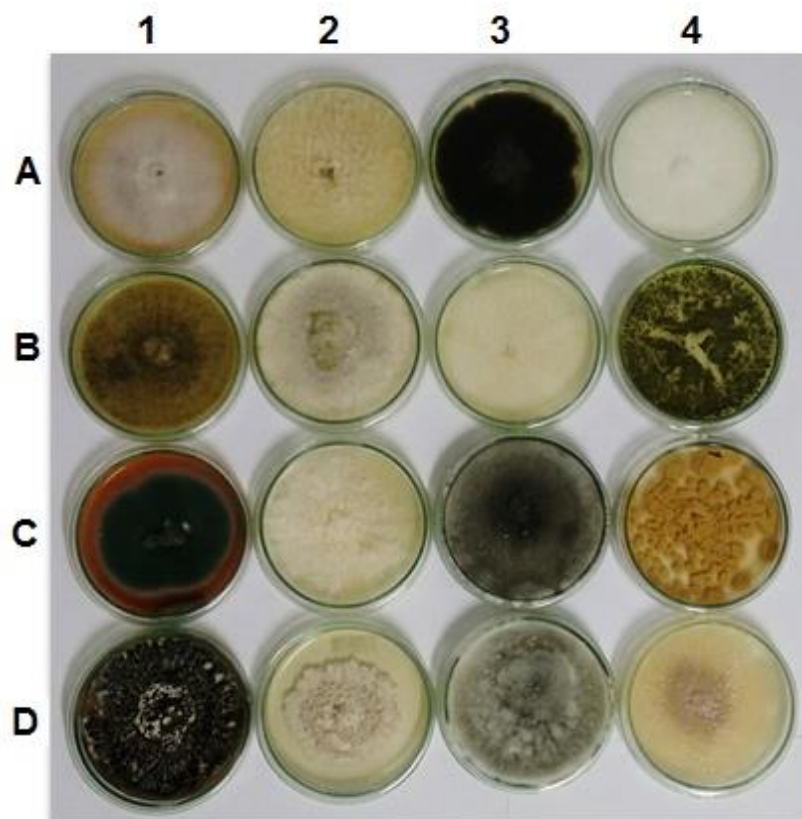


Figura 15 – Fungos endofíticos isolados de sementes de baru, cacau, jervá e macaúba.

Fungos de cacau: A1, A2, A3, A4, B1; fungos de macaúba: B2, B3, B4, C1, C2, C3; fungo de baru: C4; fungos de jervá: D1, D2, D3, D4.

Fonte: Fotos do autor

Dentre os fungos filamentosos endofíticos isolados das sementes oleaginosas no presente trabalho, 37 % foram provenientes de sementes de macaúba, 31 % de cacau, 25 % de jervá e 7 % de baru. A diversidade de fungos endofíticos

pode ser encontrada com bastante riqueza e abundância em diversas partes das plantas, como as sementes oleaginosas. Venkatesagowda *et al.* (2012) isolaram 1279 fungos endofíticos de sementes oleaginosas, em sete espécies de diferentes de plantas. Silva *et al.* (2010) isolaram seis fungos endofíticos das folhas de *Piper aduncum* e Maki (2006) isolou 16 fungos do caule de cacau. Araújo (2015) isolou nove leveduras associadas a frutos do cerrado.

Os fungos endofíticos isolados no presente estudo foram avaliados quanto à capacidade de produção de enzimas lipolíticas em meio de cultura seletivo contendo óleo de oliva (seleção primária) (Figuras 16 e 17). Observou-se que três isolados fúngicos, provenientes de sementes baru, jerivá e macaúba, apresentaram halos de hidrólise com indícios de atividade lipolítica. O fungo isolado da semente de baru apresentou o maior índice enzimático (3,82) seguido do isolado fúngico da semente de macaúba (1,89) e da semente de jerivá (1,28) (Tabela 3).

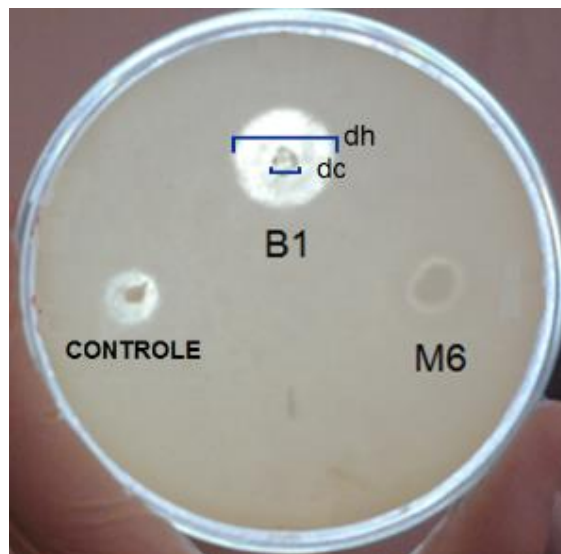


Figura 16 – Produção de halos de hidrólise em meio seletivo contendo óleo de oliva por fungos endofíticos isolados de sementes oleaginosas

dc = diâmetro da colônia e dh= diâmetro do halo

B1: fungo isolado de semente de baru;

M6: fungo isolado de semente de macaúba.



Figura 17 – Produção de halo de hidrólise em meio seletivo contendo óleo de oliva por fungo endofítico (J4) isolado de semente de jerivá.

Tabela 3 – Seleção de fungos endofíticos com potencial de produção de lipase

Fonte	Nº de Fungos isolados	Presença de halo de hidrólise	Índice de Atividade Enzimática( IAE)
Baru	1	B1	3,82
Cacau	5	-	0
Jerivá	4	J4	1,28
Macaúba	6	M6	1,89
Total	16		

(-) não detectado

Os testes de índice de atividade enzimática representam um guia para triagem de fungos lipolíticos, porém não são ensaios conclusivos, devendo-se realizar um processo fermentativo posterior para comprovação dos resultados (SILVEIRA *et al.*, 2014). Segundo Shelley *et al.* (1987) a taxa de difusão de proteínas em um gel de ágar se dá em função de sua concentração, assim o diâmetro do halo de hidrólise produzido por enzimas difundidas no ágar é resultado mais da concentração enzimática do que da sua atividade. De acordo com Giongo *et al.* (2006) e Gonçalves *et al.* (2007), a difusão da enzima e, conseqüentemente, o diâmetro do halo de hidrólise é influenciado também pela massa molecular que a enzima possui, que pode dificultar ou impedir sua difusão no ágar. Assim, o índice de atividade enzimática pode ser considerado baixo, mesmo havendo enzima em grande quantidade no preparado bruto enzimático.

Segundo Thompson *et al.* (1999) e Colen (2006) os ácidos graxos liberados pela atividade das lipases podem ser de cadeia longa ou curta. Os ácidos graxos de cadeia longa não se difundem no ágar e formam halos próximos à colônia do microrganismo e mais visíveis devido à pouca solubilidade em água, enquanto os de cadeia curta por se difundirem no ágar, possuem tonalidade mais opaca e difusa. Além desses fatores, a seleção de microrganismos produtores de lipases depende de outras variáveis tais como as condições de crescimento da cepa, de produção da enzima, bem como a especificidade desta enzima pelo substrato utilizado no experimento. Além disso, os parâmetros definidos no teste devem contemplar a condição ótima de atuação de todos estes fatores. Assim, pode-se concluir que estes testes em placa de detecção da enzima possuem muitos interferentes. Estes interferentes podem ser minimizados com a padronização das condições de crescimento e dos parâmetros físico-químicos do teste (COLEN, 2006). Entretanto, devem ser utilizados com ressalvas para comparações quantitativas, devendo-se dar preferência de uso para testes de triagem e usar testes mais precisos para seleções quantitativas (SILVEIRA *et al.*, 2014).

## **5.2- Atividade lipolítica de fungos endofíticos**

Os fungos endofíticos que apresentaram halos de hidrólise (B1, M6 e J4) foram selecionados e testados em fermentação submersa (seleção secundária). Para definir a composição do meio de fermentação três condições foram testadas. Os três fungos apresentaram atividade lipolítica nas três condições testadas, conforme descrito na metodologia (Figura 14). Dentre elas, a condição III, (g.L<sup>-1</sup>): peptona bacteriológica – 20; óleo de oliva – 8,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,0; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 1,0; pH 7,0, apresentou um melhor resultado de produção de enzima lipolítica pelos três fungos selecionados, como observado nos resultados de dosagem de atividade lipolítica. O fungo isolado da semente oleaginosa de jerivá (J4) apresentou uma produção enzimática mais eficiente (1218,04 U.L<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>) (Figura 18).

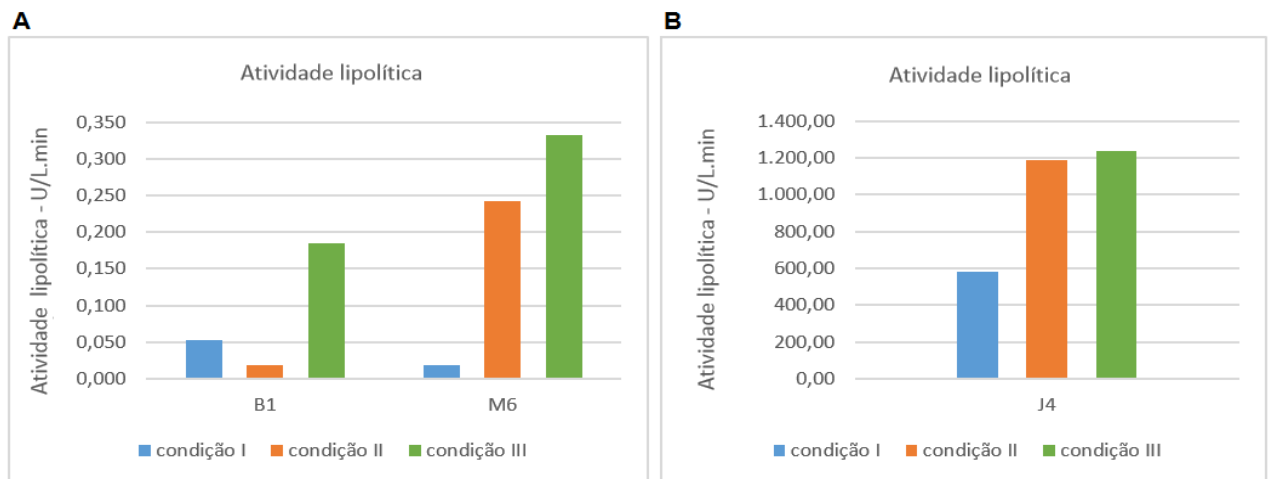


Figura 18 – Comparação das atividades lipolíticas em diferentes condições de fermentação: fungos B1 e M6 (A); J4 (B)

Outras proteínas podem ser produzidas durante o cultivo do microrganismo, sendo estas também detectáveis por dosagens de proteínas (como no método de Bradford) juntamente com a enzima de interesse. Neste caso corre-se o risco de superestimar a quantidade de enzima a ser quantificada. Tal risco pode ser minimizado pela quantificação enzimática, em termos de atividade específica, calculada pela razão entre atividade lipolítica total (UI/mL) e o teor de proteínas totais presentes na amostra (Carvalho, 2013). A dosagem de proteínas apresentou a quantidade de 0,039 g de proteínas totais em 100 mL de PBE. A atividade específica total em 100 mL de PBE foi de 3.053,43 U.g<sup>-1</sup>.

De acordo com Falcone *et al.* (2009) a produção de lipases por fungos filamentosos é influenciada pelo tipo e concentração de fontes de C e N, pelo pH do meio de cultivo, pelas fontes de carbono disponíveis e pela concentração de oxigênio dissolvido. As fontes de carbono lipídicas, como ácidos graxos, são eficientes para estimular a secreção de lipases embora alguns microrganismos não dependam de substratos indutores para secretar extracelularmente essas enzimas, estes compostos podem aumentar a quantidade desta (TAN *et al.*, 2003). Colen (2006) verificou que a produção de enzima pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi estimulada pela presença de peptona e óleo de oliva no meio e pH menos ácido ou mesmo alcalino.

A importância do isolamento de fungos endofíticos em sementes oleaginosas está diretamente relacionada com o potencial de produção de enzimas,

uma vez que estes compostos produzidos pelos fungos possuem uma inter-relação com o ambiente em que vivem. O isolamento e seleção de fungos endofíticos em sementes oleaginosas também foi avaliado por Venkatesagowda *et al.* (2012) em sete tipos de plantas (mamona, coco, amendoim, seringueira, gergelim, pongamia e neem), das quais os autores isolaram 1279 fungos endofíticos. Estes autores observaram 40 isolados fúngicos com grande potencial lipolítico, sendo que a produção de lipase foi obtida em cinco espécies de fungos e o melhor produtor foi *Lasiodiplodia theobromae*. Os fungos associados às sementes oleaginosas constituem uma comunidade microbiana diversificada, que pode ser explorada para produzir enzimas com aplicações industriais.

### 5.3 Identificação molecular do fungo endofítico

No presente trabalho, o fungo J4 apresentou melhor atividade lipolítica e foi identificado por métodos moleculares como *Fusarium* sp. (Figura 19).

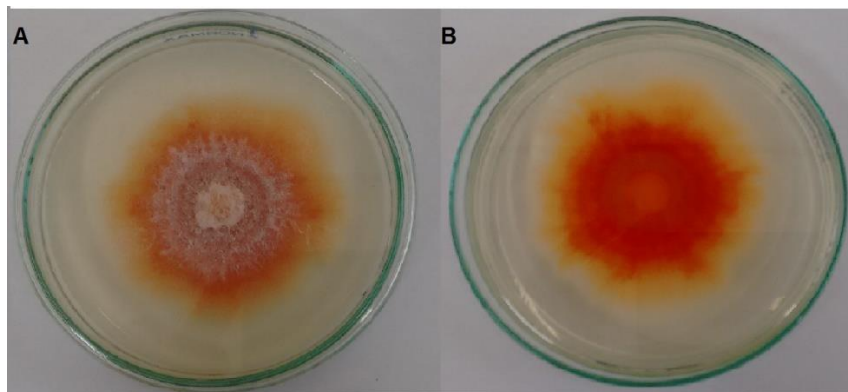


Figura 19 – *Fusarium* sp. isolado de sementes de jerivá

A: Frente; B: Verso

Fonte: Arquivo pessoal

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* têm sido amplamente reconhecidas como produtoras de lipase. Contesini *et al.* (2010), por exemplo, cita que fungos do gênero *Fusarium* isolados de diversos habitats, são bons produtores de lipases e assim apresentam importância notável nas aplicações biotecnológicas.

*Fusarium solani* está entre os mais conhecidos produtores de lipase, e estudos sobre condições de fermentação para a produção extracelular de lipase por este fungo apresentaram variações entre diferentes linhagens (MAIA *et al.*, 2001). Estes autores estudaram a capacidade lipolítica de *Fusarium solani*, utilizando a mesma metodologia do presente estudo, em meios de cultura contendo diferentes tipos de óleos (oliva, milho e gergelim). A atividade lipolítica avaliada em meio de cultura contendo o óleo de oliva apresentou valores de  $0,50 \text{ U.mL}^{-1}$ , resultado inferior ao encontrado por *Fusarium* sp. de  $1,21 \text{ U.mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , no presente trabalho. Resultados superiores ao presente estudo de produção de lipase ( $5,4 \text{ U.mL}^{-1}$ ) por *Fusarium oxysporum*, utilizando meio de cultura com óleo de oliva foram encontrados por Oliveira *et al.* (2012). Sharma *et al.* (2001) citam inúmeras linhagens de fungos filamentosos como boas produtoras de lipases, pertencentes aos gêneros, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Fernandes *et al.* (2015) encontraram 42 fungos endofíticos de raízes de soja, e dentre estes isolados aproximadamente 70% eram do gênero *Fusarium*. Luz *et al.* (2006) avaliaram 29 fungos endofíticos quanto à produção de enzimas hidrolíticas, destes isolados oito produziram enzimas lipolíticas sendo que estes eram dos gêneros *Colletotrichum*, *Glomerella* e *Fusarium*.

#### 5.4 Esterificação

*Fusarium* sp. foi o melhor produtor de enzima lipolítica segundo os testes anteriores e foi selecionado para os testes de capacidade de esterificação utilizando butanol e diferentes ácidos orgânicos. Segundo Freire e Castilho (2008) a restrição de água favorece a reação de esterificação pelas lipases. Assim, um processo de liofilização foi realizado para a remoção da água do PBE, obtido por este fungo por meio de fermentação submersa. A liofilização nas condições utilizadas neste estudo obteve rendimento de 1 g de liofilizado por 100 mL de PBE.

A capacidade de esterificação foi avaliada empregando-se os ácidos acético, butírico e oleico. O PBE liofilizado do *Fusarium* sp. apresentou atividade lipolítica e foi eficiente na conversão de ácido acético e butírico em acetato de butila e butirato de butila, respectivamente, conforme apresentado na Figura 20. Foi detectado um elevado rendimento de acetato de butila (80,33%) no período de 2 h e, após 72 h de reação, foi possível observar que a esterificação dos ácidos acético e butírico foi

superior à 90%. Baixos valores de conversão foram observados utilizando o ácido oleico, obtendo-se apenas 6,75 % de conversão após 72 h de reação.

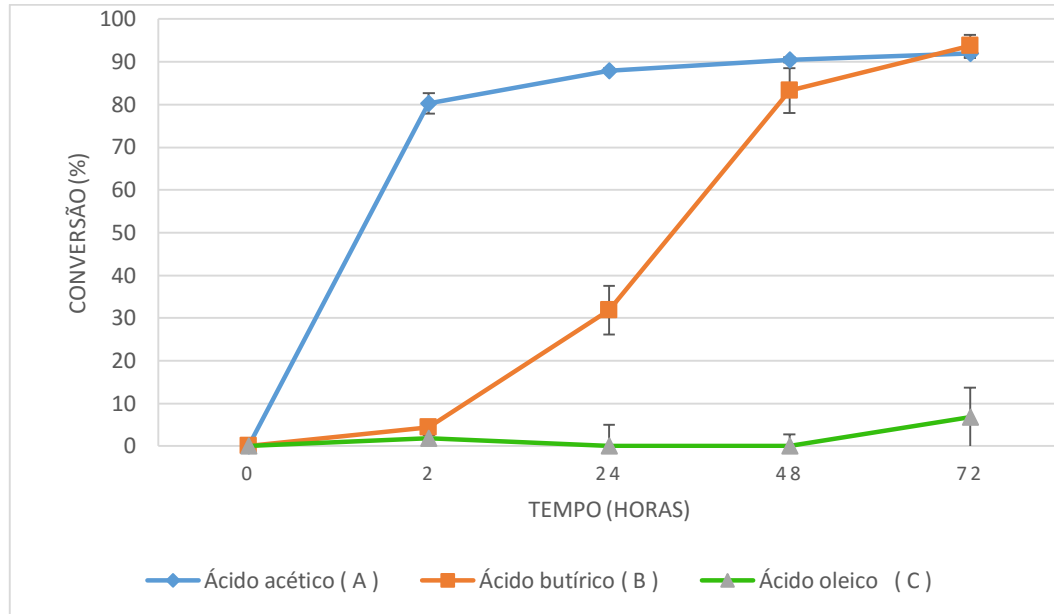


Figura 20 – Gráfico de esterificação enzimática dos ácidos acético, butírico e oleico.

Vários estudos têm demonstrado a obtenção de ésteres sintetizados com altos rendimentos, utilizando lipases de origem microbiana (AGUIEIRAS *et al.*, 2013; REINEHR *et al.*, 2014; SALAH *et al.*, 2007; SALIHU *et al.*, 2014). Salah *et al.* (2007) obtiveram uma conversão de 80% de acetato de butila utilizando heptano como solvente e uma preparação imobilizada de lipase de *Rhizopus oryzae*. Salihu *et al.* (2014) investigaram a capacidade da lipase de *Candida cylindracea* catalisar a reação de esterificação para a formação de butirato de butila e obtiveram uma conversão de 63% em 12 h de reação. Outros autores, como Martins (2012) avaliou a produção de ésteres de aroma a partir de uma lipase comercial de *Candida antarctica* utilizando ácido acético e butanol e obteve um resultado de 90% de conversão em acetato de butila, após 2,5 h sob uma condição otimizada. Mahapatra *et al.* (2009) encontraram resultado de 54,6% de produção de acetato de butila utilizando lipase de *Rhizopus oligosporus*. Os resultados obtidos por Peng *et al.* (2011) mostraram que foi alcançada a conversão de 98,2% na síntese de acetato de butila, após 8 h de tempo de reação utilizando lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. Esses trabalhos permitem inferir que embora a condição de esterificação utilizada no presente trabalho não fosse otimizada



e a enzima não estivesse imobilizada, a atividade enzimática do PBE do *Fusarium* sp. gerou altos índices de produção de ésteres.

A capacidade das enzimas de realizarem reações de esterificação está associada à alguns fatores. Aragão *et al.* (2009), por exemplo, constataram que a reação de esterificação para a síntese do butirato de isoamila variou marcadamente em função da enzima utilizada (diferente especificidade pelo substrato), bem como da presença ou ausência de solvente orgânico e do tipo de suporte utilizado na imobilização. Assim, é necessário estudos que potencializem a capacidade de esterificação de cada enzima. Esse autor conseguiu a máxima porcentagem de esterificação na síntese de butirato de isoamila utilizando uma enzima comercial de *Aspergillus oryzae* a 30 °C, 180 rpm, razão molar álcool:ácido 1:1, alcançando uma conversão superior a 80% em 48 h. Skoronski *et al.* (2013), na esterificação de hexanoato de butila, utilizando enzima do fungo *Termomyces lanuginosus*, alcançou uma conversão de 98% utilizando a condição de 25 °C, 30 rpm, razão molar álcool:ácido 2:1 durante 48 h. Martins (2012) obteve uma conversão de butanol e ácido acético em acetato de butila de 90%, utilizando lipase de *Candida antarctica* a 40 °C, 200 rpm, razão molar álcool:ácido 3:1, em 2,5 h.

O éster acetato de butila apresenta aroma característico de abacaxi (OZYILMAZ e GEZER, 2010; SALAH *et al.*, 2007), este aromatizante, pode ser utilizado nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem condições de aplicabilidade da enzima lipolítica do *Fusarium* sp. na produção desse composto.

## 5.5 Otimização da reação de esterificação

Visando melhorar a condição de esterificação, realizou-se a otimização dessa reação, por meio de um delineamento composto central rotacional com três repetições no ponto central para calcular os principais efeitos (tempo de reação, quantidade de enzima (PBE) e concentração molar dos reagentes) sobre a resposta desejada (% de conversão) e a melhor condição de reação.

Foi ajustado um modelo matemático de segunda ordem (Equação 4), com o objetivo de representar matematicamente a taxa de conversão em ésteres, obtida a partir de dados de efeitos estimados.

$$\text{Equação 4: } Y = 83,01 + 13,88 X_2 - 8,34 X_2^2$$

Onde: Y representa a resposta % de conversão; X<sub>2</sub> representa o termo linear e X<sub>2</sub><sup>2</sup> o termo quadrático da variável quantidade de enzima.

A validade do modelo proposto foi verificada por meio da análise de variância, na qual se constatou que a regressão obtida foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), apresentando um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,8308, indicando que o modelo pode explicar 83,08 % da variabilidade dos resultados experimentais obtidos.

Os resultados do delineamento, que podem ser vistos no gráfico de Pareto (Figura 21), permitiram inferir que, dentro das condições testadas, as variáveis tempo (X<sub>1</sub>) e concentração molar dos reagentes (X<sub>3</sub>) não foram significativas, assim como as interações entre as variáveis. A quantidade de enzima (X<sub>2</sub>), por sua vez, foi significativamente (95% de confiança) influente sobre a resposta (% de conversão em éster). Observou-se uma forte correlação positiva ( $r = 0,792$ ) entre a quantidade de enzima e a taxa de conversão. A relação direta entre a quantidade de enzima e as altas taxas de conversão em ésteres já foi observada por outros autores como Martins *et al.*, (2014).

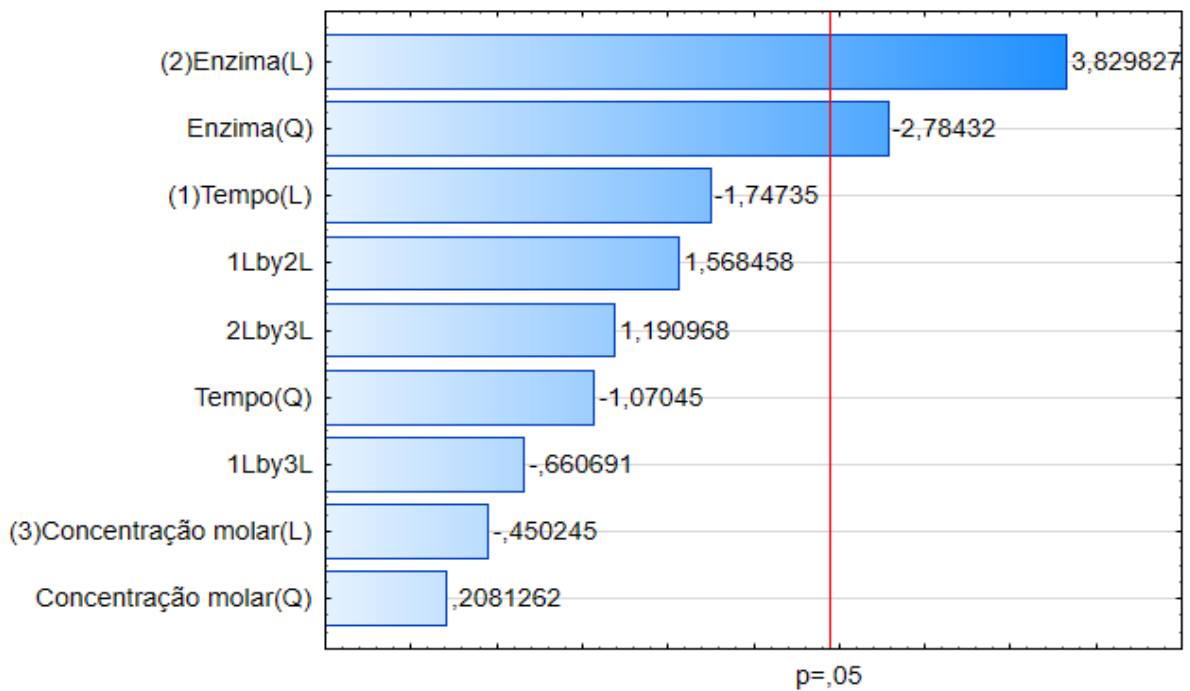


Figura 21 – Gráfico de Pareto da otimização da reação de esterificação

A maior taxa de conversão de substratos em ésteres (87,3%) deu-se utilizando 0,9 g de enzima (PBE) e o tempo de 6 h, na concentração de reagente 200 mmol.L<sup>-1</sup> (Figura 21). Entretanto, ao se utilizar o menor tempo de reação, mantendo a quantidade de enzima, alcançou-se uma taxa de conversão acima de 82%. Deve-se observar que antes da otimização, 87,96 % de rendimento de síntese de acetato de butila foi alcançado no tempo de 24 h (Figura 20) e a otimização permitiu alcançar um rendimento de 87,3 % (Tabela 4) em apenas 6 h de reação, demonstrando que a otimização melhorou as condições de reação, reduzindo o tempo em um quarto do tempo inicial. Estes resultados são interessantes, uma vez que podem acarretar em menor custo nos processos industriais, pois, do ponto de vista econômico, segundo Lee *et al.*, (2010) é favorável usar o mínimo de tempo e de quantidade de reagentes para obter a máxima conversão.

As Figuras 22 e 23, e a tabela 4 mostram os resultados da otimização.

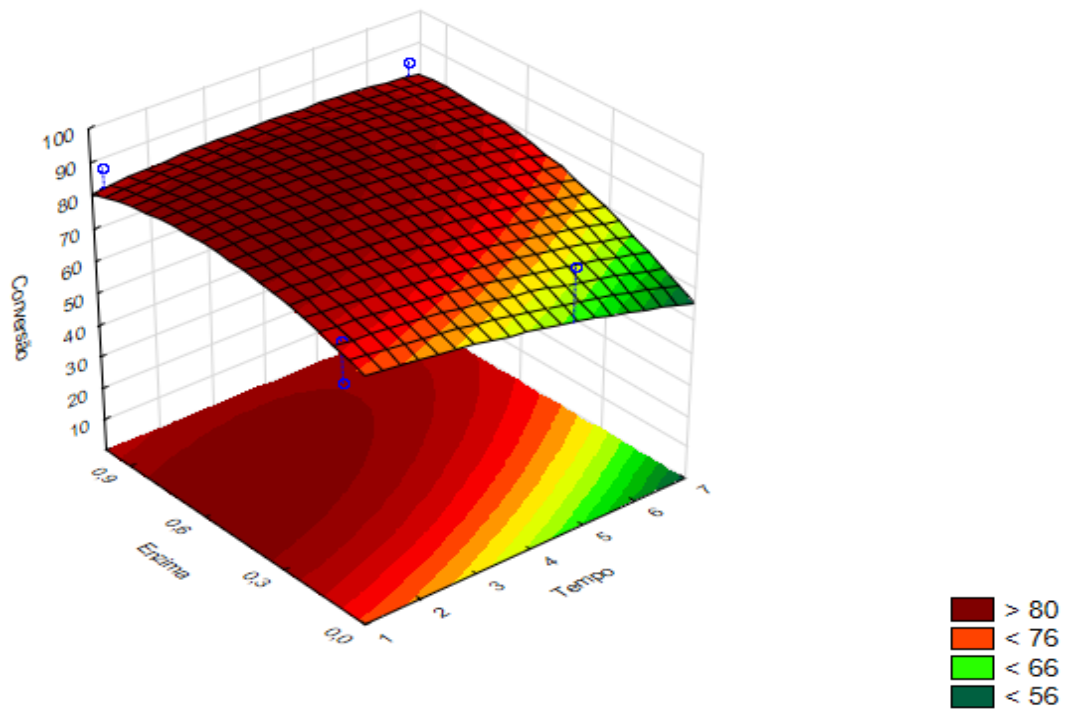


Figura 22 – Gráfico de superfície de resposta dos efeitos combinados de quantidade de enzima e tempo sobre a resposta conversão em éster.

Tabela 4 – Resultado do delineamento experimental para a produção enzimática de acetato de butila em meio orgânico

Ensaio	Conversão %	Ensaio	Conversão %
4	87,3 <sup>a</sup>	7	80,0 <sup>ef</sup>
8	85,2 <sup>b</sup>	2	78,4 <sup>fg</sup>
12	84,0 <sup>bc</sup>	9	76,9 <sup>g</sup>
15	82,6 <sup>cd</sup>	14	74,7 <sup>h</sup>
17	82,6 <sup>cd</sup>	1	65,7 <sup>i</sup>
16	82,3 <sup>cd</sup>	5	57,2 <sup>j</sup>
13	82,1 <sup>cde</sup>	6	53,4 <sup>k</sup>
10	81,6 <sup>d</sup>	11	40,3 <sup>l</sup>
3	80,1 <sup>df</sup>		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si com um  $p=0,05$ .

A concentração molar dos reagentes não apresentou efeito significativo sobre a resposta (% de conversão). Isso significa que, nas condições de ensaio, mesmo usando menores concentrações de reagentes na reação, com o máximo de enzima (PBE), ocorrerá uma produção de ésteres acima de 80% (Figura 22).

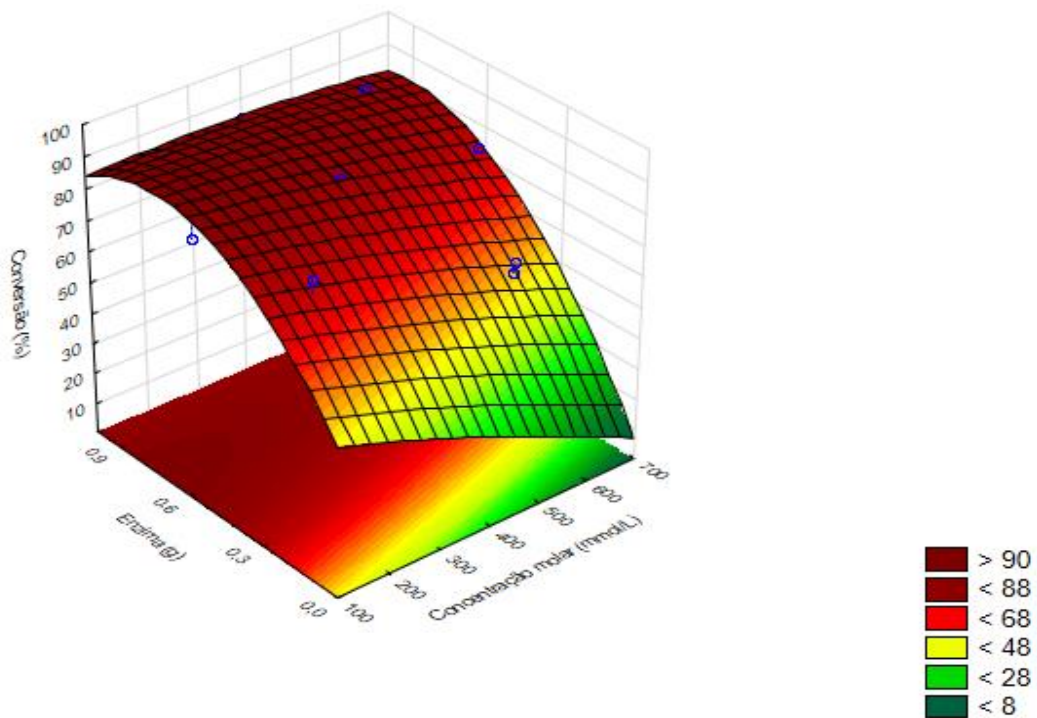


Figura 23 – Gráfico de superfície de resposta dos efeitos combinados de concentração molar de reagentes e quantidade de enzima sobre a resposta conversão em éster

Observou-se no presente trabalho que a condição de maior concentração de reagentes (ácido acético e butanol) não provocou aumento proporcional da atividade enzimática (Figura 23). Salah *et al.* (2007) sugerem que o aumento da concentração do ácido poderia desnaturar a enzima e, estes autores observaram uma diminuição significativa no rendimento de conversão quando a razão molar ácido:álcool foi superior a 1, provavelmente devido a desnaturação da lipase através da acidificação do meio reacional pelo ácido acético. Entretanto no presente estudo, foi possível observar no teste de estabilidade frente ao ácido acético, que a enzima (PBE) apresentou atividade de 99% ou mais, nas concentrações molares de 118 e 200 mmol.L<sup>-1</sup> em todos os tempos testados (Figura 24).

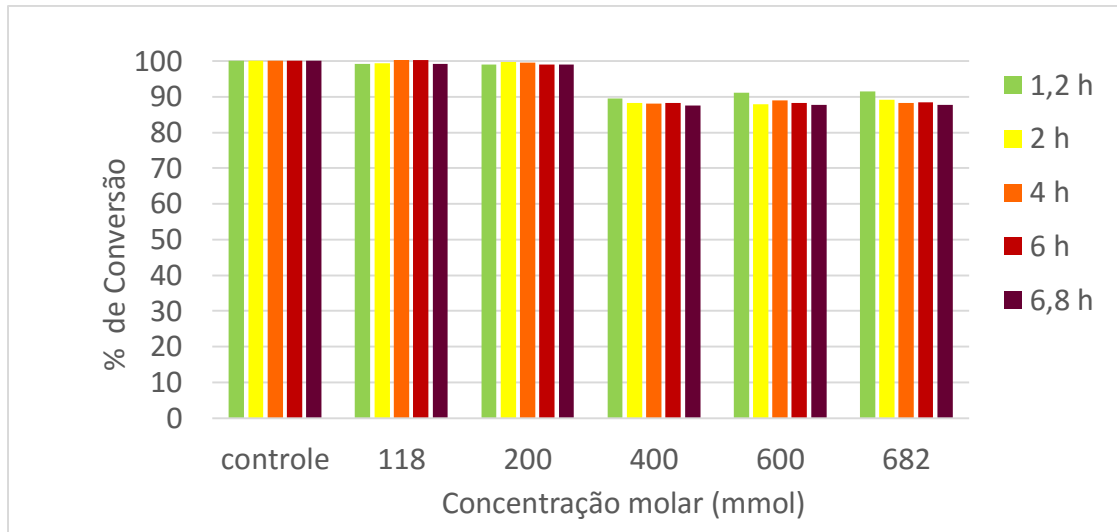


Figura 24 – Resultado do teste de estabilidade enzimática frente ao ácido acético

Nas demais concentrações molares, a enzima (PBE) apresentou atividade maior que 85%. Sendo assim, é possível concluir que a enzima (PBE) é estável frente ao ácido acético nos tempos e concentrações testados. Nesse contexto, pode-se sugerir que outros fatores podem estar interferindo na atividade enzimática. Segundo Nelson *et al.* (2011) quando a saturação da enzima é alcançada, toda a enzima presente no meio reacional já se encontra na forma combinada com o substrato e, nessa condição saturada, o aumento de substrato não provoca efeito nem na velocidade da reação nem na atividade enzimática.

Analisando a superfície de resposta (Figuras 21 e 22) pode-se notar que a condição otimizada de reação é o ensaio 4, com 6 horas de reação, 0,9 g de enzima e 200 mmol.L<sup>-1</sup> de álcool e ácido. Este ensaio difere dos demais pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Entretanto, verificou-se também a existência de uma região ótima para reação de esterificação, a qual consiste na região em torno da quantidade máxima de enzima (0,9 e 1 g), tempo entre 4 e 6 h e qualquer concentração de reagente, na qual é obtido sempre uma taxa de conversão maior do que 84 %. O resultado de faixa ótima é mais conveniente do que um valor pontual, porque fornece informações sobre a robustez do processo, uma vez que ele permanecerá estável mesmo diante de pequenas variações (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Após a determinação da condição ótima de reação, foi realizada uma nova esterificação com obtenção de  $87,25 \pm 1,2$  % de síntese de acetato de butila, validando a otimização do processo. Esse resultado é superior ao obtido por Freitas *et al.* (2009) quando estes utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar as

condições da reação de esterificação do glicerol com ácido láurico empregando lipase imobilizada de *Candida antarctica* e aumentaram de 21,0 para 31,35% a taxa de conversão. Os resultados do presente trabalho são superiores também aos encontrados por Salah *et al.* (2007) que alcançou uma conversão de 80% em acetato de butila utilizando lipase microbiana imobilizada. A comparação dos resultados deste trabalho com os achados de Freitas *et al.* (2009) e Salah *et al.* (2007) permitem inferir que a forma livre da enzima lipolítica de *Fusarium* sp. têm grande eficiência na esterificação e que sua imobilização pode gerar um aumento relativo de sua atividade, uma vez que a mesma enzima imobilizada pode ser reutilizada em diversas reações.

### **5.6 – Detecção do acetato de butila**

A formação do acetato de butila foi comprovada com a realização de análises qualitativa de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Após a otimização da condição de reação, a CG-EM permitiu determinar a conversão do éster sintetizado sem um processo de isolamento prévio do meio de reação. A Figura 25 representa o cromatograma obtido após a realização desta análise. No cromatograma, pode-se observar picos correspondentes aos reagentes de partida butanol (11,3 min), ácido acético (21,01 min) e o pico referente ao produto, acetato de butila (8,51 min).

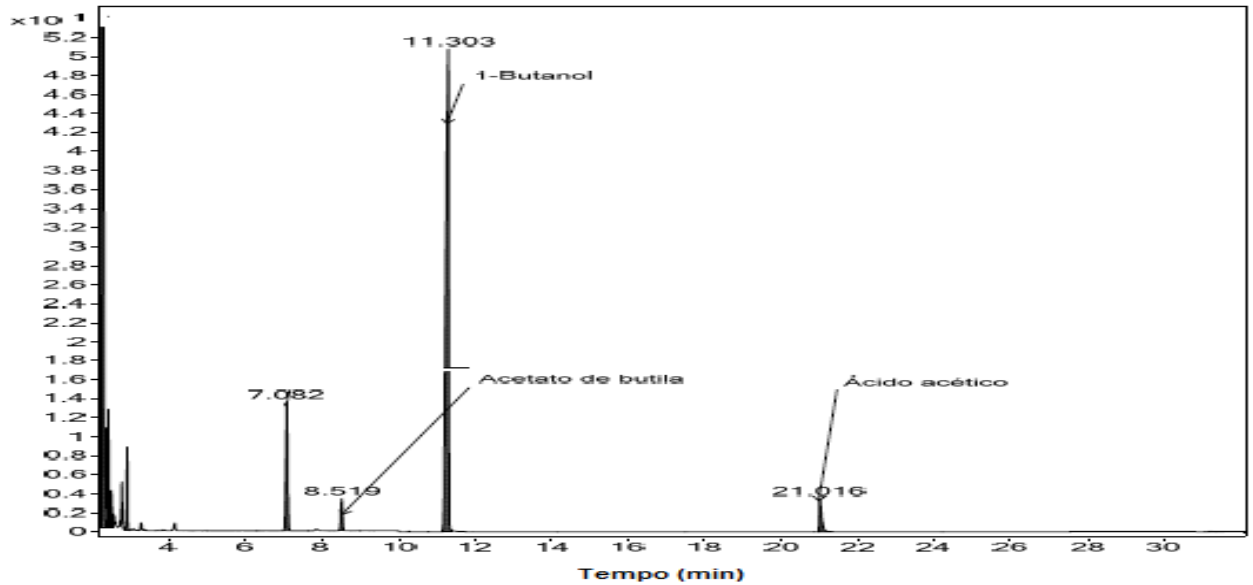


Figura 25 – Cromatograma representando butanol, ácido acético e acetato de butila

A Figura 26 representa o espectro de massas do acetato de butila encontrado após a separação dos produtos da reação de esterificação pela cromatografia gasosa. A detecção do acetato de butila foi baseada na forma da fragmentação através de espectros de massa. Os componentes voláteis foram positivamente identificados pela verificação da semelhança do espectro de massa e seus valores do tempo de retenção. A identificação foi baseada na semelhança do perfil de fragmentação dos espectros de massa do composto com o padrão no uso da biblioteca de database NIST (*National Institute of Standards and Technology*, EUA). Os dados obtidos foram analisados e comparados comprovando a formação do acetato de butila (MW 116) pelo pico  $[n \cdot + -1]$  em  $m/z$  115, bem como picos referentes a perdas características em  $m/z$  101, 87, 73, 61,56 e 43 u.m.a; este último caracterizando o acetato de butila  $[C_6H_{12}O_2]$ .



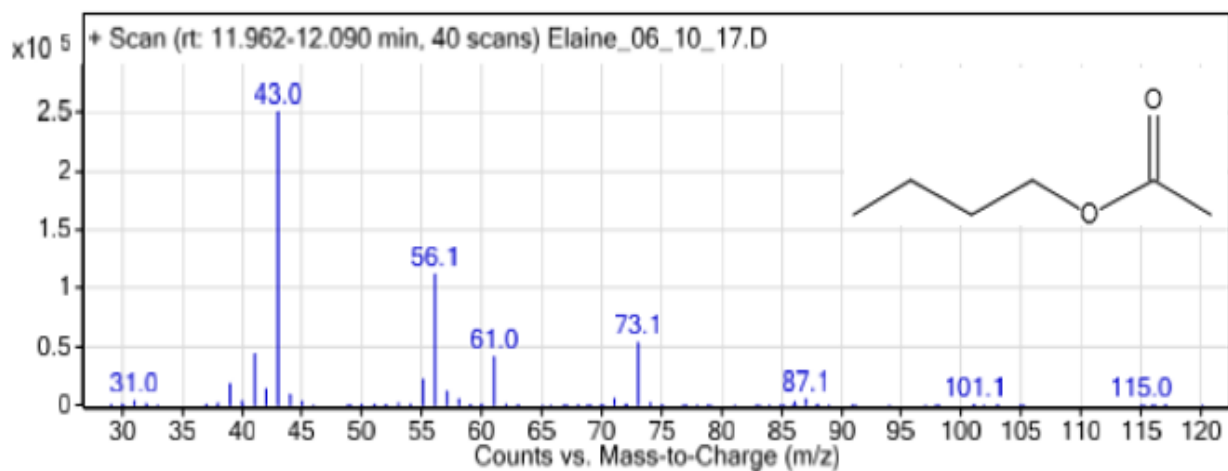


Figura 26 – Espectro de massas do acetato de butila obtido a partir da esterificação

## 6 – Conclusão

No presente trabalho foi possível isolar fungos filamentosos endofíticos a partir de sementes oleaginosas com potencial de produzir enzimas lipolíticas. Dentre os fungos isolados, três apresentaram halos de hidrólise em meio seletivo contendo óleo de oliva, sendo estes fungos provenientes de sementes de baru, jerivá e macaúba.

O fungo isolado da semente de jerivá se destacou nos valores de atividade lipolítica avaliada pelo teste de hidrólise de pNPP. Este fungo foi identificado molecularmente como *Fusarium sp.*

A enzima lipolítica produzida pelo *Fusarium sp.* foi capaz de promover a esterificação de ácido acético e butanol em acetato de butila, com uma conversão de 87,25% em um quarto do tempo inicial, em uma condição otimizada.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi eficiente na detecção e identificação qualitativa do acetato de butila.

Estudos de purificação, imobilização e capacidade de esterificação com outros substratos podem levar a futuras aplicações biotecnológicas desta enzima lipolítica.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.
- AGUIEIRAS, E.C.G.; SOUZA, S. L.; LANGONE, M. A. P. Estudo do comportamento da lipase comercial lipozyme RM IM em reações de esterificação para obtenção de biodiesel. *Química Nova*, v. 36, n. 5, p. 646-650, 2013.
- AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ S. G.; RADO, B. P. A.; RODRÍGUE, H. R.; MARTÍNEZ, H. J. L.; CONTRERASESQUIVEL, J. C. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American journal of biochemistry and biotechnology*, v. 4, p. 354-366, 2008.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALMEIDA, C. D.; YARA, R.; ALMEIDA, M. D. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, n.5, p. 467-470, 2005.
- ALMEIDA, F. D. A. C.; JERÔNIMO, E. S.; ALVES, N. M. C.; GOMES, J. D.; SILVA, A. S. Estudo de técnicas para o armazenamento de cinco oleaginosas em condições ambientais e criogênicas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.12, p.189-202, 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.90, n.6, p.1829-1845, 2011.
- AL-ZUHAIR, S.; JAYARAMAN, K. V.; KRISHNAN, S.; CHAN, W. H. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochemical Engineering Journal*. v. 30, p. 212-217, 2006.
- ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no Processamento de Fibras Têxteis. *Enzimas em Biotecnologia-Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 179-204, 2008.
- ARAGÃO, V.C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B.D.A.; THIESEN, C.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Síntese enzimática do butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. *Química Nova* v. 32, p. 2268–2272, 2009.
- ARAÚJO, M. A. M.; *Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado*. 2015. 67 p. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) Universidade Católica Dom Bosco. Campo Grande, Mato Grosso Do Sul, 2015.

ARAUJO, W. L. *Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros*. 1996. 111 p. Dissertação (Mestrado), ESALQ - USP, Piracicaba, São Paulo, 1996.

ATHAWALE, V.; MANJREKAR, N.; ATHAWALE, M. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of menthol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 16, p. 169-173, 2001.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: *Ganguli BN, Deshmukh SK (eds) Fungi: multifaceted microbes*. CRC Press, Boca Raton, 2007.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W. JR.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini LA, Barros MN, Azevedo JL (eds) *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*, 1st edn. eDUCS, Caxias do Sul, p. 233–268, 2002.

BALCAO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Biorreactors with immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416, 1996.

BICAS, J. L.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. “Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry,” *Chemical Reviews*, v. 109, n. 9, p. 4518–4531, 2009.

BILLS, G. A.; DOMBROWSKI, F.; PELAEZ, J.; POLISHOOK, Z; Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. *Tropical Mycology*, v.2 p. 165–194, 2002.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, v. 98, n.3, 426-438, 2011.

BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, p. 95-122. 2008.

BORÉM, A. A história da Biotecnologia. *Biotecnologia, Ciência e desenvolvimento*. n. 34, v. 1. p. 23-29, 2005.

BORGSTON, B.; BROCKMAN, H. L. *Lipases*, 4<sup>a</sup> ed., Elsevier: Amsterdam, 1984.

BOX, G. E. P. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building*. New York: John Wiley. p. 653, 1978.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n.1-2, p. 248-254, 1976.

BRADY, L.; BRZOZOWSKY, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase. *Nature*, v. 343, p. 767-770, 1990.

BROCKMAN, H. L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. *Lipases*, p. 1-46. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.

BURCKE, J. D.; MICHAEL, A. B.; WEINTRAUB, N.; CHARLOTTE, C.; HEWINS, R. Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology & Biochemistry*, v.43, n.4, p. 795-803, 2011.

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M. *Engenharia enzimática*, 1ª ed., Lisboa: Lidel, 2003.

CALIXTO, João B; Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult.*, São Paulo, v.55, n.3, Sept. 2003. (Disponível em: [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252003000300022&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300022&lng=en&nrm=iso)). Acessado em 17/04/2016.

CARVALHO, Fernanda Paula. Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro. 2013.119 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 2013

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 H.F., MENDES A.A., SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, p. 146-156, 2004.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v.33, n.1, p. 181-188. 2010.

CASTRO-OCHOA, L. D., RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C., VALERIO-ALFARO, G., & ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermo alkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, n.6, p.648-654. 2005.

CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAÚJO, A.R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. *Revista Virtual Química*, v. 19, 2012.

COIMBRA, M.C. Caracterização dos frutos e dos óleos extraídos da polpa e amêndoas de Guariroba (*Syagrus oleracea*), Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) e Macaúba (*Acrocomia aculeata*). 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado de Engenharia e Ciências de Alimentos). São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP. 2010.

COLECIONANDO FRUTAS. *Frutos e sementes de jerivá*. Disponível em <[http://www.colecionandofrutas.org/syagrusromanzof\\_arquivos/image002.jpg](http://www.colecionandofrutas.org/syagrusromanzof_arquivos/image002.jpg)>. Acesso em 15 dez. 2015

- COLEN, G. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases*. 2006. P. 206. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2006.
- 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.
- CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. da G.; CARVALHO, P.O. *Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, n.3, p. 163-171. 2010.
- COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiomêros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, v. 22, n. 6, p. 863-864, 1999.
- 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. 131-624. 2015.
- DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. In *History of Modern Biotechnology I* p. 1-39. Springer Berlin Heidelberg. 2000.
- DUBAL, S. A.; TILKARI, Y. P.; MOMIN, S. A.; BORKAR, I. V. Biotechnological routes in flavor industries. *Advanced Biotechnology*, v.14, p.15. 2008
- FALCONE, C.O. Avaliação de lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento. 2009, 71 p. Monografia (Programa de Graduação em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito. Espírito Santo, 2009.
- FARIA, L.A. *Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de Colletotrichum gloesporioides produzida por fermentação em substrato líquido*. 2010. 145p. Dissertação (Mestrado de Ciência de Alimentos). Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2010
- FEITOSA, I. C. *Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa*. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.
- FERNANDES, E. G.; PEREIRA, O. L.; DA SILVA, C. C.; BENTO, C. B. P.; DE QUEIROZ, M. V. Diversity of endophytic fungi in Glycine max. *Microbiological Research*, v. 181, p. 84-92. 2015.
- FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by Thermomyces lanuginosa lipase. In the AOT/Isocetane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.30, n.1, p. 43-49. 2004.
- FREEDONIA GROUP: *World Enzymes*. Cleveland, OH, USA, 2014.

- FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. *Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado*, v.1, p. 369-385. 2008.
- FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa em meio sólido. *Revista Brasileira de Farmácia*. v. 81, p. 48-56, 2000.
- FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; BARCZA, M. V.; CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel; Síntese enzimática de monolaurina por esterificação. *Química Nova*, v. 32, n. 9, p. 2277-2281, 2009.
- FRIEDRICH, J. L.; PEÑA, F. P.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A.; RODRIGUES, R. C. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 88, n.6, p. 1089-1095. 2013
- GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. D.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n.1, p. 182-192. 2008
- GANLEY, R. J.; BRUNSFELD, S. J.; NEWCOMBE, G. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, n.27, p.10107-10112. 2004.
- GEHARTZ, W. *Enzymes in Industry – Production and Application*. VCH, Weinheim.1990.
- GIONGO, J.L. *Caracterização e Aplicação de proteases Produzidas por Linhagens de Bacillus sp.* 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. RS, 2006.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G. C. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied And Environmental Microbiology*, p.1323–1330, 1995.
- GONÇALVES, F. A. G. *Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso*. 2007. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) Belo Horizonte, - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- GOPINATH S.C.B.; ANBU P.; HILDA A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience* v.46, p.119–126., 2005.
- GUEHI T.S.; DINGKUHN M.; CROS E.; FOURNY G.; RATOMAHENINA R.; MOULIN G.; CLÉMENT A. Identification and lipase-producing abilities of moulds isolated from ivorian raw cocoa beans. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. v. 3, p. 838-843, 2007.
- GUNATILAKA, A. L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 3, p. 509-526. 2006.

- GUNAWAN, E. R.; BASRI, M.; RAHMAN, M. B. A.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. A. Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, n. 7, p. 739-744. 2005.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipase: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* v.64, n. 6, p.763-781, 2004.
- GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. "A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond," *BioMed Research International*, vol. 2013, p.18, 2013. doi:10.1155/2013/329121
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, p. 597-607, 1975.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, v. 87, n.9, p. 888-891. 1997.
- HIANE P. A.; BALDASSO P.A.; MARANGOM S.; MACEDO M.L.R. Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 683-689, 2006.
- HIANE, P. A.; RAMOS FILHO, M.M.; RAMOS, M.I.L.; MACEDO, M.L.R.; Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd, pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, n. 3, p. 256-259, 2005.
- HILST, P. *Fruto e semente de macaúba*. Disponível em: <<http://www.paulohilst.com/uploads/9/3/5/1/9351412/3553528.jpg>. Acesso em: 15 dez. 2015
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.
- ISMAIL M.A. Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-Saharan tropical East African countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. *Mycopathology* v.150, p. 67-84, 2000.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current opinion in Biotechnology*, v.13, n.4, p. 390-397. 2002.
- JAEGER, K.E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n.9, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.15, n.1, p. 29-63. 1994.
- JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, v.26, p.457-470, 2008.



- KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. v.13, p.345-351, 2002
- KOBLITZ, M.G. *Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242 p. 2008.
- LEE, A.; CHAIBAKHSH, N.; RAHMAN, M. B. A.; BASRI, M.; TEJO, B. A. Optimized enzymatic synthesis of levulinate ester in solvent-free system. *Industrial Crops and Products*, v.32, n.3, p. 246-251. 2010.
- LENCI, C. G.; *Caracterização estrutural e química do tecido de reserva das sementes de Theobroma cacao, Theobroma obovatum e Theobroma microcarpum*. 2002 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2002.
- LI, J. Y.; SIDHU, R. S.; FORD, E. J.; LONG, D. M.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. The induction of taxol production in the endophytic fungus—*Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.20, n.5, p. 259-264. 1998.
- LI, J. Y.; STROBEL, G.; SIDHU, R.; HESS, W. M.; FORD, E. J. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*, v.142, n.8, p. 2223-2226. 1996.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industria: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo. v. 3, p351-352, 2001
- LIU, R.; JIANG, X.; MOU, H.; GUAN, H.; HWANG, H.; LI, X. A novel low temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4 552 for detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, p. 265-270. 2009
- LIU, S.Q.; HOLLAND, R.; CROW, V. L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, v. 14, n. 11, p. 923-945, 2004.
- LOPANDIC, K.; ZELGER, S.; BANSZKY, L. K.; ELISKASES-LECHNER, F.; PRILLINGER, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food microbiology*, v.23, n.4, p. 341-350. 2006.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3ª ed., v. 1, *Instituto Plantarum*, Nova Odessa, São Paulo. 2000.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. *Instituto Plantarum*, Nova Odessa, 2002. 88p.
- LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; DA SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. *Revista Caatinga*, v.19, n.2. 2006.
- MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. *Food Science and Technology*, v.17, n.2, p. 115-119 Campinas.1997.

- MACIEL, V. F. A.; PACHECO, T. F.; GONÇALVES, S.B. Padronização do uso do corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas. *Comunicado Técnico Embrapa*. v.1. p.1 - 3, 2010.;
- MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit *flavor* esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.60, n.1, p. 57-63. 2009.
- MAIA, M. M. D.; HEASLEY, A.; DE MORAIS, M. C.; MELO, E. H. M.; MORAIS, M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, v.76, n.1, p. 23-27. 2001.
- MAKI, C. S. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). 2006. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz. ESALQ - USP, Piracicaba, São Paulo,
- MALAJOVICH, M.A.; *Biocologia*, Axcel Books: Rio de Janeiro, 2004.
- MARINHO, A.M.R.; MARINHO, P.S.B.; RODRIGUES FILHO, E. Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungos endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE). *Química Nova*, v. 32, n. 7, p.1710-1712, 2009.
- MARTINS, A. B. *Comparação entre agitação mecânica e ultrassônica na Síntese de ésteres de aromas catalisada por lipase*. Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- MARTINS, A. B.; DA SILVA, A. M.; SCHEIN, M. F.; GARCIA-GALAN, C.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different *flavor* esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.105, p. 18-25. 2014.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p.1942-1947, 2008.
- MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CANAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.
- MAURER, K. H. Detergents proteases. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v.15, n. 3, p. 330-334, 2004.
- MCIENTÍFICA. *Fruto e sementes de baru*. Disponível em <http://www.blog.mcintifica.com.br/frutas-de-a-a-z/>. Acesso em: 15 dez.2015
- MEDEIROS, T.D.S. Diversidade florística de plantas oleaginosas de floresta de várzea e restinga do Estado do Pará. 23p Monografia de Conclusão de Curso. Centro Universitário do Pará. 2006.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; Ecologia Microbiana, *Embrapa-CNPMA*: Jaguariúna, 486 p.1998.

- MELO, L.L.M.M.; *Síntese enzimática dos ésteres de aroma butirato e valerato de citronelila por lipase de Rhizopus sp.* 2004, 94p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2004.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 78, p. 119-134, 2012. (a)
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; DE LC GIORDANO, R.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. *International journal of biological macromolecules, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.50, n.3, p. 503-511. (2012). (b)
- MIRANDA, J. S.; SILVA, N. C.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C.; LAGE, F. A.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. *Chemical Engineering Journal*, v.251, p.392-403. 2014.
- MONDAL G.C.; NANDI B. Role of fungi on oil quality of stored seeds of sesame, rape and linseed. *Journal of Food Science*, v. 49, p. 1394–1395, 1984.
- MONTESINOS, J. L.; OBRADORS, N.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, v.59, n.1, p. 25-37. 1996.
- MONTGOMERY, D. C. *Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros*. 2ª ed., LTC. Rio de Janeiro, 2003.
- MOREIRA, M. A. C.; Extração e caracterização físico-química do óleo de jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) visando a produção de biodiesel. In *6º Congresso Internacional de Bioenergia*. Centro de Eventos Sistema FIEP - Curitiba - PR - Brasil 2011.
- MOTTA P.E.F.; CURI N.; OLIVEIRA-FILHO A.T.; GOMES J.B.V. Ocorrência de Macaúba em Minas Gerais: Relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 37, p. 1023-1031, 2002.
- MUSTRANTA, A.; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in non-aqueous systems. *Enzyme And Microbial Technology*, v.15, n.2, p.133-139. 1993.
- MYERS R. H.; MONTGOMERY. D. C. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. Canada: John Wiley & Sons. 1995.
- NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2011.

NETO, A. J. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 405-412

NEUPERT, W.; BRUGGER, R.; EUCHENHOFER, C.; BRUNE, K.; GEISLINGER, G. Effects of ibuprofen enantiomers and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases. *British journal of pharmacology*, v.122, n.3, p.487-492. 1997.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; VARGAS, J. V. C.; RODRIGUES, M. L. F.; MARIANO, A. B. Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.1, n.4, p. 295-300. 2012

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Atividade enzimática de isolados de *rizóbia* nativos da amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v.1, p. 204-210, Campinas, 2006.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de ésteres de aromas de frutas: um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. *Revista Virtual de Química*, v.6, n.1, p.152-167. 2013.

OLIVEIRA, K. B.; OLIVEIRA, B. H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. *Revista Eletrônica De Farmácia*, v.9, n.1, p. 89-99, Curitiba, 2012.

OLIVEIRA, L.B.; COSTA, A.O. *Biodiesel, uma experiência de desenvolvimento sustentável*. IVIG/COPPE/Universidade Federal do Rio de Janeiro. 14p. 2003.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v.7, n.3, p.97-109, 2012

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.64, n.3, p.140-145. 2010.

PAIVA, A L.; BALCAO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanics of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 187-204, 2000.

PAIVA, C. L. A.; SÁ-PEREIRA, P. A aplicação da Biologia Molecular no aprimoramento da produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, p. 29-53. 2008.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: l-bioprocesses and products. *Process biochemistry*, v.35, n.10, p.1153-1169. 2000.
- PAQUES, F. W.; MACEDO G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99. 2006.
- PATEL, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 252, n. 5, p. 659-701, 2008.
- PENG, R.; LIN, J.; WEI, D. Synthesis of butyl acetate in n-heptane by the recombinant CS-2 lipase immobilized on kieselguhr. *African Journal of Food Science and Technology*, v.2, p.59-66. 2011.
- PERDIGÃO, C. C. H. Avaliação do potencial de produção de lipase por leveduras isoladas de babaçu (*Orbignya martiana*) e bromélia (*Vriesea minarum*). 2012. 55p Monografia (Bacharel em Farmácia) Faculdade de Farmácia, Univeridade Federal de Minas Gerais. 2012.
- PETRINI, O. *Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues*. In: Microbiology of the phyllosphere (eds. N.J.Fokkema and IVan. den Heuvel). Cambridge University Press, Cambridge, UK. P.175-187. 1986.
- PIMENTEL, M. R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology research international*, v. 2011, p.11, 2011.
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. *Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico*. (2005).
- PIRES-CABRAL, P.; da FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: a kinetic study. *Biochemical Engineering Journal*, v.43, n.3, p. 327-332. 2009.
- POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*, v.25; p. 1653-1666. 2009.
- PORTAL ARAPIRACA. *Fruto e sementes de cacau*. Disponível em <<http://portalarapiraca.com/noticia/8814/26-de-marco-dia-do-cacau.html>. Acesso em: 15 dez. 2015.
- QUETTIER, A. L.; EASTMOND, P. J. Storage Oil Hydrolysis During Early Seedling Growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.47, p. 485. 2009.
- QUÍMICA NOVA INTERATIVA. *Hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos livres*. Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=conceito.25>. Acesso em 15 dez. 2015

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian archives of biology and technology*, v.52, n.1, p. 207-219. 2009.

RAY, A. Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation*; v.2, p. 7–33. 2012

REINEHR, C. O.; RIZZARDIA, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. A. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. *Química Nova*, v.37, n.3, p.454-460. 2014.

RICHMOND, R.; POMBO-VILLAR, E. Gas chromatography–mass spectrometry coupled with pseudo–sadtler retention indices, for the identification of components in the essential oil of *Curcuma longa* L. *Journal of Chromatography A*, v. 760, p. 303–308, 2007.

ROBERTS R.G.; MORRISON W.H.; ROBERTSON J.A.; HANLIN R.T. Extracellular lipase production by fungi from sunflower seed. *Mycologia* v.79, p.265-273, 1987.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. *Planejamento Experimental e Otimização de Processos*. 2. ed. Campinas: Carita Editora, 2005.

RODRIGUES, R. C. *Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual*. Tese (Doutorado) UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. 2009.

RODRIGUES, R. L. Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. F.(*Velloziaceae*) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins. 2010.

ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. *Journal of biotechnology*, v.127, n.2, p. 269-277. 2007.

ROSA, L. H.; VAZ A. B. M.; CALIGIORNE, R.L. B.; CAMPOLINA, SA.; ROSA C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biology*, v.32, p.161–167, 2009.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. *Immobilized Enzymes and Cells*. Adam Hilger: Bristol and Philadelphia, cap. 5, 1987.

SACCARO JUNIOR, Nilo L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011.

SALAH, R. B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. *Journal of bioscience and bioengineering*, v.103, n.4, p. 368-372. 2007.

- SALAMEH, M.; WIEGEL, J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*, v. 61, p. 253-283, 2007
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Esterification for butyl butyrate formation using *Candida cylindracea* lipase produced from palm oil mill effluent supplemented medium. *Arabian Journal of Chemistry*, v.7, n.6, p.1159-1165. 2014.
- SANDE, D.; SOUZA, L. T. A.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M.; LACERDA, I. C. A.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. *Colletotrichum gloeosporioides* lipase: Characterization and use in hydrolysis and esterifications. *African Journal of Microbiology Research*, v.9, n.19, p.1322-1330. 2015.
- SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F.; BRITO, M.A. Barú: Biologia e Uso. Planaltina, DF: *Embrapa Cerrados*, 52p. 2004.
- SANTOS, F.J.; GALCERAN, M.T.; FRAISSE, D. Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile organic compounds in water. *Journal of Chromatography A*, v. 742, p. 181–189, 2006
- SANTOS, L.S.S.; RHODEN, S.A.; BARROS, I.T.; TONINI, R.C.G.; MARQUES, R.M.; SOUZA, V.H.E.; PAMPHILE, J.A. A Interação Harmônica Entre Fungos E Plantas: Aspectos Da Relação Endófito/Hospedeiro. *SaBios: Revista Saúde e Biologia*, v.8, n.1, p.92-101, 2013.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review Plant Biology*, Palo Alto, v. 55, p. 315-340. 2004
- SCHMIDT, M.; BORNSCHEUER, U. T. High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomolecular engineering*, v.22, n.1, p. 51-56. 2005.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, v.106, p. 996–1004.2002.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; The endophytic continuum. *Mycological Research*, v.109, p. 661–686. 2005.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627 - 662. 2001.
- SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C.; MACRAE, I. C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *Journal of microbiological methods*, v. 6, n. 3, p. 123-137, 1987.
- SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 74, p. 77-80, 1992.
- SILVA, C. H. D. *Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas*. 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em

Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

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.

SILVEIRA, E. de A.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Screening De Fungos Lipolíticos E Produção De Lipases Por Fermentação Em Estado Sólido Utilizando Resíduos Agroindustriais Do Processamento Do Dendê. Simpósio Nacional De Instrumentação Agropecuária. São Carlos, SP. 2014

SIM, Y. C.; NAM, Y. S.; SHIN, E.; KIM, S.; CHANG, I. S.; RHEE, J. S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer. *Pharmazie*, Berlin, v. 58, n. 4, p. 252-256. 2003.

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

SKORONSKI, E. J.; CECHINEL, M. A. P.; FERNANDES, M. Otimização da esterificação de ácido hexanóico com n-butanol empregando lipase (*Termomyces lanuginosus*) imobilizada em gelatina. *Química. Nova*, v.36, n.3, p. 364-367. 2013.

STROBEL G.A.; DAISY B.H.; CASTILLO U.; HARPER J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 257-268. 2004.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E.; SIDHU, R. S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology*, v.17, n.5-6, p. 417-423. 1996.

STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D.; FUNG, P. C. W.; CHAN, K. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, v. 60, p.179-183, 2002.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. H.; Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 67, n. 4, p.491-502, 2003.

STROBEL, G.A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis, *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2607–2612, 2009.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, v. 18, p.448-459. 2001,



- TAN, T.; Lu, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnology advances*, v. 28, n.5, p. 628-634. 2010.
- THOMSON, C. A.; DELAQUIS, P. J.; MAZZA, G. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.39, n.2, p.165-187.1999.
- TIPTON, K. F. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions. *European journal of biochemistry/FEBS*, v. 223, n. 1, p. 1-5, 1994.
- TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Caracterização química parcial do fruto do baru (*Dipteryx alata*, Vog.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.14, n.1, p.85-95,1994.
- TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; FUKUMOTO, J.; OKAMOTO, Y. Induced formation of lipase by *Geotrichum candidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.37, n.4, p.837-842. 1973.
- UNU-IAS. United Nations University – Institute of Advanced Studies: Report. Bioprospecting of Genetic Resources in the Deep Seabed: Scientific, Legal and Policy Aspects. 2005. Encontrado em:<http://www.ias.unu.edu/binaries2/DeepSeabed.pdf>, acessado em 17/04/2016.
- USTUNOL, Z.; HICKS, C. L. Effect of milk clotting enzymes on cheese yield. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 74, n. 7, p.8-16.1990.
- VAN BEILEN, J.B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.338-344, 2002.
- VAZ, A. B. M. Diversidade e aplicações biotecnológicas de fungos endofíticos associados à espécie da sub-família Mirtoideae (Myrtaceae) presentes em ecossistemas do Brasil, Argentina e Espanha. (2012). 115 p. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Belo Horizonte. 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 of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n.1, p.71-80. 2012.
- VERA, R.; JUNIOR, M. S. S.; NAVES, R. V.; SOUZA, E. D.; FERNANDES, E. P.; CALIARI, M.; LEANDRO, W. M. Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no Cerrado do Estado de Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.31, n.01, p.112-118. 2009.
- VIEIRA, M.L.A.; *Bioprospecção da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados a Solanum cernuum Vell.(SOLANACEAE)*. 2008. 117 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- VIRTO, M.; CHAVARRI, F.; BUSTAMANTE, M.A.; BARRON, L.J.R.; ARAMBURU, M.; VICENTE, M.S.; PEREZ-ELORTONDO, F.J.; ALBISIU, M.; RENOBLES, M. Lamb

rennet paste in ovine cheese manufacture. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 391-399, 2003.

VITOLLO, M. Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos*. 1 Ed. Volume 4. Ed. Edgard Blucher Ltd. p.387-420. 2001.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; DE ANDRADE, C. J.; Aspecto da produção industrial de enzimas. *Revista Citino (Hestia)*, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2011.

WARD Jr H.S.; DIENER U.L. Biochemical changes in shelled peanuts caused by storage fungi. I. Effects of *Aspergillus tamari*, four species of *A. glaucus* groups and *Penicillium cunnum*. *Phytopathol* v. 51, p. 244-250, 1961.

WATANABE N.; OTA Y.; MINODA Y.; YAMADA K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.41, p. 1353-1358, 1977.

WENZEL, J. B.; DE ALMEIDA MORESCO, A. A.; BOAS, E. V.; BURIN, F. A. G.; DE SOUZA, R. O. Atividade Enzimática e Antimicrobiana de Fungos Endofíticos Isolados de Soja. *Biológicas & Saúde*, v.3, n.9. 2013.

WHITE, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

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.

WOLSKI, E.; MENUSSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. In solid state and submerged fermentation: A comparative study, *Food Science and Technology*, v. 42, p. 1557-1560, 2009.

YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel termal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 45, p. 91-96, 2007.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*, v. 5, p. 753-771, 2006