

LUCIANA AMARAL DE FARIA

**HIDRÓLISE DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA
COM LIPASE EXTRACELULAR DE *Colletotrichum
gloesporioides* PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO
EM SUBSTRATO LÍQUIDO**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010

LUCIANA AMARAL DE FARIA

**HIDRÓLISE DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA
COM LIPASE EXTRACELULAR DE *Colletotrichum
gloesporioides* PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO
EM SUBSTRATO LÍQUIDO**

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 grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Gecernir Colen

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

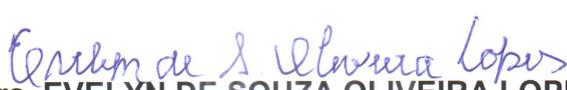
LUCIANA AMARAL DE FARIA

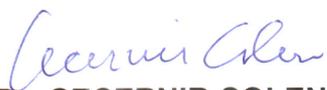
“Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido”

APROVADA EM 30 DE JUNHO DE 2010

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. JACQUES ROBERT NICOLI


Profa. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES


Prof. Dr. GECERNIR COLEN
Orientador

Dedico este trabalho à Paulinha, por ser um estímulo à minha vida. Sem ela, nada disso teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta etapa vencida em minha vida;
ao Professor Doutor Gecernir Colen, pela orientação deste trabalho;
aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela contribuição em minha formação científica;
à Professora Débora Torres Mendes de Oliveira, pelas importantes sugestões em momentos precisos;
ao Professor Doutor Gilson Andrade Ramaldes, pela gentil colaboração, colocando a nossa disposição equipamentos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Produtos Farmacêuticos da FAFAR;
ao Eduardo de Cássio Oliveira Reis, técnico do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Produtos Farmacêuticos da FAFAR, por sua prestimosa colaboração durante a realização de algumas etapas deste trabalho;
à Ana Diolina Soares Machado, pelo apoio oferecido durante a realização deste trabalho;
aos colegas do curso de Pós-Graduação pelo companheirismo;
à Raphaella, pela amizade e por poder dividir momentos de alegria e ansiedade;
à Flavinha, pelas importantes sugestões durante a realização deste trabalho e por tornar a rotina de nossos experimentos mais divertida;
à Priscila Sabaini, pela ajuda na análise de alguns dados;
à minha mãe, por seu incentivo incansável e por cuidar com tanto amor da minha princesinha;
ao meu pai, pela liberdade que me proporcionou para seguir o meu caminho;
à minha irmã, pelo seu carinho e por sua ajuda durante a realização deste trabalho;
ao Pedro, por me fazer acreditar que posso ser sempre melhor;
à FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo;
a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 JUSTIFICATIVA	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 ENZIMAS.....	21
3.2 LIPASES.....	22
3.3 LIPASES DE ORIGEM MICROBIANA.....	24
3.3.1 Aplicações potenciais	25
3.3.2 Estrutura e mecanismo de ação	28
3.3.3 Ativação interfacial	29
3.3.4 Reação catalisada pelas lipases	30
3.3.5 Especificidade	32
3.4 CARACTERÍSTICAS DOS MICROORGANISMOS USADOS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	32
3.4.1 Crescimento e fisiologia de fungos filamentosos	34
3.4.2 Produção de lipases por fungos filamentosos	35
3.4.2.1 Isolamento e seleção.....	35
3.4.2.2 Natureza do meio de fermentação.....	36
3.5 SEPARAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.....	38
3.5.1 Purificação de lipases fúngicas extracelulares	42
3.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	44
3.6.1 Produção de lipase por <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	46
3.7 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPÁSICA.....	46
3.7.1 Método titulométrico	46
3.7.2 Difusão em gel de ágar	47
3.8 ÓLEOS E GORDURAS.....	48
3.8.1 Hidrólise de óleos e gorduras	49
3.9 MACAÚBA [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart].....	53
3.9.1 Características botânicas	53

3.9.2	Potencial econômico	56
3.9.3	Potencial alimentício	58
3.9.4	Óleo da amêndoa da macaúba	58
3.10	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	61
3.10.1	Delineamento Composto Central Rotacional	62
3.10.2	Melhoramento de processos envolvendo reações hidrolíticas catalisadas por lipases	63
4	MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1	PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA EXTRACELULAR.....	67
4.1.1	Fonte de lipase extracelular	67
4.1.2	Manutenção do microorganismo	67
4.1.3	Fermentação em Substrato Líquido (FSL)	68
4.1.3.1	Preparação do inóculo.....	68
4.1.3.2	Meio de cultura líquido para a produção de lipase via FSL.....	68
4.1.3.3	Determinação da atividade lipásica.....	69
4.1.3.3.1	Método titulométrico.....	69
4.1.4	Fermentação em Substrato Sólido (FSS)	71
4.1.4.1	Preparação do inóculo.....	71
4.1.4.2	Meio de cultura para a produção de lipase vis FSS.....	71
4.1.4.3	Determinação da atividade lipásica.....	72
4.1.4.3.1	Método titulométrico.....	72
4.2	SELEÇÃO DO MELHOR PROCESSO DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR.....	73
4.3	ESTUDO DA ESTABILIDADE DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE ESTOCADA EM REFRIGERADOR A 4 °C.....	73
4.4	ESTUDO DA ESTABILIDADE DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE ESTOCADA EM FREEZER A -20 °C.....	73
4.5	ANÁLISES SOBRE A PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE DESTINADA À CONCENTRAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO.....	74
4.5.1	Determinação da atividade lipásica	74
4.5.1.1	Método titulométrico.....	74
4.5.1.2	Ensaio em placa de Petri.....	74
4.5.2	Determinação qualitativa de atividade proteásica	76
4.5.3	Determinação quantitativa de atividade proteásica	76
4.5.4	Dosagem de proteínas, pela leitura da absorvância em 280nm, da preparação bruta de lipase	78
4.5.5	Atividade lipásica específica da preparação bruta de lipase	79
4.6	CONCENTRAÇÃO, POR ULTRAFILTRAÇÃO, DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE.....	79
4.6.1	Determinação da atividade lipásica da fração retida	80
4.6.1.1	Método titulométrico.....	80
4.6.1.2	Ensaio em placas de Petri.....	80
4.6.2	Dosagem de proteínas, pela leitura da absorvância em 280nm, na fração retida	80

4.6.3	Atividade lipásica específica da fração retida.....	81
4.6.4	Determinação da atividade lipásica da fração permeada.....	81
4.6.4.1	Método titulométrico.....	81
4.6.4.2	Ensaio em placa de Petri.....	81
4.6.5	Dosagem de proteínas, pela leitura da absorvância em 280nm, na fração permeada.....	82
4.6.6	Atividade lipásica específica da fração permeada.....	82
4.7	LIOFILIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO LIPÁSICA CONCENTRADA	82
4.7.1	Determinação da atividade lipásica da preparação lipásica liofilizada.....	83
4.7.1.1	Método titulométrico.....	83
4.7.1.2	Ensaio em placa de Petri.....	83
4.7.2	Dosagem de proteínas, pela leitura da absorvância em 280nm, na preparação lipásica liofilizada.....	84
4.7.3	Atividade lipásica específica da preparação lipásica liofilizada.....	84
4.8	ESTUDO DA ESTABILIDADE DA PREPARAÇÃO LIPÁSICA LIOFILIZADA ESTOCADA EM REFRIGERADOR A 4°C.....	84
4.9	ENSAIOS PRELIMINARES ACERCA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE OLIVA.....	85
4.10	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA.....	88
4.10.1	Acidez em ácido oléico.....	88
4.10.2	Índice de iodo pelo método de Wijs.....	89
4.10.3	Índice de saponificação.....	90
4.10.4	Índice de peróxido.....	90
4.10.5	Teor de umidade.....	91
4.11	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA	92
4.12	MODELO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	93
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
5.1	PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA EXTRACELULAR.....	94
5.2	EFEITO DA ESTOCAGEM DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE, EM DIFERENTES CONDIÇÕES, SOBRE A ATIVIDADE LIPÁSICA.....	96
5.3	ANÁLISES SOBRE A PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE DESTINADA À CONCENTRAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO.....	98
5.3.1	Atividade lipásica por titulometria.....	98
5.3.2	Atividade lipásica por difusão em ágar.....	99
5.3.3	Atividade proteásica qualitativa.....	101
5.3.4	Atividade proteásica quantitativa.....	103
5.3.5	Concentração de proteínas e atividade específica.....	104
5.4	CONCENTRAÇÃO DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE POR ULTRAFILTRAÇÃO.....	104
5.4.1	Atividade lipásica por titulometria.....	105
5.4.2	Atividade lipásica por difusão em ágar.....	106

5.4.3	Concentração de proteínas e atividade específica.....	107
5.5	LIOFILIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO LIPÁSICA CONCENTRADA	107
5.5.1	Atividade lipásica por titulometria.....	107
5.5.2	Atividade lipásica por difusão em ágar.....	107
5.5.3	Concentração de proteínas e atividade específica.....	108
5.6	EFEITO DA ESTOCAGEM DA PREPARAÇÃO LIPÁSICA LIOFILIZADA, A 4°C, SOBRE A ATIVIDADE LIPÁSICA.....	108
5.7	ENSAIOS PRELIMINARES ACERCA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE OLIVA.....	109
5.7.1	Efeito da concentração de enzima e do tempo, no grau de hidrólise.....	113
5.8	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA.....	116
5.9	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA.....	119
6	RELAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS.....	122
7	CONCLUSÃO.....	124
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
APÊNDICE A - MEMÓRIA DE CÁLCULO DO GRAU DE HIDRÓLISE DO ÓLEO DE OLIVA PARA DADOS DA TABELA 12.....		137
APÊNDICE B - MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA 16.....		140
APÊNDICE C - MEMÓRIA DE CÁLCULO DO GRAU DE HIDRÓLISE DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA PARA DADOS DA TABELA 17.....		145

LISTA DE TABELAS

1	Resumo de estudos realizados acerca do perfil de ácidos graxos do óleo da amêndoa da macaúba.....	59
2	Resumo de estudos realizados acerca das características físico-químicas do óleo da amêndoa da macaúba.....	60
3	Valores utilizados no DCCR para as duas variáveis.....	85
4	Matriz do DCCR para a combinação das variáveis concentração de enzima e tempo de reação.....	85
5	Parâmetros fermentativos do cultivo submerso (FSL), em frascos sob agitação, e de cultivo em substrato sólido (FSS) de <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	93
6	Parâmetros fermentativos do cultivo submerso (FSL) de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> em frascos sob agitação.....	97
7	Detecção de atividade lipásica da preparação bruta de lipase obtida via FSL, por ensaios em placas com géis de ágar alcalinos contendo tributirina ou emulsão de óleo de oliva como substratos.....	98
8	Resumo das análises sobre as diferentes preparações lipásicas de <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	103
9	Detecção de atividade lipásica da fração retida, após ultrafiltração, e diluída, por ensaios em placas com géis de ágar alcalinos contendo tributirina ou emulsão de óleo de oliva como substratos.....	105
10	Detecção de atividade lipásica da fração liofilizada reconstituída, por ensaios em placas com géis de ágar alcalinos contendo tributirina ou emulsão de óleo de oliva como substratos.....	106
11	DCCR para a hidrólise enzimática e grau de hidrólise.....	108
12	Coeficiente de regressão para a resposta (Y).....	109
13	ANOVA para a resposta (Y).....	110
14	Valores experimentais e valores estimados de grau de hidrólise do óleo de oliva.....	111
15	Caracterização físico-química do óleo da amêndoa da macaúba.....	116
16	Porcentagem de hidrólise e concentração de ácidos graxos.....	120
B1	Média e o desvio padrão do teor de umidade do óleo da amêndoa da macaúba.....	139
B2	Teor de umidade, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba.....	139
B3	Quadro ANOVA.....	139
B4	Média e o desvio padrão do índice saponificação do óleo da amêndoa da macaúba.....	140
B5	Índice de saponificação, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba.....	140

B6	Quadro ANOVA.....	140
B7	Média e o desvio padrão do índice de peróxido do óleo da amêndoa da macaúba.....	141
B8	Índice de peróxido, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba.....	141
B9	Quadro ANOVA.....	141
B10	Média e o desvio padrão do índice de acidez do óleo da amêndoa da macaúba.....	142
B11	Índice de acidez, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba.....	142
B12	Quadro ANOVA.....	142
B13	Média e o desvio padrão do índice de iodo do óleo da amêndoa da macaúba.....	143
B14	Índice de iodo, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba.....	143
B15	Quadro ANOVA.....	143

LISTA DE FIGURAS

1	Macaúba – <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.....	54
2	Frutos da macaúba.....	55
3	(a) Frutos da macaúba em corte transversal. (b) Semente do fruto da macaúba: endocarpo envolvendo a amêndoa.....	55
4	(a) Óleo da amêndoa da macaúba. (b) Óleo da polpa da macaúba.....	58
5	Fluxograma Fase 1.....	64
6	Fluxograma Fase 2.....	65
7	Fluxograma Fase 3.....	65
8	Frascos contendo o meio para FSS, após a esterilização.....	71
9	Efeito do tempo de estocagem da preparação bruta de lipase, a 4°C, sobre a atividade lipásica.....	96
10	Efeito do tempo de estocagem da preparação bruta de lipase, a -20°C, sobre a atividade lipásica.....	96
11	Halos de hidrólise formados nos meios ATV e AEPV, após 24 horas de incubação.....	99
12	Aspectos do meio de gelatina usado para detecção de atividade proteásica.....	100
13	Efeito do tempo de estocagem, a 4°C, sobre a atividade lipásica da preparação liofilizada de lipase.....	107
14	Diagrama de Pareto.....	109
15	Valores experimentais versus resíduos.....	111
16	Valores previstos versus valores experimentais.....	112
17	Superfície de resposta para a hidrólise enzimática do óleo de oliva (escalas de tempo e concentração de enzima em valores codificados).....	113
18	Gráfico de contornos para a hidrólise enzimática do óleo de oliva (escalas de tempo e concentração de enzima em valores codificados).....	114
19	Grau de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba em função do tempo de reação.....	118
20	Concentração de ácidos graxos em função do tempo de hidrólise.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPIs -	Ácidos graxos poliinsaturados
FSL -	Fermentação em substrato líquido
FSS -	Fermentação em substrato sólido
GA -	Goma arábica
DCCR -	Delineamento composto central rotacional
PD&I -	Pesquisa, desenvolvimento e inovação
MAPA -	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PDA -	Ágar batata e dextrose
Rpm -	Rotações por minuto
Meq -	Miliequivalente
AEPV	Ágar com emulsão de óleo de oliva e corante azul Victoria
APV	Ágar com tributirina e corante azul Victoria

RESUMO

No presente estudo foi testada a capacidade de produção de lipase extracelular pelo fungo filamentoso *Colletotrichum gloesporioides*, por dois métodos de fermentação: em substrato líquido e em substrato sólido. A fermentação em substrato líquido propiciou a maior produção de lipase por este microorganismo e foi selecionado como método para a obtenção da preparação bruta de lipase extracelular. Alíquotas da preparação bruta de lipase armazenadas a 4°C e a -20°C não se mantiveram estáveis, apresentando uma queda progressiva em relação à atividade lipásica. A preparação bruta foi então concentrada por ultrafiltração, alcançando 81% de recuperação da atividade lipásica e um fator de concentração de 1,5 vezes. Em seguida, a preparação lipásica concentrada foi liofilizada. Este processo possibilitou a estabilidade, ao longo do tempo, da atividade lipásica da preparação liofilizada, que foi aplicada nos ensaios preliminares de hidrólise enzimática do óleo de oliva. Estes ensaios levaram à elaboração da equação ajustada que explicou a variação do grau de hidrólise em função da variação simultânea da concentração de enzima e do tempo de reação: $y = 35,25 + 3,19x_1 + 8,65x_2$. O grau de hidrólise do óleo de oliva variou de 18,8 a 43,7%, havendo um aumento de rendimento da reação de, aproximadamente, 57%. Finalmente, a evolução da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba foi acompanhada, baseando-se na combinação dos parâmetros escolhidos como os adequados, a partir da hidrólise do óleo de oliva, encontrando-se uma relação direta entre o grau de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba e o tempo de reação.

Palavras-chave: hidrólise; lipase; *Colletotrichum gloesporioides*; óleo da amêndoa da macaúba.

ABSTRACT

Extracellular lipase production by the filamentous fungi *Colletotrichum gloesporioides* was tested using two fermentation methods: in liquid substrate and in solid substrate. The liquid substrate fermentation yielded a larger production of lipase by this microorganism and was selected as the method for obtaining the extracellular lipase crude solution. Aliquots of the lipase crude solution stored at 4° C and at - 20° C were not stable, and presented a progressive decrease in lipase activity. The crude solution was then concentrated by ultrafiltration, reaching a recovery of 81% of the lipase activity and a 1.5 fold concentration factor. Then, the concentrated lipase solution was lyophilized. This process led to stabilization, through time of the lipase activity of the lyophilized solution, which was applied on the preliminary tests of the enzymatic hydrolysis of olive oil. These tests led to the adjusted equation which explained the variation of hydrolysis degree in relation to the simultaneous variation of enzyme concentration and reaction time: $y = 35,25 + 3,19x_1 + 8,65x_2$. The hydrolysis degree of the olive oil varied between 18.8 and 43.7%, and there was a 57% increase in the reaction yield. Finally, the evolution of the Macaúba kernel oil was followed up, based on the combination which was chosen as the most advantageous, from the olive oil hydrolysis, reaching a direct relationship between the degree of hydrolysis and the reaction time.

Key words: Hydrolysis; lipase; *Colletotrichum gloesporioides*; Macaúba kernel oil.

1 INTRODUÇÃO

As transformações de moléculas orgânicas realizadas por microorganismos vivos ou catalisadas por enzimas de origem microbiana representam uma alternativa de grande potencial na indústria de alimentos.

As enzimas são bastante versáteis e possuem um número de propriedades que as tornam altamente requisitadas como catalisadores. Em geral, toda enzima, especialmente, em razão da sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares sem que ocorram reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Além disso, apresenta alta eficiência catalítica, elevando a velocidade das reações. As condições de atuação de enzimas são sempre brandas, ao contrário dos processos químicos em que se tornam necessários temperaturas mais elevadas e valores de pH distantes da neutralidade. Outra vantagem na utilização de enzimas é a regulação da atividade enzimática com relativa facilidade, bastando, para isso, modificar a natureza do meio de reação, como por exemplo, pela alteração do pH ou pela adição de algum efector. Por esses motivos, o emprego de enzimas em processos industriais os torna relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente, além de os produtos formados apresentarem melhor qualidade (PATEL, 2002; PIZARRO & PARK, 2003; CASTRO et al., 2004; HASAN et al., 2006).

As lipases (E.C.3.1.1.3, triacilglicerol acilhidrolases), em particular, são enzimas que ocupam um lugar de destaque entre os biocatalisadores e possuem muitas aplicações, motivo este que faz crescer significativamente sua participação no mercado mundial de enzimas industriais (SAXENA et al., 2003^b; HASAN et al., 2006; FREIRE & CASTILHO, 2008).

O potencial biotecnológico das lipases relaciona-se ao fato de catalisar não apenas a hidrólise, mas também, reações inversas de esterificação. Estas enzimas catalisam a hidrólise, em meio aquoso, de triacilgliceróis. Observa-se, no entanto, que em condições de baixa quantidade de água, as lipases promovem a catálise da reação inversa, ou seja, da reação de esterificação.

Há, ainda, as características particulares destas enzimas que as tornam catalisadores de bastante interesse. As lipases, normalmente, mantêm sua estrutura e atividade em solventes orgânicos, não requerem a presença de co-fatores, catalisam reações em baixa temperatura e pressão, possuem uma larga especificidade pelo substrato, e exibem alta enantiosseletividade (ELIBOL & OZER, 2002; CARVALHO et al., 2003; SAXENA et al.,

2003^b; BURKERT et al., 2004; CASTRO et al., 2004; TAN et al., 2004; CONTESINI et al., 2009; REIS et al., 2009; AÇIKEL, et al., 2010; RIGO et al., 2010).

A versatilidade das lipases em catalisar diferentes tipos de reação amplia consideravelmente as aplicações comerciais e tecnológicas destas enzimas e, por isso, também são utilizadas como biocatalisadores ideais em química orgânica, química fina, na indústria farmacêutica, e na produção de aditivos alimentares (ELIBOL & OZER, 2002; BURKERT et al., 2004; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004).

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 organolépticas, físico-químicas e nutricionais dos produtos, dependendo do tamanho da cadeia carbônica e do grau de insaturação (JAEGER & REETZ, 1998). As lipases também podem participar da aceleração do processo de maturação de queijos e na hidrólise da gordura do leite. E ainda, no processo de panificação, a sua utilização produz um efeito condicionante à massa, aumenta o volume do pão, melhora a textura do miolo e a cor branca (CASTRO et al., 2004). A hidrólise realizada por lipases pode ser aplicada também para a obtenção de monoacilgliceróis, que são usados como agentes emulsificantes (FREIRE & CASTILHO, 2008).

As lipases podem ser comumente encontradas na natureza e são obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Numerosas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são produtoras de lipases, sendo os últimos, os melhores (CASTRO et al., 2004; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; COLEN, 2006; HASAN et al., 2006; VARGAS et al., 2008; CONTESINI et al., 2009; AÇIKEL et al., 2010).

Observa-se que a preferência para a utilização industrial recai sobre as lipases de origem microbiana, sendo, frequentemente, mais úteis que as de origem vegetal e animal. Tal fato pode ser justificado, entre outras razões, pela variedade de microorganismos, pela possibilidade de manipulação genética, e pelo rápido crescimento dos microorganismos em meios relativamente de baixo custo (COLEN, 2006; HASAN et al., 2006).

Tendo em vista a maior importância das lipases microbianas, os estudos de otimização de processos fermentativos para sua obtenção têm sido amplamente realizados. É predominante a utilização da fermentação submersa para a produção de lipases fúngicas em escala industrial, por ser fácil de executar e controlar tecnologicamente, e por apresentar rendimento satisfatório (ELIBOL & OZER, 2002; TAN et al., 2003; BURKERT et al., 2004; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; AZEREDO et al., 2007; RAJENDRAN & THANGAVELU, 2007). Porém, a fermentação em substrato sólido tem ganhado bastante interesse, especialmente devido à possibilidade de uso de resíduos agro-industriais, de baixo custo,

como fontes de matéria-prima (AZEREDO et al., 2007; CONTESINI et al., 2009; WOLSKI et al., 2009; RIGO et al., 2010).

Dependendo da finalidade do uso, o grau de pureza das lipases varia de preparações brutas até altamente purificadas. Operações de separação, concentração e purificação de enzimas ocorrem em seqüência, após o processo fermentativo, para separação dos produtos obtidos (“*Downstream Processes*”). A escolha da técnica para a preservação da estrutura da enzima é de fundamental importância (KRSTIC et al., 2007).

Óleos e gorduras são produtos muito utilizados em processos de biotransformação, sendo comum a aplicação de enzimas como catalisadores. Dentre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, esterificação e interesterificação desses lipídeos utilizando lipases (CASTRO et al., 2004). Por serem matérias-primas obtidas de fontes naturais, são largamente empregados pelas indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias. Do total de óleos e gorduras produzidos, 80% são utilizados para fins alimentícios, 6% são utilizados na alimentação animal e 14%, como material de provimento para indústrias oleoquímicas (GUNSTONE, 2002).

O interesse por plantas com potencial oleaginoso tem aumentado e, dentre tais plantas, pode-se destacar a macaúba.

A macaúba pertence à família *Arecaceae*, anteriormente denominada *Palmae*, de vasta distribuição geográfica nas Américas e, no Brasil, sua área de ocorrência estende-se pelos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo amplamente espalhada pela área de Cerrado. É considerada a palmeira de maior dispersão, no Brasil (BORA et al., 2004; LORENZI, 2006; AMARAL, 2007).

A palmeira da macaúba é uma importantíssima fonte de recursos, os quais são utilizados como alimentos, combustíveis, medicamentos caseiros, na cobertura das casas ou confecção de utensílios e adornos domésticos e, em alguns casos, como matéria-prima para as indústrias locais (LORENZI, 2006). Entretanto, o produto, economicamente, mais expressivo desta palmeira é o fruto, principalmente, devido aos óleos que produz, que representa cerca de 30% de cada fruto. Seu potencial oleaginoso se compara ou supera o potencial das plantas mais produtivas.

Um dos principais aspectos para a utilização da macaúba na produção de óleos, deve-se ao fato de seu fruto gerar co-produtos muito valorizados. Podem ser aproveitados, além do óleo, as produtos da polpa, a amêndoa que se transforma em torta para alimentação do gado, e as fibras que se transformam em carvão de excelente qualidade.

Além disso, sua alta produtividade, a facilidade de extração e o baixo custo da produção de óleos, colocam a macaúba como uma das plantas oleaginosas mais promissoras para a inclusão na cadeia produtiva do biodiesel.

O fruto da macaúba fornece dois tipos de óleo: da polpa e da amêndoa. O óleo da polpa do fruto da macaúba é vermelho amarelado, enquanto que o óleo da amêndoa é transparente (BORA & ROCHA, 2004; HIANE et al., 2005). Quanto ao perfil de ácidos graxos, o primeiro é rico em ácidos oléico e palmítico, enquanto que o segundo, em ácidos láurico e oléico (AMAYA-FARFÁN et al., 1986; LAGO et al., 1991; BORA & ROCHA, 2004; HIANE et al., 2005; AMARAL, 2007).

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba utilizando preparação liofilizada de lipase extracelular do fungo filamentoso *Colletotrichum gloesporioides*. Os objetivos específicos foram:

- (i) Determinar o melhor processo fermentativo (FSS ou FSL) para a produção de lipase extracelular do fungo filamentoso.
- (ii) Obter filtrados do melhor processo fermentativo, como preparação bruta de lipase.
- (iii) Determinar as atividades lipásica e proteásica, na preparação bruta de lipase.
- (iv) Avaliar a estabilidade da lipase, na preparação bruta armazenada a 4°C e a -20°C.
- (v) Submeter a preparação bruta de lipase ao processo de concentração, por ultrafiltração.
- (vi) Determinar a atividade lipásica, nas frações permeada e retida advindas do processo de ultrafiltração.
- (vii) Submeter a fração retida (preparação lipásica concentrada) ao processo de liofilização.
- (viii) Determinar a atividade lipásica, na preparação lipásica liofilizada.
- (ix) Avaliar a estabilidade da preparação lipásica liofilizada armazenada a 4°C.
- (x) Realizar ensaios preliminares de hidrólise do óleo de oliva, com a lipase liofilizada.
- (xi) Realizar análises físico-químicas do óleo da amêndoa da macaúba.
- (xii) Realizar a hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba, com a lipase liofilizada.

2 JUSTIFICATIVA

A macaúba é uma palmeira típica do Cerrado, cuja abundância proporciona às populações da área de incidência, exploração artesanal da amêndoa e da polpa de seus frutos para as mais diversas finalidades. Interessa notar seu potencial oleaginoso que a classifica dentre as plantas mais produtivas.

Atualmente, tem aumentado o interesse econômico em torno das pesquisas acerca do óleo extraído da amêndoa, uma vez que há perspectivas reais de utilização da macaúba como matéria-prima para produção de biodiesel no Brasil. No sentido de viabilizar a utilização comercial da macaúba e torná-la uma espécie realmente atrativa para a produção de biodiesel, a Embrapa Agroenergia tem coordenado projetos de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) envolvendo esta cultura. Tais projetos abrangem a exploração sustentável de aglomerados nativos desta palmeira, e o desenvolvimento de sistemas de produção, onde a macaúba é cultivada em plantios racionais.

Portanto, os resultados do presente estudo podem, de alguma forma, servir como ponto de partida para pesquisas futuras acerca da produção desse tipo de combustível. Novos conhecimentos acerca do óleo da amêndoa da macaúba fortalecerão e aperfeiçoarão a exploração de todo seu potencial oleaginoso.

Além disso, a realização da pesquisa nessa área também pode ser justificada devido à escassez, na literatura pesquisada, de trabalhos conclusivos e abrangentes sobre a hidrólise enzimática do óleo da amêndoa da macaúba utilizando lipase de fungo filamentosos.

Com efeito, a disponibilidade de lipases no Laboratório de Microbiologia Industrial da FAFAR/UFMG é uma oportunidade que deve ser aproveitada, uma vez que as referidas enzimas podem ser produzidas por linhagens do fungo filamentosos *Colletotrichum gloesporioides*, disponíveis e com capacidade de produção testada.

Ressalta-se, todavia, que nenhum processo de concentração e liofilização da lipase de *Colletotrichum gloesporioides* foi testado até o momento, razão pela qual entende-se que a realização de tais processos servirá para futuros estudos de caracterização e das propriedades químicas, físico-químicas e biológicas da referida lipase.

Deve ser mencionado, ainda, sobre a enorme potencialidade de aplicação das lipases pelas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos, e a diversidade de propriedades que justificam o estudo acerca de sua produção e aplicação.

Por fim, é importante notar que as atividades propostas permitem estabelecer algumas condições experimentais para a aplicação prática da lipase obtida do fungo filamentoso *Colletotrichum gloesporioides*, visando a sua utilização em reações de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores formados por longas cadeias de aminoácidos, sendo, portanto, proteínas com atividade catalítica.

As enzimas são bastante versáteis e possuem um número de propriedades que as tornam altamente requisitadas como catalisadores e as diferem dos catalisadores não enzimáticos. Dentre tais propriedades destacam-se: alta eficiência catalítica (podem elevar a velocidade de uma reação de 8 a 12 vezes); seletividade; atuação em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C) e em pressão atmosférica. Outra vantagem na utilização de enzimas é a regulação da atividade enzimática com relativa facilidade, bastando para isso, modificar a natureza do meio de reação, como por exemplo, pela alteração do pH ou pela adição de algum efector. E, em razão da sua grande especificidade, toda enzima catalisa as transformações moleculares sem que ocorram reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas (PATEL, 2002; PIZARRO & PARK, 2003; CASTRO et al., 2004; HASAN, et al., 2006).

O emprego de enzimas em processos industriais os torna relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e de investimentos de baixo custo.

Transformações químicas catalisadas por enzimas são alternativas de grande potencial de aplicação na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica e na área de química fina, tornando-se um mercado crescente e promissor, movimentando um valor estimado em cerca de US\$3,6 bilhões por ano. O mercado global da indústria de enzimas abrange o setor de produtos alimentícios, detergentes, têxteis, tratamento de couro e vinícolas. No setor alimentício, destaca-se a aplicação de enzimas na produção de alimentos fermentados, edulcorantes, etanol de cereais, produtos lácteos, sucos de frutas, e em cervejarias e panificação (PIZARRO & PARK, 2003; CASTRO et al., 2004; BON et al. 2008^a).

A exploração comercial de enzimas abrange uma vasta gama de produtos enzimáticos. A finalidade do uso determina o grau de pureza com o qual a enzima deve ser produzida. Em operações de manufatura, são empregadas as enzimas sob a forma de preparações brutas ou pouco purificadas, comercializadas em volumes muito elevados, tais como, o malte, fonte de amilases, e o sobrenadante concentrado de fermentações industriais. Enquanto que em programas de pesquisas químicas, farmacêuticas ou médicas,

empregam-se enzimas “finas”, altamente purificadas, de elevado custo (GOLDSTEIN, 1987, citado por COLEN, 2006; BON et al., 2008^a).

Atualmente, o maior setor da indústria biotecnológica consiste na produção e uso de enzimas de origem microbiana. Embora alguns biocatalisadores sejam até hoje extraídos de tecidos animais e vegetais, microorganismos, em particular, são requisitados como fontes de enzimas (bactérias, fungos e leveduras) (NEIDLEMAN, 1991; SHIMIZU et al., 1997; BON et al., 2008^a).

Dentre as enzimas de origem animal, têm importância a pancreatina (uma mistura de enzimas extraída do pâncreas de suínos), a tripsina e a quimotripsina (extraídas do pâncreas de suínos), a pepsina (extraída da mucosa do estômago de suínos), a renina ou coalho (extraída do quarto estômago de bezerros), e a catalase (extraída do fígado e sangue de animais, bem como de microorganismos).

As enzimas de origem vegetal de interesse são, principalmente, proteases, tais como a papaína (extraída do látex do fruto verde do mamão), a bromelina (extraída do pendúnculo do abacaxi), a ficina (extraída do látex da figueira) e o malte (variedade de enzimas originadas da germinação de cereais) (LIMA et al., 2001).

As enzimas microbianas mais utilizadas industrialmente são, na sua maioria, extracelulares e obtidas de bactérias e fungos (filamentosos e leveduras), das quais se destacam a α amilase (*Bacillus licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*), a glicoamilase (*Aspergillus niger*), a protease (*B. licheniformis*, *A. niger*, *Mucor mihei*, *M. pusillus*), a celulase (*Trichoderma viride*) e a pectinase, entre outras (JAEGER et al., 1994; OLSON et al., 1994).

Devido à enorme variedade, à possibilidade de manipulação genética, ao rápido crescimento dos microorganismos em meios relativamente de baixo custo, as enzimas microbianas são frequentemente mais úteis que as enzimas animais e vegetais. Além disso, a importância das enzimas microbianas tem sido cada vez maior, dado que não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento como ocorre com as enzimas vegetais e animais (COLEN, 2006; HASAN et al., 2006).

3.2 LIPASES

Enzimas lipolíticas são amplamente distribuídas na natureza e formam o grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lipídios (DRAVANOV & KHALAMEIZER, 1997). Este grupo recebe maior importância entre os biocatalisadores,

devido ao seu potencial biotecnológico. As lipases são exemplos de enzimas hidrolíticas (HASAN et al., 2006; GONÇALVES, 2007).

Lipases (E.C.3.1.1.3, triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas que ocupam um lugar de destaque entre os biocatalisadores e têm muitas aplicações, motivo este que faz crescer significativamente sua participação no mercado mundial de enzimas industriais. As lipases, no futuro, terão importância industrial e comercial comparável às das peptidases, cuja venda entre as enzimas industriais, alcança 25 a 40% (SAXENA, et al., 2003^b; HASAN et al., 2006; FREIRE & CASTILHO, 2008; CAI et al., 2009).

As lipases atuam sobre a ligação éster de vários compostos sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. São enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol fornecendo diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, segundo a equação geral (1):



Entretanto, em ambientes com baixa atividade água, catalisam a reação inversa de esterificação, levando à formação de acilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol. Portanto, a hidrólise de gorduras e óleos é direcionada pelo conteúdo de água da mistura de reação, e num ambiente não aquoso a lipase catalisa a síntese do éster (JAEGER et al., 1999; CARVALHO et al, 2003; PIZARRO & PARK, 2003; HASAN et al., 2006; SAXENA et al., 2003^b; FREIRE & CASTILHO, 2008; CONTESINI et al., 2009; AÇIKEL et al., 2010; RIGO et al., 2010).

Além da reação de síntese de éster, as lipases catalisam reações de transesterificação, que são mais importantes para processos biotecnológicos, nos quais o doador do grupo acila é um éster. Já nas interesterificações catalisadas por lipases, o grupo acila é trocado entre duas moléculas de éster (CARVALHO et al, 2003; PIZARRO & PARK, 2003; COLEN, 2006).

O potencial biotecnológico das lipases relaciona-se ao fato de catalisar não apenas a hidrólise, mas também reações inversas como a esterificação e a transesterificação. Normalmente, mantêm sua estrutura e atividade em solventes orgânicos, não requerem a presença de co-fatores e requerem condições brandas de temperatura e pressão. Apresentam uma larga especificidade pelo substrato e alta enantiosseletividade (ELIBOL & OZER, 2002; CARVALHO et al., 2003; BURKERT et al., 2004; de CASTRO et al., 2004; CONTESINI et al., 2009; RIGO et al., 2010).

Ocorre, ainda, certa divergência entre a definição exata dos termos lipases e esterases. Entretanto, as lipases apresentam capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Tal fato exclui as esterases típicas, que agem em ésteres solúveis em água, ou que hidrolisam outros lipídeos (acilidrolases, colesterol esterases, tioesterases e outras) (OLIVEIRA, 2000; CARVALHO et al., 2003; SAXENA, et al., 2003^b; CASTRO et al., 2004; TAN et al., 2004; PANDA & GOWRISHANKAR, 2005; GONÇALVES, 2007; AÇIKEL et al., 2010).

Atualmente, com o auxílio da biofísica, da cristalografia e da modelagem molecular tem crescido o número de pesquisas e o grau de conhecimento acerca da caracterização estrutural e da elucidação do mecanismo de ação das lipases, do aprimoramento de suas propriedades enantiosseletivas, assim como da clonagem e da expressão de genes de lipases em organismos de fácil cultivo (FREIRE & CASTILHO, 2008).

As lipases podem ser comumente encontradas na natureza e ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Numerosas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são produtoras de lipases, sendo os últimos, os melhores produtores. Eram obtidas, inicialmente, de pâncreas de animais para serem utilizadas como um produto de ação digestiva para consumo humano (CASTRO et al., 2004; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; COLEN, 2006; HASAN et al., 2006; VARGAS et al., 2008; CONTESINI et al., 2009). Em organismos eucarióticos, as lipases estão envolvidas com o metabolismo de lipídeos, e nas plantas, são encontradas em tecidos de reserva energética (SHARMA et al., 2001).

3.3 LIPASES DE ORIGEM MICROBIANA

As lipases microbianas apresentam um amplo espectro de aplicações industriais, uma vez que são mais estáveis que as lipases animais e vegetais, além de poderem ser produzidas com menor custo, com alta velocidade de síntese, com grande versatilidade, e com maior simplicidade na manipulação ambiental e genética da capacidade produtiva dos microorganismos (CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; ELLAIAH et al., 2004; FREIRE & CASTILHO, 2008). São, em sua maioria, extracelulares, fato que facilita sua extração, seu isolamento e sua purificação (CARVALHO et al., 2003).

As lipases de origem microbiana são utilizadas em alimentos, na fabricação de detergentes (hidrólise de gordura), de cosméticos (remoção de lipídeos) e tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas). É enorme o potencial catalítico destas enzimas e, por isso, também são utilizadas como biocatalisadores ideais em química

orgânica, química fina (síntese de ésteres), na indústria farmacêutica, e na produção de aditivos alimentares (realçador de aroma) (ELIBOL & OZER, 2002; BURKERT et al., 2004; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004).

Fungos filamentosos têm crescido em preferência como produtores de lipases, destacando-se a espécie *Aspergillus niger*. Talvez, isso explique o fato de que, culturalmente, a maioria das aplicações das lipases se dê na área de alimentos, na qual se empregam fungos considerados GRAS (“Generally Regarded As Safe”) (IWASHITA, 2002; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; ELLAIAH et al., 2004; CONTESINI et al., 2009; AÇIKEL et al., 2010). O uso histórico dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* na produção de alimentos e bebidas tradicionais, como queijos e saquê, elevam-os ao status GRAS (IWASHITA, 2002).

Algumas importantes lipases fúngicas utilizadas comercialmente são obtidas dos gêneros: *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum* e *Fusarium*. Dentre as leveduras, a *Candida rugosa* é a que mais tem sido empregada em processos industriais (OLIVEIRA, 2000; TAN et al., 2003; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; ELLAIAH et al., 2004).

Embora existam inúmeras publicações a respeito de microorganismos produtores de lipases, há pouca informação sobre o processo fermentativo (ELIBOL & OZER, 2002).

O cultivo do fungo em meio de cultura líquido (fermentação submersa) torna-se menos compatível com as condições de seu habitat natural. Entretanto, é predominante a utilização da fermentação submersa para a produção de enzimas fúngicas em escala industrial (IWASHITA, 2002; HOLKER et al., 2004; HASAN et al., 2006). A fermentação em substrato sólido ocorre na presença de pouca água livre, situação que ocorre nas condições ambientais às quais os fungos estão adaptados.

3.3.1 Aplicações potenciais

A versatilidade das lipases em catalisar a hidrólise de ésteres e reações de esterificação, transesterificação e interesterificação, amplia consideravelmente as aplicações comerciais e tecnológicas destas enzimas. Por isso, podem ser aplicadas na indústria de alimentos, de detergentes, oleoquímica, farmacêutica, de química fina, de cosméticos, de polpa e papel, de couro, de biossensores e no tratamento de efluentes ricos em óleos e gorduras.

Na manufatura de alimentos, as lipases são empregadas na hidrólise seletiva de óleos e gorduras para obter ácidos graxos livres, que podem, ou não, sofrer modificações químicas posteriores. Os ácidos graxos livres influenciam as propriedades organolépticas, físico-

químicas e nutricionais dos produtos, dependendo do tamanho da cadeia carbônica e do grau de insaturação (JAEGER & REETZ, 1998).

Na indústria de laticínios, as lipases são empregadas na aceleração do processo de maturação de queijos e na hidrólise da gordura do leite. A demanda crescente por leite e derivados com menor teor de gordura tem obrigado o setor industrial a encontrar alternativas para seu uso. Dessa forma, a lipase tem sido utilizada 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 organolépticos aos alimentos (VIRTO et al., 2003).

Outro campo de aplicação da lipase é na indústria de panificação, onde se utiliza lipase 1,3 específica para obter efeito condicionador da massa, aumentar o volume do pão, melhorar a textura do miolo e melhorar a cor branca. Nesse caso, a lipase degrada os lipídeos do trigo, modificando sua interação com o glúten (CASTRO et al., 2004).

A hidrólise realizada por lipases 1,3 específicas é aplicada para a obtenção de monoacilgliceróis que são usados como agentes emulsificantes (FREIRE & CASTILHO, 2008).

Lipases catalisam a reação de transesterificação utilizada na fabricação da manteiga de cacau (produto de alto valor), partindo de óleos como o de palma. Há também o processo de interesterificação conduzido na presença de lipase para obtenção de produtos glicerídeos, 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).

Atualmente, o maior consumidor de lipase é a indústria de formulação de detergentes. O marco na utilização de lipase em detergentes ocorreu com o produto Lipolase® (lipase de *Humicola lanuginosa*) da empresa Novo Nordisk, em 1994. Em 1995, foi lançada a Lipolase Ultra® que apresentava maior capacidade de remoção de gorduras. A versão LipoPrime®, lançada dez anos após a Lipolase®, garantia remoção, em um único ciclo de lavagem, de manchas gordurosas. Outros produtos detergentes, como Lumafast® (Genencor) e Lipomax® (Gist Brocades), contêm lipases extracelulares de *Pseudomonas* (JAEGER & REETZ, 1998; CASTRO et al, 2004).

A partir dos estudos de BANG et al. (1978), citado por SHIMADA et al. (1994), os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) tornaram-se substâncias farmacêuticas potenciais. Dentre os AGPIs, o ácido linoléico (ômega 6, 18:2 n-6) e o ácido linolênico (ômega 3, 18:3 n-3) são chamados, particularmente, de ácidos graxos essenciais, por serem obtidos somente

a partir da dieta. Os ácidos ômega 3 e ômega 6 formam um importante grupo de compostos da dieta humana, uma vez que participam da prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias. Dessa forma, o interesse em torno da concentração desses AGPIs tem crescido significativamente na área da indústria farmacêutica e de suplementos alimentares (VACEK et al., 2000; CARVALHO et al., 2003; CASTRO et al., 2004; FREITAS et al., 2007; PADILHA & AUGUSTO-RUIZ, 2007; FORESTI & FERREIRA, 2010).

Concentrados de AGPIs de importância nutricional podem ser obtidos com a aplicação de lipases. Os AGPIs esterificados ao glicerol é a forma mais fácil de se obter através das reações enzimáticas catalisadas por lipases, além de ser a forma melhor absorvida pelo organismo (CARVALHO et al., 2003; HASAN et al., 2006).

A utilização de emulsões com lipídeos estruturados, na área de alimentação parenteral e enteral, tem sido vista como alternativa aos óleos vegetais utilizados tradicionalmente. E lipídeos estruturados podem ser obtidos pelo uso de lipases (FREIRE & CASTILHO, 2008; FORESTI & FERREIRA, 2010).

O uso de lipases nas indústrias de química fina e farmacêutica tem sido cada vez mais comum dado às características de regio-, enantio- e quimiosseletividade. Estas enzimas, portanto, são aplicadas na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos compostos. As lipases são também utilizadas na produção de antidepressivos, anti-hipertensivos e vasodilatadores (PATEL, 2002; HASAN et al., 2006).

As possibilidades de aplicações das lipases na indústria oleoquímica são enormes. O biodiesel é uma fonte renovável de energia, é biodegradável e apresenta baixo índice de emissão de partículas e de gases como CO, CO₂. Pesquisas em torno da produção de biodiesel utilizando lipases, através da transesterificação de triglicerídeos com álcoois de cadeia curta, têm crescido significativamente nos últimos anos. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa produzidos na reação podem ser empregados como combustível. Foram realizadas as produções de biodiesel catalisadas por lipases a partir de diferentes tipos de óleos, tais como de girassol, de soja, de coco, de palma e de macaúba (LEE et al., 2002; PIZARRO & PARK, 2003; TALUKDER et al., 2010).

A partir da hidrólise de lipídeos pelas lipases, obtém-se ácidos graxos e glicerol, tendo, ambos, importantes aplicações industriais (GANDHI, 1997; HASAN et al., 2006).

Na indústria de papel, dispõe-se de preparações de lipases que são utilizadas para controle de depósitos de *pitch* (depósitos de resinas), removendo componentes hidrofóbicos (triglicerídeos e ceras) que causam problemas durante a fabricação do papel (KONTKANEN et al., 2004; DURAN et al., 2008).

Atualmente, diversas enzimas são empregadas como catalisadores em métodos diagnósticos, tornando possível a análise de uma substância específica, em amostras biológicas, sem precisar de isolamento. Geralmente, essas enzimas são encontradas em *kits* reagentes. A lipase participa do *kit* “Lipase/glicerol-quinase/glicerol-3-P-oxidase/peroxidase”, que avalia substratos como triglicérides e glicerol (CRUZ et al., 2008).

Há muitos anos, enzimas são utilizadas na área cosmética. Algumas patentes, relacionadas ao uso de lipase em cosméticos, já foram depositadas. Dentre elas pode-se destacar: (i) a patente depositada pela empresa detentora da marca L’oreal, em 1994, em que a lipase é associada a ésteres C2-25 como despigmentante; (ii) a patente depositada pela empresa detentora da marca Yves Rocher, em 1994, em que a lipase é destinada para uso capilar no tratamento da seborréia; (iii) e a patente depositada, também, pela empresa detentora da marca L’oreal, em 2000, sendo a lipase utilizada como precursor de vitamina. As lipases são ainda empregadas em produtos auxiliares no tratamento da celulite, juntamente com a enzima hialuronidase (SANTOS et al., 2008).

Um novo e crescente campo de atuação das lipases refere-se ao tratamento de efluentes. Diversos tipos de lipases já foram testados quanto a essa capacidade. Lipase de *Pseudomonas aeruginosa* foi testada no pré-tratamento de efluentes de restaurantes (DHARMSTHITI & KUHASUNTISUK, 1998) e a de *Candida rugosa*, empregada no tratamento de resíduos domésticos (JAEGER & REETZ, 1998).

3.3.2 Estrutura e mecanismo de ação

Desde 1990, muitas estruturas de lipases foram determinadas, sendo todas de origem microbiana. Dados importantes relacionados com a conformação da molécula puderam ser revelados com a aplicação de técnica de cristalografia e raio X (OLIVEIRA, 2000; SAXENA et al., 2003^b).

As lipases podem alcançar massa molecular entre 20 e 75kDa com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, atividade na faixa de pH que vai de 4 a 9 e temperatura que varia entre 25 e 70°C, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (JAEGER & REETZ, 1998; CARVALHO et al., 2003; CASTRO et al., 2004).

Essas enzimas apresentam estruturas protéicas variáveis, mas todas apresentam uma característica padrão – o entrelaçado de α/β hidrolase. O sítio ativo da lipase é formado pela tríade “serina – histidina - ácido aspártico ou glutâmico”. O resíduo de serina nucleofílico localiza-se, invariavelmente, no C-terminal da fita β 5 de um pentapeptídeo, formando uma

característica principal: “ β em torno de α ” nomeada de cavidade nucleofílica. O sítio é composto de uma folha β central, consistindo de 8 diferentes fitas β conectadas com 6 α hélices.

Nas lipases, o nucleófilo se encontra no resíduo de serina. A hidrólise do substrato ocorre em duas etapas. Inicia-se com o ataque pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxila do resíduo de serina nucleofílico no carbono carbonílico da ligação éster, ocorrendo a formação de um intermediário tetraédrico. Observa-se em todas essas enzimas a ocorrência da fenda do oxianion que estabiliza o estado de transição, onde os intermediários tetraédricos são formados. Na próxima etapa, um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado com a liberação dos ácidos graxos e regeneração da enzima (JAEGER et al., 1999; OLIVEIRA, 2000; CARVALHO et al., 2003; SAXENA et al., 2003^b; CASTRO et al., 2004; REIS et al., 2009).

A estrutura molecular atribuída às lipases preenche os requisitos estruturais de uma enzima que é solúvel em meio aquoso, ativa na interface água-óleo e hidrolisa substratos hidrofóbicos (OLIVEIRA, 2000).

3.3.3 Ativação interfacial

Lipase, uma carboxiesterase, diferentemente das esterases, atuam em substratos emulsificados. Mesmo sendo solúveis em água, as lipases catalisam reações hidrolíticas de triglicerídeos insolúveis, pois agem na interface de sistemas bifásicos óleo/água. Estas enzimas, portanto, não obedecem às equações de cinética enzimática de Michaelis-Menten, que são válidas apenas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea. Dessa forma, a análise das reações catalisadas por lipases ocorre utilizando-se substrato lipídico sob a forma de emulsão. Ao contrário das lipases, as esterases atuam somente em compostos solúveis em água.

O fenômeno de “ativação interfacial”, originado a partir de estudos cinéticos de reações lipolíticas, relaciona o aumento da atividade da lipase com a presença de uma interface óleo/água mantida sob a forma de emulsão ou micelas. A velocidade de reação é determinada pela área superficial da emulsão, e não apenas pela concentração de lipídeos na emulsão.

Somente em emulsões óleo/água bem dispersas, homogêneas e estabilizadas as determinações de atividade lipásica fornecem resultados satisfatórios. E interferentes, como

proteínas, sais biliares, ácidos graxos, mono-, e diacilgliceróis podem causar modificações na interface e, portanto, na atividade lipásica.

O sítio ativo da lipase não pode ser acessado pelo substrato diretamente, uma vez que é coberto por uma superfície entrelaçada chamada de “tampa”. Com a ligação do substrato à superfície da enzima, essa “tampa” se move, abrindo a enzima. Dessa forma, o sítio ativo torna-se prontamente acessível ao substrato, expondo uma área hidrofóbica significativa para a interação da lipase com a interface lipídica. Esse mecanismo explica o fenômeno de ativação interfacial (VERGER, 1997; DRAVANOV & KHALAMEIZER, 1997; JAEGER et al., 1999; JAEGER & REETZ, 1998; OLIVEIRA et al., 1999; OLIVEIRA, 2000; ELIBOL & OZER, 2002; CASTRO et al., 2004; GONÇALVES, 2007; REIS et al., 2009; VOLPATO et al., 2010).

Entretanto, a presença da “tampa” não está necessariamente relacionada à ativação interfacial, tendo sido descritas lipases como as de *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida antártica* B, que não demonstraram ativação interfacial, embora possuíssem uma “tampa” cobrindo seus sítios ativos. Dessa forma, a presença de uma “tampa” e a ativação interfacial não são critérios convenientes para classificar uma enzima como lipase.

Assim, segundo JAEGER & REETZ (1998) e CASTRO et al. (2004), a definição cabível às lipases é bastante simples: uma lipase é uma carboxiesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa.

3.3.4 Reações catalisadas pelas lipases

Em meio aquoso, as lipases catalisam a hidrólise das ligações ésteres de triglicerídeos insolúveis em água. Entretanto, em ambientes com restrição de água ocorre a reação inversa, ou seja, a formação destas mesmas ligações ésteres.

A hidrólise de éster é a reação típica catalisada por lipases. Essa reação ocorre sequencialmente nos grupos acila do triglicerídeo, formando diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres. A água participa como co-substrato por ser consumida na reação de hidrólise (OLIVEIRA, 2000).

Na reação de esterificação ou síntese, ocorre a formação de éster do ácido graxo e água, a partir de glicerol (álcool) e ácido graxo (ácido carboxílico). A formação de água, em quantidades maiores, pode afetar o equilíbrio da reação, diminuindo a atividade da lipase. Assim, o controle do conteúdo de água é fundamental para determinar a direção do processo (JAEGER et al., 1999; OLIVEIRA, 2000; CARVALHO et al., 2003; PIZARRO & PARK, 2003;

HASAN et al., 2006; SAXENA et al., 2003^b; FREIRE & CASTILHO, 2008; CONTESINI et al., 2009; REIS et al., 2009).

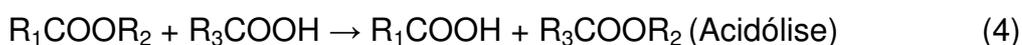
Os dois processos básicos de hidrólise e síntese podem ser combinados em uma seqüência lógica para originar reações de transesterificação, nas quais ocorre transferência de agrupamentos acil. As reações de transesterificação dão origem a um novo éster e a outra molécula (ácido graxo, álcool, éster). Ao contrário das esterificações, a remoção de água é desnecessária nas transesterificações. Os diferentes tipos de reação de transesterificação dependem do tipo de acceptor do grupo acila. Podem ser denominadas glicerólise (glicerol como acceptor), alcoólise (álcool como acceptor), ou acidólise (ácido como acceptor) (JAEGER et al., 1999; OLIVEIRA, 2000; CARVALHO et al., 2003).

Alguns autores usam o termo “interesterificação” para todas estas reações. Entretanto, a terminologia que emprega o prefixo “trans” designa a transferência enzimática de um grupamento químico de uma molécula para outra. Nas interesterificações, o grupo acila é trocado entre duas moléculas de éster, podendo ser considerada um tipo particular de transesterificação. E nessa reação, exige-se uma pequena quantidade de água além daquela necessária para a enzima manter-se em um estado hidratado ativo (GANDHI, 1997; OLIVEIRA, 2000; CARVALHO et al, 2003; PIZARRO & PARK, 2003; COLEN, 2006). As lipases catalisam, portanto, as seguintes reações de síntese:

Esterificação



Transesterificação



Interesterificação



3.3.5 Especificidade

É notável o interesse de uso das lipases na modificação estrutural de óleos e gorduras, devido à sua especificidade em relação ao substrato. Podem ser classificadas em

três grupos – (i) Lipases 1,3 específicas; (ii) Lipases não específicas; (iii) Lipases ácido graxo específicas – em função de sua especificidade em relação ao substrato.

- **Lipases 1,3 específicas:** pertencem a esse grupo as lipases de *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii*, e *Mucor miehei*, lipase pancreática e lipases vegetais (colza, mostarda). Catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente nas posições 1 e 3 dos triglicerídeos e formam produtos diferentes daqueles obtidos por lipases não regioseletivas.
- **Lipases não específicas:** fazem parte, as lipases de *Penicillium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea*. Não apresentam especificidade com relação à natureza do grupo acil ou à posição em que está esterificado. Portanto, catalisam a hidrólise de triacilgliceróis para ácidos graxos livres e glicerol, aleatoriamente. Liberam ácidos graxos de qualquer posição do triglicerídeo.
- **Lipases ácido graxo específicas:** tipicamente, a lipase de *Geotrichum candidum* representa esse grupo. Catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nos triacilgliceróis. Catalisam a hidrólise de ésteres cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada, contendo dupla ligação *cis* no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados ou sem insaturação no carbono 9 são lentamente hidrolisados. (PLOU et al., 1996; DRAVANOV & KHALAMEIZER, 1997; CARVALHO et al., 2003; CASTRO et al., 2004).

3.4 CARACTERÍSTICAS DOS MICROORGANISMOS USADOS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS

O êxito no processo fermentativo é determinado, primordialmente, pelo microorganismo produtor. O primeiro requerimento para o sucesso do processo fermentativo é a cepa de microorganismo apropriado com alto rendimento de produção. Além disso, o microorganismo utilizado no processo fermentativo deve ser seguro, sob o ponto de vista biológico, suportar condições ambientais adversas, manter constância fisiológica, ser de fácil cultivo, e ser tolerante à presença de substâncias tóxicas que podem ser geradas pelo metabolismo celular.

A identificação e aquisição do microorganismo produtor é a primeira etapa para a produção de enzima microbiana. Os microorganismos podem ser obtidos de coleções de cultura (Banco de Cepas), ou selecionados a partir de nichos ecológicos naturais. No caso das lipases fúngicas, os fungos produtores podem ser isolados de resíduos industriais gordurosos, de fábricas de processamento de óleos vegetais e laticínios, de solos contaminados com óleo e de sementes oleaginosas.

A manutenção dos microorganismos em culturas puras é de extrema importância para evitar a perda ou redução de suas propriedades fenotípicas, que podem ocorrer, por exemplo, por mutações. Dentre as técnicas de manutenção, estão a liofilização, a crioconservação, a conservação em parafina, glicerol ou sob óleo mineral com a realização de repiques periódicos e checagem de suas características (COLEN, 2006; BON et al., 2008^b).

A produção de um metabólito por um microorganismo requer um conhecimento de suas características de crescimento e de sua fisiologia. A produção de diferentes tipos de metabólitos requer diferentes condições fisiológicas, mas também é influenciada pelas características do desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico de cada microorganismo, que é única. Por isso, as condições de fermentação e o estágio de desenvolvimento do microorganismo devem ser bem estabelecidos para obter, de maneira eficaz, o metabólito de interesse (PAPAGIANNE, 2004).

Há séculos, os fungos filamentosos têm sido usados como produtores de muitos metabólitos, proteínas e enzimas, na produção de alimentos, bebidas e até mesmo fármacos. As enzimas exploradas podem ser as originalmente produzidas pelos fungos ou as heterólogas, que naturalmente estão presentes em outro microorganismo. Neste caso, com técnica de biologia molecular, os genes do microorganismo produtor original (selvagem) são transferidos para outro microorganismo, que se torna capaz de produzir a enzima (IWASHITA, 2002; PAIVA & SÁ-PEREIRA, 2008).

Ocorrem ainda enzimas constitutivas que estão sempre disponíveis, enquanto outras, designadas indutivas, são sintetizadas em resposta às condições ambientais. Em relação às enzimas indutivas, os microorganismos possuem mecanismos de regulação que são acionados por substâncias indutoras, ativadoras, inibidoras ou repressoras (BON et al., 2008^b).

O crescimento dos fungos nos processos fermentativos está relacionado à disponibilidade de substâncias que os satisfaçam nutricionalmente e de condições favoráveis. Muitos estudos têm tratado da otimização de meios de cultura, em processos fermentativos, para a produção de determinada substância de interesse (ELIBOL & OZER,

2002; TAN et al., 2003; BURKET et al., 2004; TAN et al., 2004; FREITAS et al., 2007; CONTESINI et al., 2009; AÇIKEL et al., 2010; RIGO et al., 2010). Em geral, a produção é influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, pelo pH do cultivo, pela temperatura de crescimento e pela concentração de oxigênio dissolvido.

3.4.1 Crescimento e fisiologia dos fungos filamentosos

Microorganismos se adaptam como resposta ao ambiente, com mecanismos físicos e químicos. O crescimento microbiano e a formação de produtos decorrem da interação entre metabolismo e influência do ambiente ao qual o microorganismo fica exposto. Com isso, quando se deseja obter o crescimento do microorganismo e a formação de algum produto, é necessário moldar o ambiente ao qual o microorganismo está exposto, para alcançar as condições ótimas de cultivo, trabalhando com condições físicas, tais como, atividade de água e temperatura, e com condições químicas, como o pH, a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio. Portanto, a formulação do meio de cultura é um dos fatores mais importantes para a otimização do processo fermentativo (COLEN, 2006).

Fungos filamentosos são microorganismos complexos que exibem diferentes formas estruturais em seus ciclos de vida. A estrutura básica de crescimento são as hifas originadas a partir da germinação de um esporo reprodutivo. O crescimento contínuo das hifas dá origem ao micélio. Diferentes morfologias podem ser exibidas por fungos na fermentação em substrato líquido, quando podem se apresentar sob a forma de filamentos miceliais dispersos até massa miceliais denominadas *pellets*. A forma exibida pelos fungos depende, não somente de sua carga genética, mas também, da influência da constituição do meio de cultura, dos aspectos físicos (temperatura, forças mecânicas) e da natureza do inóculo (PAPAGIANNI, 2004).

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, pela temperatura de crescimento e pela concentração de oxigênio dissolvido (ELIBOL & OZER, 2002).

Como organismos heterotróficos, os fungos filamentosos requerem compostos orgânicos como fontes de carbono e energia. Fontes de carbono lipídicas, como glicerídeos, ácidos graxos ou outros lipídeos demonstram ser geralmente bons indutores para a obtenção de lipase com alto rendimento (HIOL et al., 1999; NAMBOODIRI & CHATTOPADHYAYA, 2000; TAN et al., 2003; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; ELLAIAH et al., 2004). Alguns grupos de microorganismos parecem não exigir lipídeos ou ácidos graxos para a produção

de lipase, entretanto, a presença destes compostos aumenta a quantidade de enzima produzida (CIHANGIR E SARIKAYA, 2004). Outros grupos têm a produção de lipase inibida pela presença de fontes lipídicas (TAN et al., 2003). E ainda, outro grupo de microorganismo produz lipases constitutivamente (CHANDER & KLOSTERMEYER, 1983, citado por COLEN, 2006). Outros substratos não lipídicos, como os carboidratos, propiciam bom crescimento celular, mas não são bons para a síntese de lipase (CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; GONÇAVES, 2007).

Fontes de nitrogênio, incluindo nitrogênio orgânico (extrato de levedura, caseína, peptona) e inorgânico (sulfato de amônia, nitrato de amônia, uréia, cloreto de amônia), desempenham importante função na síntese de lipase. A maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio inorgânico em adição à utilização de grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados (TAN et al., 2003).

O pH do meio é um importante fator na produção de lipase, uma vez que a concentração do íon hidrogênio pode afetar o crescimento indiretamente, seja pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes, seja por sua ação nas superfícies celulares. O metabolismo durante o crescimento do fungo altera o pH e durante o cultivo o tamponamento é difícil, pois, em quantidades necessárias, os tampões podem ser assimilados ou tóxicos para os microorganismos (PAPAGIANNI, 2004; COLEN, 2006).

Em relação à temperatura, a maioria dos fungos é mesofílica, crescendo bem entre 25 e 40°C. O fator temperatura é capaz de alterar os parâmetros de crescimento influenciando tanto o metabolismo primário quanto o secundário (COLEN, 2006).

Os fungos filamentosos, em sua maioria, obtêm energia pelo metabolismo oxidativo (respiratório), utilizando oxigênio como aceptor final de elétrons. Na fermentação submersa, a agitação torna-se necessária pelo fato de o oxigênio apresentar baixa solubilidade em água, difundindo-se lentamente em meios não agitados (PAPAGIANNI, 2004).

3.4.2 Produção de lipases por fungos filamentosos

3.4.2.1 Isolamento e seleção

No caso de fungos produtores de lipases, esses podem ser isolados de resíduos industriais gordurosos, de fábricas de processamento de óleos vegetais e laticínios, de solos contaminados com óleo e sementes oleaginosas. O sucesso, ou não, da seleção de microorganismos produtores depende da seleção primária, em que as culturas são

submetidas às condições altamente seletivas e que se inicia, de modo geral, em meio de cultura sólido em placa de Petri. A seleção primária, segundo STEELE & STOWERS (1991, citado por COLEN, 2006) é um processo qualitativo, no qual uma grande população de organismos é selecionada para um tipo específico de atividade. Nessa etapa, torna-se possível identificar os microorganismos capazes de produzir lipase. No caso de lipase fúngica, o crescimento abundante, a baixa atividade lipolítica e a interferência de metabólitos advindos de células mortas, em placas contendo meio de cultura com ágar grau bacteriológico, são as principais dificuldades encontradas no processo de seleção primária.

A fermentação submersa é, em geral, o passo que se segue à seleção primária para avaliar a capacidade de produção da enzima pelo microorganismo selecionado. Nessa etapa, obtém-se diversos tipos de caldos fermentados pelo mesmo microorganismo selecionado anteriormente, e pode-se comparar a quantidade de metabólito de interesse produzido. Tem-se, portanto, a noção do rendimento de produção em diferentes situações e, com isso, pode-se selecionar as cepas mais promissoras (COLEN, 2006; COLEN et al., 2006).

3.4.2.2 Natureza do meio de fermentação

A evolução dos fungos superiores se deu com seu desenvolvimento em substratos sólidos, sendo terrestres durante a maior parte da história evolucionária, com apenas algumas espécies se adaptando ao meio aquoso (HOLKER et al., 2004; HASAN et al., 2006).

O cultivo do fungo em meio de cultura líquido (fermentação submersa ou fermentação em substrato líquido - FSL) torna-se menos compatível com as condições de seu habitat natural, além de o processo envolver elevados custos com aeração e poder formar espuma. Entretanto, é predominante a utilização da fermentação submersa para a produção de enzimas fúngicas em escala industrial, por ser de controle mais fácil para obtenção de rendimento satisfatório. Nos bioprocessos submersos, a célula produtora se desenvolve, sob agitação, no meio do cultivo. Encontram-se na literatura inúmeros estudos a respeito da produção de lipase extracelular por FSL (ELIBOL & OZER, 2002; TAN et al., 2003; BURKET et al., 2004; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; AZEREDO et al., 2007; RAJENDRAN & THANGAVELU, 2007).

De modo geral, em pesquisa de bancada, a FSL ocorre em frasco Erlenmeyer contendo o meio de cultura de composição pré-estabelecida onde é adicionada a suspensão de esporos ou suspensão de células vegetativas. Em geral, as reações ocorrem em biorreatores aerados e agitados, por tempo e temperatura determinados (BON et al., 2008^b).

Passado o tempo de incubação, o conteúdo do frasco é filtrado ou centrifugado para a separação da biomassa. O conteúdo obtido como filtrado contém a enzima produzida.

Espécies fúngicas têm sido adaptadas à fermentação submersa para a produção de enzimas em escala industrial (IWASHITA, 2002; HOLKER et al., 2004; HASAN et al., 2006; AZEREDO et al. 2007; TREICHEL et al., 2010).

Embora a fermentação submersa seja, até hoje, o processo mais empregado para a produção de enzimas, a fermentação em substrato sólido (FSS) tem ganhado bastante interesse, especialmente devido à possibilidade de uso de sub-produtos agro-industriais de baixo custo como fontes de matéria-prima (AZEREDO et al., 2007; RIGO et al., 2010). A produção de lipase através de FSS também tem sido investigada por diversos pesquisadores (HOLKER et al., 2004; VARGAS et al., 2008; CONTESINI et al., 2009; RIGO et al., 2010).

A FSS ocorre em ambiente de baixa concentração de água livre, mas aproxima-se das condições ambientais às quais os fungos estão adaptados (CONTESINI et al., 2009). É uma técnica alternativa para a produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de uso de subprodutos agroindustriais como suporte para o crescimento do microorganismo ou como fonte de nutriente. Os substratos tradicionalmente utilizados são arroz, trigo, painço, cevada, milho e soja, e como suporte têm sido empregados a casca de arroz e o bagaço de cana.

Geralmente, o meio de cultura é adicionado ao substrato sólido contido em frasco para fermentação, assim como o inóculo. Este tipo de fermentação pode ser realizado sem agitação, com agitação ocasional ou contínua (BON et al., 2008^b). Após o período de incubação, por tempo e temperatura determinados, segue-se a extração e filtração para separação do filtrado contendo a enzima e do suporte contendo a biomassa.

Há muitas desvantagens que desencorajam o uso desse tipo de fermentação em escala industrial. Os principais entraves devem-se aos gradientes de temperatura, pH, concentração do substrato e pressão de O₂, durante o cultivo, que são de difícil controle quando em condições de baixa disponibilidade de água.

Por outro lado, o processo de fermentação em substrato sólido possui vantagens biotecnológicas significativas frente à fermentação submersa: alta produtividade, baixa repressão catabólica, baixa demanda de energia, baixo custo, baixa demanda de água, necessidade de suporte sólido para cultivo do microorganismo (melhor “*performance*” ao crescimento), e menor preocupação com esterilidade devido à baixa atividade água do meio (HOLKER et al., 2004; VARGAS et al., 2008; CONTESINI et al., 2009). A vantagem única e exclusiva da FSS é a possibilidade do uso de culturas mistas de microorganismos, devido à capacidade de sinergismo entre várias espécies de fungos (HOLKER et al., 2004).

Contudo, tanto na fermentação em substrato sólido, quanto na fermentação submersa, outras enzimas hidrolíticas, como proteases, celulasas, hemicelulasas, podem ser também produzidas (PANDA & GOWRISHANKAR, 2005; VOLPATO et al., 2010).

O destino de algumas enzimas é afetado pela natureza do meio de cultivo. Na fermentação em substrato sólido, essas enzimas estão presentes no meio ou, em pequena quantidade, na parede celular, após o cultivo. Enquanto que, na fermentação submersa, uma quantidade maior da enzima pode estar na parede celular (IWASHITA, 2002).

Fungos filamentosos são os microorganismos que mais se adaptam à fermentação em estado sólido, devido à sua boa tolerância à baixa atividade de água e elevada pressão osmótica, e seu crescimento em forma de hifas (BON et al., 2008^b).

3.5 SEPARAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Dependendo da finalidade do uso, o grau de pureza de enzimas varia de preparações brutas até altamente purificadas. Operações de separação, concentração e purificação de enzimas ocorrem em seqüência, após o processo fermentativo, para separação dos produtos obtidos ("*Downstream Processes*" – Processos descendentes). Nos *downstream processes*, a escolha da técnica para a preservação da estrutura da enzima é de fundamental importância (KRSTIC et al., 2007; NANDINI & RASTOGI, 2009).

No caso de enzimas extracelulares, a primeira etapa para o isolamento é a separação das células do meio de cultura fermentado. Nessa etapa, a enzima está em baixa concentração em relação aos contaminantes. Alguns fatores devem ser considerados ao se realizar o processo de separação: o número de produtos, a concentração e o tipo de produto, a concentração dos contaminantes, a estabilidade, a localização e a finalidade do produto.

No caso de enzimas intracelulares, a primeira etapa para a separação é a ruptura das células para liberar a enzima de interesse. A ruptura pode ser feita por métodos mecânicos, tais como, a homogeneização em alta pressão, moagem úmida, e por métodos não-mecânicos, tais como, lise química, térmica ou enzimática.

Na homogeneização em alta pressão, as células são rompidas por forças de cisalhamento, fato que pode levar à inativação parcial da enzima devido ao aquecimento e à própria força de cisalhamento. Nesse caso, torna-se imprescindível o resfriamento. E pérolas de vidro são utilizadas para a ruptura, no processo de moagem úmida. O tamanho dos fragmentos resultantes da ruptura das células tem importância crítica nas etapas subsequentes dos processos de purificação.

Os métodos mais conhecidos para a separação da enzima dos fragmentos celulares são: centrifugação, floculação, flotação, extração e filtração. A centrifugação é o método mais utilizado pela sua simplicidade e por ser um método brando, porém tem um custo relativamente elevado e geralmente, não atinge a clarificação de interesse. Através da floculação, colóides minerais, sais ou polímeros orgânicos, que são adicionados, transformam células pequenas ou fragmentos delas em partículas maiores, que podem, então, ser removidas por filtração ou centrifugação. Se, no entanto, ocorrer a formação de agregados de células e ou de seus fragmentos, pode-se lançar mão da flotação, em que os aglomerados são adsorvidos em bolhas de gás, que são levadas ao topo e acumuladas em espuma (BON et al., 2008^b)

Após a separação, o volume que seguiria para a purificação é muito grande o que oneraria essa etapa. Portanto, esse volume deve ser concentrado antes de seguir para a etapa de purificação. A concentração pode ocorrer por ultrafiltração, evaporação a vácuo ou por precipitação, desde que não levem à inativação da enzima.

Além da capacidade de concentração, os métodos de precipitação e de ultrafiltração são também capazes de realizarem uma purificação de baixa-resolução na amostra (HABERT et al., 2005; KILIKIAN & PESSOA JR., 2005).

A precipitação ocorre com a adição de solventes orgânicos ou de sais, ou alteração de pH e temperatura, para que ocorra a precipitação da enzima. Entretanto, esse procedimento pode levar muito tempo até que as partículas precipitadas decantem, principalmente no caso do uso de solventes orgânicos, ocasionando a inativação da enzima. Proteínas precipitadas têm sua estrutura tridimensional modificada. Trata-se, portanto, de um método agressivo para essas moléculas, pois sua função bioquímica depende de sua estrutura. A aplicação desse método só é viável, portanto, quando a adequada conformação da proteína é recuperada após a precipitação (PESSOA JR. et al., 2005).

A ultrafiltração se baseia na seletividade entre as moléculas presentes e o tamanho dos poros da membrana. O fluxo através da membrana é convectivo devido ao gradiente de pressão, que é a força motriz (BON et al., 2008^b). Além de ser um método comercialmente viável, operacionalmente simples e de alta produtividade, permite uma purificação primária (purificação de baixa resolução), sob baixas condições de temperatura e pressão (LI et al., 2006; KRSTIC et al., 2007). Existem basicamente três polímeros principais utilizados na fabricação de membranas para ultrafiltração: acetato de celulose, poliamida e polissulfona.

Durante a ultrafiltração, pode ocorrer uma queda do fluxo permeado devido à ocorrência de dois fenômenos: a polarização da concentração e o *fouling*, os quais reduzem

o fluxo permeado, tornando-o muito aquém de sua capacidade teórica, e mudam a seletividade da membrana.

No primeiro, a concentração do soluto na interface membrana/solução aumenta, à medida que ocorre o processo de ultrafiltração, já que a membrana deve ser seletiva para o soluto. Inicia-se, a partir daí, uma retrodifusão do soluto para a solução, estabelecendo-se um perfil de concentração do soluto na interface da membrana/solução. Este fenômeno é reversível.

O segundo, *fouling*, que é irreversível, pode ocorrer por adsorção do soluto na membrana e entupimento dos poros. Um aumento na pressão transmembrana aumenta as chances de entupimento, ou melhor, de ocorrer o *fouling*, e, portanto, prejudica a concentração da enzima.

A queda do fluxo permeado pode onerar economicamente o processo, de modo que medidas devem ser tomadas para minimizá-lo. Por exemplo, para minimizar a polarização da concentração, quanto maior for a velocidade de escoamento tangencial para uma mesma pressão de operação, menor será a polarização. Estes dois fenômenos relacionam-se com as condições operacionais e as próprias características da membrana: o peso de corte, a pressão transmembrana, e a velocidade de alimentação (LI et al., 2006; KRSTIC et al., 2007).

O processo de ultrafiltração pode ser operado em escoamento tangencial (*cross flow filtration*) ou por escoamento convencional ou perpendicular (*dead end filtration*), ou seja, sem escoamento da alimentação. Na operação do tipo ultrafiltração convencional, uma solução ou suspensão é pressionada contra a membrana. O solvente passa pela membrana e o soluto ou materiais em suspensão são retidos, acumulando-se próximo à superfície da membrana gerando o fenômeno da polarização por concentração. Na filtração tangencial, a solução de alimentação escoar em paralelo à superfície da membrana, enquanto o permeado é transportado transversalmente a esta. A polarização de concentração continua presente, mas é possível minimizar seu efeito, em particular, alternando a velocidade de escoamento da corrente de alimentação (HEBERT et al., 2005).

Ocorre também a possibilidade de perda da atividade enzimática devido à força de cisalhamento gerada durante o processo de ultrafiltração. A força de cisalhamento é gerada pela rotação das moléculas de enzimas que, por sua vez, ocorre devido ao fluxo turbulento. As moléculas absorvem energia suficiente para quebrar as ligações químicas. A susceptibilidade das enzimas à força de cisalhamento e a conseqüente perda de atividade são uns dos principais fatores que devem ser considerados. Períodos longos de processamento utilizando a ultrafiltração podem causar perda significativa de atividade

enzimática, estando, pois, as enzimas mais susceptíveis às forças de cisalhamento. Portanto, a escolha da membrana torna-se muito importante nos processos de ultrafiltração (KRSTIC et al., 2007).

A ultrafiltração, além de concentrar, pode ser aproveitada para purificar enzimas quando associadas a outros métodos de purificação (LI et al., 2006).

Para a maioria das aplicações comerciais, a purificação parcial de enzimas é suficiente. Porém, enzimas com certo grau de pureza são exigidas para uso farmacêutico, químico, cosmético e industrial (GUPTA et al., 2004). Para tanto, torna-se necessário alguns procedimentos especiais que oneram a obtenção de tais enzimas.

Uma vez purificadas, as enzimas devem manter a sua especificidade catalisadora durante o armazenamento e comercialização, até sua utilização. Para isso, lança-se mão da utilização de substâncias aditivas além da enzima, tais como, soluções de força iônica de sais neutros (sulfato de amônio e fosfato de potássio); polióis (glicerol, manitol e sorbitol); antibióticos; agentes quelantes; inibidores de enzimas contaminantes; e ainda submetê-la ao processo de liofilização. Geralmente, para serem liofilizadas, são acrescentados estabilizadores (predominantemente a albumina sérica bovina – BSA – uma proteína inerte) à enzima, podendo ser armazenada por longos períodos. A adição de sais e de polióis e a liofilização, adicionalmente, inibem o crescimento microbiano por reduzirem a disponibilidade de água (BON et al., 2008^b).

A eficiência de cada etapa de purificação é dada pelo rendimento ou recuperação (a porcentagem retida da atividade total da enzima originalmente presente) e a purificação ou fator de purificação (o fator pelo qual a atividade específica da preparação aumentou). O objetivo é otimizar ambos os fatores. Às vezes, um bom rendimento é sacrificado em função de uma etapa excelente de purificação; outras vezes uma boa etapa de purificação não é utilizada porque o rendimento é muito baixo.

3.5.1 Purificação de lipases fúngicas extracelulares

Os trabalhos publicados relacionados à purificação de lipases, em geral, visam obtê-las na forma pura, para então, poder realizar os estudos de caracterizações físico-químicas, químicas e biológicas. Entretanto, os detalhes da metodologia otimizada empregada nos processos de purificação de lipases em nível industrial e comercial são reservados e conduzidos sob segredo (OLIVEIRA, 2000; SHARMA et al., 2001). As estratégias de

purificação de lipases com propósitos industriais devem ser rápidas, aplicáveis em operações de larga escala e ser relativamente de baixo custo (GUPTA et al., 2004).

Como em qualquer processo que visa à purificação de enzimas a partir do caldo de cultivo de microorganismos, a purificação de lipase tem início com a separação das células do caldo fermentado. A separação do micélio de fungos filamentosos, a partir do caldo, pode ser facilmente executada por filtração ou centrifugação.

Seguem-se à separação, os tratamentos para redução de volume e concentração de lipase, que são conhecidos como etapas de purificação de baixa resolução, através de precipitação com sulfato de amônio, precipitação com solvente orgânico e ultrafiltração (SAXENA et al., 2003; GUPTA et al., 2004; KILIKIAN & PESSOA JR., 2005; BON et al., 2008^b; COLAK et al., 2009).

Aproximadamente 80% dos esquemas de concentração utilizam os métodos de precipitação. Dentre esses métodos, os mais aplicados são a precipitação com sulfato de amônio (60%) e com etanol ou acetona (35%) (SAXENA et al., 2003^b).

Em geral, no meio de cultivo destinado à fermentação por fungos produtores de lipases, acrescentam-se substâncias lipídicas como fonte de carbono. Em alguns casos, mesmo após a fermentação, ocorre a presença de triglicérides no meio de cultivo, sendo interessante o uso de solventes orgânicos para a etapa de concentração, uma vez que permite extrair o material lipídico que possa estar presente juntamente com a enzima e separá-la como precipitado sólido. O solvente orgânico promove a precipitação da enzima (proteína) por diminuição da constante dielétrica do meio. Mas há risco relevante de ocorrer perda de atividade enzimática. IIZUMI et al. (1990) observaram perda de atividade lipásica superior a 95%, quando precipitaram lipase de *Pseudomonas* sp. com acetona a 0°C. Por outro lado, OLIVEIRA (2000) obteve uma recuperação de 97% da atividade lipásica, ao concentrar lipase de *Colletotrichum gloesporioides* por precipitação com acetona a frio.

Em geral, ocorre uma purificação limitada através da precipitação com solvente orgânico, estando a preparação enzimática apta para ser utilizada em indústrias de detergentes, por exemplo, mas não, em reações de síntese na indústria farmacêutica (GUPTA et al., 2004).

A precipitação com sulfato de amônio, geralmente, é menos danosa e resulta em valores de recuperação sempre bons, como observado por LIN et al. (1996), que alcançaram índice maior que 90% de recuperação da atividade da lipase de *Neurospora* sp., HIOL et al. (1999) obtiveram 80% de recuperação da atividade lipásica de *Mucor hiemalis* após duas etapas de precipitação com sulfato de amônio. SAXENA et al. (2003)^a recuperaram cerca de 90% de atividade de lipase de *Aspergillus carneus*, após concentração de 20 vezes do caldo

fermentado por precipitação com sulfato de amônio. MHETRAS et al. (2009) alcançaram um índice de recuperação da atividade lipásica de *Aspergillus niger* maior que 99% após concentração de 4,29 vezes com precipitação com sulfato de amônio.

Embora os métodos de precipitação sejam abundantemente usados nos processos de purificação de diversas enzimas, tais métodos requerem, em geral, grande volume de reagentes químicos. Além disso, os próprios reagentes químicos utilizados e outros materiais presentes na solução original podem não ser removidos completamente, resultando em baixa pureza e baixa atividade específica da solução de enzima obtida (PESSOA JR. et al., 2005; KRSTIC et al., 2007).

Para a concentração de lipase utilizando-se de ultrafiltração, torna-se necessário uma membrana, de modo geral, de acetato de celulose e com limite de corte de 10.000D, visto que membranas de polissulfona e poliacrilonitrila ocasionam perdas significativas de atividade de lipase. SZTAJER & BRYJAK (1989) testaram membranas de poliacrilonitrila e polissulfona com 10KDa de peso de corte para ultrafiltração, na etapa de concentração de lipase de *Pseudomonas fluorescens*. O fluxo do caldo enzimático caiu fortemente em ambas as membranas, principalmente na de poliacrilonitrila, em que o fluxo caiu em 15 vezes. Do total de proteínas, 15% e 30% ficaram adsorvidas nas membranas de poliacrilonitrila e polissulfona, respectivamente, resultando na perda de 30 e 40% de atividade lipásica. A queda do fluxo através da membrana de poliacrilonitrila pode ser atribuída, primeiramente, à adsorção, como resultado da interação entre os resíduos de aminoácidos presentes na enzima com os grupos hidrofílicos do material da membrana (SONG et al., 2007).

OLIVEIRA (2000), utilizando ultrafiltração perpendicular em membrana, que retém proteínas com peso molecular acima de 10kDa, recuperou 23,8% da atividade lipásica de *Colletotrichum gloesporioides*, após redução do volume de 3,3 vezes. A perda de atividade foi, portanto, de 76%. Foram recuperados 6,6% de proteínas, no volume concentrado, resultando em um fator de purificação de 3,6 vezes.

O caldo fermentado contendo lipase de *Mucor hiemalis* foi concentrado 20 vezes em equipamento de ultrafiltração AMICON, em membrana de 10kDa de peso de corte, por HIOL et al. (1999), resultando em atividade específica 3,5 vezes maior, em comparação ao caldo enzimático anterior à concentração.

Inúmeras estratégias de purificação de lipases têm sido descritas (HIOL et al., 1999; NAMBOODIRI & CHATTOPADHYAYA, 2000; SHARMA et al., 2001; SAXENA et al., 2003^a; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; BIAN et al., 2005; KUMAREVEL et al., 2005; MHETRAS et al., 2009), variando os protocolos de purificação de acordo com o tipo de lipase. Na maioria das vezes, apenas uma etapa cromatográfica no processo de purificação não é suficiente

para alcançar o nível de pureza desejado, tornando-se necessária a combinação de mais de uma etapa cromatográfica (SAXENA et al., 2003^b).

Como processo de purificação de lipases, os procedimentos cromatográficos são mais comumente usados, por serem mais eficientes. Como as lipases são reconhecidamente de natureza hidrofóbica suas purificações têm sido estudadas em torno da cromatografia de afinidade, como a cromatografia de interação hidrofóbica que tem crescido enormemente nos últimos anos (OLIVEIRA, 2000; GUPTA et al., 2004).

A cromatografia por interação hidrofóbica é ideal para purificação de enzimas que foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio. Baseia-se na interação das regiões hidrofóbicas das proteínas com os grupos hidrofóbicos da matriz. Para purificação de lipases, essa cromatografia utiliza suportes contendo o grupamento fenil ou octil. Dentre os métodos de adsorção, a cromatografia hidrofóbica acarreta menores perdas de atividade enzimática (OLIVEIRA, 2000).

3.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Colletotrichum gloesporioides*

Colletotrichum gloesporioides é um fungo filamentosso fitopatogéno, importante na agricultura por afetar muitas culturas de importância comercial. Dentre os problemas causados por este fitopatogéno está a Antracnose, que afeta culturas de malva, abacate, morango, soja e maracujá (SOUZA et al., 2005; SCHILLER et al., 2006). Esta espécie de fungo também é capaz de infectar grãos de café maduros, inicialmente, como um patogéno, e depois, como um saprófita (CHEN et al., 2007).

Há certo grau de confusão entre as espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. Mas há um consenso entre os micologistas de que as espécies *C. gloesporioides*, *C. acutatum*, *C. dematium*, *C. lindemuthianum* pertencem ao gênero. Tradicionalmente, as espécies de *Colletotrichum* são identificadas morfologicamente, mas, recentemente, técnicas moleculares têm sido aplicadas para a caracterização e análise taxonômica dos representantes deste gênero (SCHILLER et al., 2006).

Pesquisas relacionadas à produção de enzimas, tais como quitinase, cutinase e lipase, por *Colletotrichum gloesporioides* têm sido realizadas. As quitinases hidrolisam a quitina, polímero composto por N-acetilglicosaminas unidas por ligações β -1,4. Na natureza, esta enzima possui diversas funções como mecanismo de defesa, nutrição e morfogênese numa ampla diversidade de organismos como plantas, insetos crustáceos e microorganismos. A quitinase microbiana tem sido estudada pelo seu potencial de aplicação,

principalmente, no controle biológico de organismos patogênicos que contêm quitina como principal componente (SOUZA et al., 2005).

As cutinases catalisam a hidrólise de ligações ésteres do polímero de cutina. A cutina é o principal componente da cutícula, que serve como a primeira barreira defensiva das partes aéreas de plantas contra patógenos. As cutinases são também capazes de hidrolisar uma ampla variedade de triglicerídeos. Junto às lipases, as cutinases são esterases de grande potencial de aplicação, mas não sofrem o fenômeno de ativação interfacial e podem atuar em substratos lipídicos solúveis (CHEN et al., 2007).

SOUZA et al. (2005) avaliaram a produção de endoquitinases por *Colletotrichum gloesporioides* em FSL (180rpm, 28°C, por 5 dias), utilizando 6 diferentes fontes de carbono e 2 valores de pH. A maior produção ocorreu em pH 7,0 e 9,0, quando quitina coloidal e glicose foram utilizadas. Quando testadas diferentes concentrações de quitina coloidal, glicose e glicosamina, quitina coloidal (0,5%) foi o melhor substrato, atingindo valores de 2,4U após 5 dias de crescimento. Utilizando glicose, a melhor produção ocorreu a 0,3% de concentração, após 5 dias de crescimento, atingindo valores de 1,31U. Em altos níveis de glicose e em todas as concentrações de glicosamina testadas, ocorreu uma queda no nível de produção de endoquitinase.

CHEN et al. (2007), utilizando as espécies *Colletotrichum kahawae* e *C. gloesporioides*, realizaram a fermentação de meio de cultura, com cutina como fonte de carbono, para obterem cutinases, que foram purificadas e identificadas. Utilizando duas estratégias diferentes compostas de duas etapas de precipitação (sulfato de amônio e ácido acético) e duas etapas cromatográficas, os pesquisadores obtiveram duas proteínas com perfil de atividade de carboxilesterases, ambas produzidas pelas duas espécies. As enzimas apresentaram peso molecular de 21kDa e 40kDa, sendo que a de maior peso apresentou atividade significativa sob tributirina.

3.6.1 Produção de lipase por *Colletotrichum gloesporioides*

COLEN et al. (2006) isolaram 59 cepas de fungos filamentosos produtores de lipases a partir de amostras de solo do norte do estado de Minas Gerais, coletadas sob o pequizeiro e o abacateiro, ambos produtores de frutos oleaginosos. Dentre as 59 cepas, duas delas, denominadas cepas 41 e 42, foram identificadas como pertencendo à espécie *Colletotrichum gloesporioides*. A identificação foi baseada na morfologia dos conídios, que eram hialinos, cilíndricos e levemente claviformes. A seleção ocorreu no mesmo meio utilizado para o

isolamento e as placas com as culturas foram incubadas a 30°C por 72 horas. Foram selecionadas 25 cepas por apresentarem a razão entre o raio da colônia (r) e raio do halo claro formado ao redor delas (R) – R/r - maior ou igual a 1,2. As cepas selecionadas foram submetidas à FSL e à FSS e os respectivos filtrados foram testados por difusão em dois tipos de ágar gel: ATV (ágar, corante azul Victória, tributirina) e AEPV (ágar, emulsão de óleo de oliva, corante azul Victória), sendo que as cepas que apresentaram halo, de cor azul, maior ou igual a 2mm seguiram para a etapa de análise titulométrica. A cepa 41 do fungo *Colletotrichum gloesporioides* foi selecionada como a maior produtora de lipase, sendo submetida aos ensaios crescimento, e sua enzima, à hidrólise de diferentes substratos lipídicos.

Os autores concluíram que a atividade lipásica é dependente do tempo de fermentação e que a lipase de *Colletotrichum gloesporioides* é capaz de hidrolisar um amplo espectro de substratos lipídicos. Utilizando inóculo vegetativo, a maior atividade lipásica ocorreu em 48 horas de FSL, praticamente, sem perda da biomassa. Enquanto que, utilizando suspensão de esporos, como inóculo, ocorreu uma queda na biomassa entre 72 e 96 horas de FSL, mantendo, entretanto, a atividade lipásica. O menor índice de hidrólise ocorreu com banha e o maior, com a tributirina como substrato.

COLEN (2006) verificou que o óleo de oliva, a peptona e o pH foram as variáveis controláveis importantes para a produção de lipase extracelular ativa em pH alcalino, por cultivo submerso, para a cepa de *C. gloesporioides*. Aplicando-se a metodologia de superfície de resposta, este autor otimizou a produção de lipase, diminuindo a proporção de óleo de oliva (4mL/L) e peptona (10g/L), alcançando uma produção de 36U/mL de lipase. Verificou-se que o pH do meio de cultura e a interação entre os fatores não foram significativos, pouco influenciando a produção de lipase nas faixas estudadas.

3.7 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPÁSICA

3.7.1 Método titulométrico

Mesmo sendo solúveis em água, as lipases são enzimas que catalisam reações hidrolíticas de triglicerídeos insolúveis, pois agem na interface de sistemas bifásicos óleo/água. Dessa forma, a análise das reações catalisadas por lipases ocorre utilizando-se substrato lipídico sob a forma de emulsão. Mas à medida que a reação ocorre, a composição da interface varia devido à formação de produtos de hidrólise e ao consumo do

substrato, variando continuamente o tamanho das gotículas de óleo e a área da interface. Dessa forma, a atividade lipásica varia, não somente com a concentração do substrato, mas também, com o tamanho da área da interface óleo-água. Por isso, torna-se importante a estabilidade da emulsão para o ensaio controlado da atividade lipásica, para que os resultados obtidos sejam reproduzíveis (WATANABE et al., 1977; OLIVEIRA, 2000).

De modo geral, a atividade lipásica é determinada pela detecção dos ácidos graxos livres liberados, ao longo do tempo, a partir da reação entre a enzima e o substrato lipídico (SONG et al., 2007). A quantificação dos ácidos graxos livres pode ser realizada por métodos titulométricos, colorimétricos, turbidimétricos ou fluorimétricos, sendo os primeiros os mais comuns (OLIVEIRA, 2000).

Os métodos titulométricos baseiam-se na titulação alcalina dos íons de hidrogênio liberados na dissociação dos ácidos graxos resultantes da ação das lipases sobre as moléculas do triglicerídeo. Na mistura de reação, o triglicerídeo é adicionado sob a forma de emulsão. As emulsões de óleo de oliva, preparadas com solução de álcool polivinílico, conservam-se completamente homogêneas durante o ensaio e podem ser usadas na determinação da atividade lipásica (WATANABE et al., 1977). Solução de goma arábica também pode ser utilizada como agente estabilizante, que mantém emulsões uniformes, sem a necessidade de adição de agentes tensoativos (HOPPE & THEIMER, 1996). O processo de titulação não pode ser conduzido em pH abaixo de 9, já que a ionização completa dos ácidos graxos livres ocorre no pH 9,0 (HOPPE & THEIMER, 1996). Por esse motivo o indicador ácido-base fenolftaleína não é indicado, pois possui viragem em torno de pH 8,0. O indicador ideal deve ter ponto de viragem ligeiramente acima de pH 9,0, sendo mais apropriado a timolftaleína para indicar o ponto final da titulação.

3.7.2 Difusão em gel de ágar

A atividade lipásica pode ser detectada em placas com gel de ágar, contendo o substrato adequado na presença de solução tampão apropriado. Após a solidificação do gel, pequenos poços são perfurados, onde é adicionada uma alíquota da preparação enzimática. Após incubação por tempo e temperatura determinados, ocorrerá a formação de halo claro em torno dos poços, na ausência de corantes, e de halos coloridos quando em presença de corantes que reagem com os ácidos graxos liberados, indicando atividade lipásica na preparação (GONÇALVES, 2007).

Ensaio dessa natureza são mais sensíveis e permitem uma dosagem qualitativa direta, mesmo em condições de baixa quantidade de lipase (SANDOVAL & MARTY, 2007).

O diâmetro de zonas de hidrólise produzidas por enzimas difundidas no ágar é resultado mais da concentração enzimática do que da sua atividade. Por esse motivo, essa prática deve ser executada com cautela quando se deseja comparar atividades de preparações enzimáticas de diferentes microorganismos (COLEN, 2006).

3.8 ÓLEOS E GORDURAS

Por diversos motivos, óleos e gorduras têm papel fundamental na alimentação humana: fornecem calorias, podem ser utilizados como veículos para vitaminas lipossolúveis, são fontes de ácidos graxos essenciais, além de contribuem para a palatabilidade dos alimentos.

Estima-se uma produção de 100 milhões de toneladas de óleos e gorduras por ano. Por serem matérias-primas obtidas de fontes naturais, são largamente empregados pelas indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias. Do total de óleos e gorduras produzidos, 80% é utilizado para fins alimentícios, 6% é utilizado na alimentação animal e 14%, como material de provimento para indústrias oleoquímicas (GUNSTONE, 2002).

A diferença entre óleos (líquidos) e gorduras (sólidos), em temperatura ambiente, é devido à proporção de grupos acila saturados e insaturados presentes nos ácidos graxos que compõem os triglicerídeos (RODRIGUES, 2007).

Os triglicerídeos são os principais componentes de óleos e gorduras, cujas propriedades físicas dependem da composição dos ácidos graxos que os compõem. Os triglicerídeos são triésteres provenientes de esterificações de ácidos graxos com glicerol. Os ácidos graxos correspondem a 95% do peso da massa molecular de seus triacilgliceróis e podem ser saturados ou insaturados. Nos saturados, os átomos de carbono estão ligados entre si por ligações simples e nos insaturados, por ligações duplas (mono-, di-, tri-, ou poliinsaturados) (CASTRO et al., 2004; RODRIGUES, 2007). As gorduras animais, como a banha, o sebo e a manteiga, e gorduras vegetais, como coco, babaçu, macaúba e cacau, são constituídos por misturas de triacilgliceróis que contêm quantidades de grupos acila saturados maiores do que os de insaturados.

A diferença básica entre ácidos graxos é o tamanho da cadeia carbônica, a posição e o número das duplas ligações. As ligações duplas dos ácidos insaturados estão localizadas na cadeia de forma não conjugada (sistema 1,4 diênico), frequentemente, separadas por

grupos metilênicos (-CH₂-). As duas unidades da molécula encontram-se, frequentemente, em um dos lados da ligação dupla, assumindo a configuração *cis*. Esta configuração pode ser convertida na configuração *trans*, por processos de rancificação oxidativa e hidrogenação (RODRIGUES, 2007).

Diversos processos têm sido desenvolvidos com vista à modificação da composição dos ácidos graxos dos triglicerídeos para obter produtos lipídicos com diferentes características. Através de reações de hidrogenação, hidrólise e interesterificação, a composição básica dos óleos e gorduras pode ser alterada (CASTRO et al., 2004).

A hidrogenação promove uma modificação química dos ácidos graxos. O grau de insaturação influencia o ponto de fusão sendo que, quanto mais insaturado o ácido, mais baixo é o ponto de fusão dos ésteres. As insaturações podem ser hidrogenadas pela adição de hidrogênio ativado cataliticamente às duplas ligações. O ponto de fusão das gorduras eleva-se por esse processo. Durante o processo de hidrogenação dos óleos são formadas gorduras saturadas nocivas à saúde conhecidas como 'gorduras *trans*' (FENNEMA, 2000).

A hidrólise é a quebra de ligações éster. Os produtos resultantes são ácidos graxos escuros e uma solução aquosa rica em glicerol. Com a destilação, uma variedade de produtos pode ser obtida, seja por aplicação direta, seja por processamento dos subprodutos.

E a interesterificação promove a reorganização dos ácidos graxos na cadeia triglicerídica, modificando as características e propriedades físicas dos óleos e gorduras. Catalisadores químicos são usados neste processo e os produtos formados são compostos de ácidos graxos distribuídos aleatoriamente (CASTRO et al., 2004).

Óleos e gorduras são produtos muito utilizados em processos de biotransformação, sendo comum a aplicação de enzimas como catalisadores. Dentre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, esterificação e interesterificação desses lipídeos utilizando lipases (CASTRO et al., 2004).

Inúmeros trabalhos têm tratado da possibilidade de aplicação da lipase na indústria de óleos e gorduras (OLIVEIRA et al., 1999; ABIGOR et al., 2003; VIRTO et al., 2003; FREITAS et al., 2007).

3.8.1 Hidrólise de óleos e gorduras

A hidrólise de óleos e gorduras é muito utilizada, principalmente para produção de ácidos graxos e glicerol, ambos os quais encontram aplicações especialmente na fabricação

de sabões e detergentes, cosméticos medicamentos e alimentos. A hidrólise de triglicerídeos, como fonte de ácidos graxos livres e glicerol, representa um importante grupo de reações químicas relevantes ao processamento industrial de óleos e gorduras (GANDHI, 1997; HUANG et al., 2010).

Triglicerídeos, em presença de água e catalisador, sofrem hidrólises reversíveis, liberando glicerol e ácidos graxos. Os catalisadores podem ser ácidos, bases ou enzimas e a esterificação é a reação inversa à hidrólise (BUENO, 2005).

Os catalisadores ácidos geralmente beneficiam as reações de hidrólise, enquanto os catalisadores alcalinos formam sabões que se dissolvem rapidamente na fase glicérido, incrementando a velocidade de reação, especialmente em altas temperaturas (BUENO, 2005). A hidrólise enzimática por lipases é denominada de lipólise (FENNEMA, 2000), enquanto que a hidrólise por catalisador químico é denominada hidrólise química, cisão ou desdobramento.

A hidrólise química envolve pressão entre 3000-5000kN/m² e temperaturas de 250 °C ou mais. Em torno de 96 a 98% da hidrólise ocorre em 2 horas de reação, produzindo cerca de 12% de glicerol. Os ácidos graxos resultantes geralmente precisam ser redistilados para a remoção da cor e de subprodutos. Este processo consome muita energia e provoca uma variedade de reações indesejáveis, tais como polimerização de ácidos graxos insaturados e a produção de cetona e hidrocarbonetos. O investimento em equipamentos é alto devido à necessidade de colunas especiais capazes de suportarem alta temperatura e pressão (GANDHI, 1997).

A hidrólise química de óleos e gorduras é de caráter homogêneo e se desenvolve mediante a dissolução de água nos glicerídeos presentes. A água é mais solúvel nos ácidos graxos que nos glicerídeos e a solubilidade aumenta com o incremento da temperatura (BUENO, 2005).

Por outro lado, a hidrólise enzimática de óleos e gorduras pode ocorrer em condições amenas de temperatura e pressão ambientes (40-60 °C), necessitando, portanto, de baixa energia, em comparação aos processos químicos. Os ácidos graxos obtidos apresentam cor clara e podem ser separados da fase aquosa como uma solução ácida, além de serem mais puros devido ao baixo número de reações indesejáveis. Tal fato culmina com menos custos nos *downstream processes* (GANDHI, 1997; BUENO, 2005).

Na hidrólise enzimática, uma solução aquosa de lipase entra em contato com o óleo, formando uma dispersão líquido-líquido. A produção de ácidos graxos, por cisão enzimática compreende três etapas: preparo da enzima, formação da emulsão e separação do ácido

graxo da água. A produção de ácidos graxos inicialmente é muito rápida devido à alta velocidade de formação ($d(\text{RCOOH}) / dt$) e diminui com a mudança cinética da reação.

A hidrólise de óleos e gorduras é uma reação de equilíbrio e caracteriza-se por um aumento gradual na velocidade de reação, devido ao aumento da solubilidade da água nos glicerídeos (mono e di). Os principais fatores que afetam esta reação são temperatura, tipo de catalisador, teor de água no meio reacional e a concentração de glicerol liberado na fase aquosa. Nas reações de hidrólise química ou enzimática, os triglicerídeos são convertidos para diglicerídeos e monoglicerídeos e estes em glicerol e ácidos graxos. Todas essas reações são reversíveis (BUENO, 2005).

Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise utilizando lipases como catalisadores.

Dentre as técnicas estudadas podem-se destacar:

- (i) Relação fase aquosa/fase oleosa;
- (ii) Eventual ação inibitória dos produtos formados;
- (iii) Efeito dos íons cálcio e sódio na velocidade da reação;
- (iv) Efeito da agitação na velocidade de reação;
- (v) Efeito do pH e da temperatura;
- (vi) A concentração inicial de reagentes;
- (vii) A remoção do glicerol formado.

A influência da concentração inicial de reagentes na velocidade da reação de hidrólise foi avaliada por ROONEY & WETHERLEY (2001). Estes autores relataram que o grau de conversão utilizando emulsões de óleo/água nas proporções de 3:1 e 8:1 foram de 90 e 72%, respectivamente. Com isso, quanto menor a razão óleo/água, maior será a extensão da hidrólise.

PADILHA & AUGUSTO-RUIZ (2007) avaliaram a hidrólise do óleo de pescado industrial, por lipase pancreática porcina, para obtenção de ácidos graxos poliinsaturados. Utilizaram emulsão a 25% p/p de água destilada em óleo de pescado, acrescida de acetato de polivinila e detergente aniônico. A temperatura e o pH foram controlados durante a reação a 38 °C e pH 8,0. Decorrido o tempo de reação, a enzima foi inativada pela adição de clorofórmio e ácido acético glacial. Os produtos de hidrólise foram separados por cromatografia em coluna e caracterizados por cromatografia gasosa. A concentração de ácidos graxos aumentou em função do tempo de hidrólise, mas a produção de ácidos graxos

tendeu a se estabilizar a partir de 10 minutos de reação. Houve uma relação linear entre a produção de ácidos graxos (concentração em μmols) e o rendimento da reação (% de hidrólise). A hidrólise enzimática do óleo de pescado, após 60 minutos de reação, atingiu 44,5% de hidrólise e a atividade específica da enzima empregada foi de 10,14UE/mg de proteína. Foi verificada a preferência da lipase pelo ácido oléico e pelas posições 1 e 3, podendo atuar, também, na posição 2. Foram identificados ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis. Na fração dos triacilgliceróis, foi identificado um aumento de 46,14% e 40,23% de ácido araquidônico e eicosapentaenóico (EPA) (C20:5), respectivamente. Na fração monoacilglicerol, verificou-se um acréscimo de 96,96% e 52,55% de ácido docosapentaenóico (DPA) (C22:5) e de docosahexanóico (DHA) (C22:6).

A habilidade de três diferentes fontes de lipases, quanto à hidrólise do óleo de soja para obtenção de concentrados de ácidos graxos essenciais foi testada por FREITAS et al. (2007). As reações hidrolíticas ocorreram a 40°C, com agitação magnética, à pressão atmosférica, por 24 horas e com emulsão de óleo de soja em goma arábica. O pH do meio de reação foi ajustado de acordo com valor ótimo de atuação de cada preparação enzimática: lipase de *Candida rugosa* (pH 7,0), Lipolase® (pH 8,0), lipase pancreática suína (pH 7,5). A reação foi iniciada pela adição da lipase. Em intervalos de tempo definidos, uma alíquota era retirada do meio de reação e, para a desnaturação da enzima, adicionava-se acetona-etanol. A alíquota era titulada com KOH e o teor de hidrólise calculado. Todas as lipases testadas exibiram alta atividade hidrolítica sobre o óleo de soja. As reações de hidrólise foram mais rápidas nas primeiras 6 horas. Após 24 horas de reação, as lipases pancreática suína e Lipolase® apresentaram os maiores graus de hidrólise nos valores de 70% e 53%, respectivamente. Além disso, a lipase pancreática suína atingiu a mais alta taxa de hidrólise, alcançando o máximo de percentual de hidrólise em menos de 6 horas de reação. Em relação à formação de ácidos graxos, a lipase de *C. rugosa* foi mais efetiva. A Lipolase® alcançou a maior quantidade relativa de ácidos graxos essenciais, enriquecendo o meio em 54% com ambos os ácidos linoléico e linolênico.

Com o objetivo de prepararem uma mistura de mono e dioleína para uso como emulsificantes alimentícios, PLOU et al. (1996) utilizaram lipases de *Candida cylindracea*, pancreática suína, Lipozime® e *Rhizopus* sp, livres e imobilizadas, nas reações de hidrólise de trioleína. As reações hidrolíticas ocorreram com emulsão de trioleína em goma arábica, a 40°C, com agitação e pelo tempo destinado a cada preparação enzimática. Em seguida, adicionou-se à mistura, clorofórmio para a extração de tri-, di-, e monoglicerídeos, bem como de ácido oléico. Os produtos extraídos foram submetidos a etapas cromatográficas. Na obtenção de mistura de mono- e di-oleilglicerol, a lipase pancreática suína alcançou o melhor

resultado, especialmente na forma imobilizada. A lipase de *Rhizopus* sp demonstrou a maior capacidade de concentração de monooleína e dioleína (66% em 5 horas). Já a lipase de *C. rugosa* catalisou, predominantemente, a hidrólise completa de trioleína a glicerol e ácidos graxos.

PRIMOZIC et al. (2003) avaliaram a hidrólise do óleo de girassol na presença de Lipolase 100T® (lipase de *Aspergillus niger*), utilizando CO₂ supercrítico como solvente. Os ácidos oléico e linoléico foram focados no estudo como os ácidos graxos liberados com a hidrólise, já que são predominantes no óleo de girassol. Procedendo a reação em reator sob agitação e sob alta pressão, os autores avaliaram a influência de fatores, tais como, temperatura, pressão, razão enzima/substrato, pH e razão óleo/tampão, sobre a velocidade de reação e o grau de conversão do processo de hidrólise. A concentração ótima de lipase foi de 0,0714g/mL e o maior grau de conversão de ácido oléico (0,193g/g) e ácido linoléico (0,586g/g) foi obtida a 50 °C, 200bar de pressão, pH 7,0, e na razão entre óleo/tampão de 1:1 (p/p).

Outros autores realizaram processos de hidrólise enzimática de lipídeos (TORALLES, 1998; STAUFFER, 2000; NOOR, 2003; FORESTI & FERREIRA, 2010).

3.9 MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]

3.9.1 Características botânicas

A macaúba (**Figura 1**) pertence à família *Arecaceae*, anteriormente denominada *Palmae*, de vasta distribuição geográfica nas Américas. Sua área de ocorrência estende-se pelos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo amplamente espalhada pela área de Cerrado. É considerada a palmeira de maior dispersão no Brasil (BORA et al., 2004; LORENZI, 2006; AMARAL, 2007). O estado de Minas Gerais possui três grandes regiões de ocorrência de macaúba: Norte, Alto Paranaíba e Zona Metalúrgica (MOTTA et al., 2002).

Na literatura, há muitas divergências a respeito das espécies do gênero *Acrocomia*, sendo que uma mesma espécie tem sido, diferentemente, nomeada em relação aos aspectos taxonômicos. Porém, segundo LORENZI (2006), AMARAL (2007) e RODRIGUES (2007), o gênero *Acrocomia* contém duas espécies: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. e *Acrocomia hassleri* (B. Rodr.) W. J. Hahn., as quais diferem quanto ao tamanho e porte dos indivíduos, sendo a primeira a de maior porte.

Acrocomia aculeata foi primeiramente descrita por Jacquin, em 1763, como *Cocos aculeatus* Jacq.. Em 1824, Martius inseriu-a no gênero *Acrocomia*, sendo designada como *Acrocomia sclerocarpa*. Posteriormente, em 1845, Loddiges coloca ambos em sinonímia, designando-a como *Acrocomia aculeata*. Taxonomicamente se escreve *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.



Figura 1 – Macaúba – *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart..

Fonte: LORENZI, (2006)

Considerando a dispersão e as semelhanças existentes entre as palmeiras do gênero *Acrocomia*, diferentes nomes populares são atribuídos a essas espécies, de acordo com a região (BORA & ROCHA, 2004). São conhecidas popularmente por macaíba, macaúba, macaiá, macajá, macujá, marcová, mucajá, bocaiúva, bacaiuveira, bacaiúva, coco-balão, coco-baboso, coco-de-espinha (ALMEIDA et al. 1998; AMARAL, 2007). O termo *Acrocomia* deriva do grego “*Akron*” (uma) e “*Kome*” (cabeleira) sugerindo que as folhas estão dispostas no formato de uma coroa.

As palmeiras são consideradas as aristocratas do reino vegetal dado ao porte altaneiro e elegante que as distingue facilmente de outras plantas. A macaúba é uma palmeira nativa das florestas tropicais com estipe atingindo de 10 a 15m de altura e 20 a

30cm de diâmetro. A região dos nós é coberta de espinhos escuros. As folhas verdes, de comprimento variando de 4 a 5m, são ordenadas em diferentes planos, dando um aspecto plumoso à copa e apresentam, aproximadamente, 130 folíolos de cada lado e espinhos na região central (LORENZI, 2006).

As inflorescências são amareladas e pendentes, com 50 a 80cm de comprimento, e os cachos de frutos de tom marrom-amarelado. As flores, de coloração amarelo-claro, são unissexuais e ambos os sexos aparecem numa mesma inflorescência, sendo que as flores femininas nascem na base da inflorescência e as masculinas no topo (LORENZI, 2006).

Os frutos (**Figuras 2**) são esféricos com diâmetro variando de 2,5 a 5,0cm. O epicarpo (**Figura 3a**) rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo é comestível, fibroso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos, de coloração amarelo ou esbranquiçado. O endocarpo (**Figura 3b**) é fortemente aderido à polpa (mesocarpo), com as amêndoas oleaginosas comestíveis. Os frutos apresentam, normalmente, uma semente envolvida por endocarpo duro e escuro. A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos amadurecem, principalmente, entre os meses de setembro e janeiro (LORENZI, 2006). Os frutos são formados por cerca de 20% de casca, 40% de polpa, 33% de endocarpo e 7% de amêndoa.



Figura 2 – Frutos da macaúba.

Fonte: LORENZI, (2006)

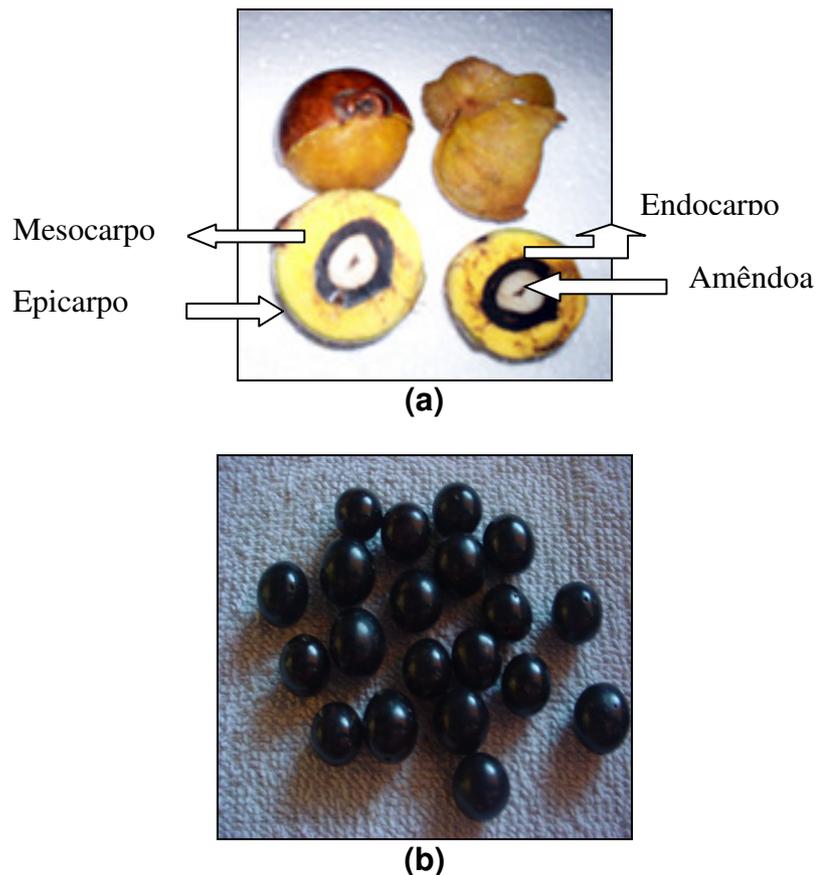


Figura 3 – (a) Frutos da macaúba em corte transversal. (b) Semente do fruto da macaúba: endocarpo envolvendo a amêndoa.

Fonte: LORENZI, (2006)

3.9.2 Potencial econômico

A família das palmeiras é muito importante para a região tropical devido à grande diversidade de produtos que dela podem ser obtidos, especialmente, aqueles relacionados aos seus frutos e sementes. As palmeiras são uma importantíssima fonte de recursos, os quais são utilizados como alimentos, combustível, medicamentos caseiros, na cobertura das casas ou confecção de utensílios e adornos domésticos e, em alguns casos, como matéria-prima para as indústrias locais (LORENZI, 2006).

Em sua pesquisa, LORENZI (2006) realizou um levantamento junto a comunidades do estado de Mato Grosso, a respeito das formas de utilização da palmeira de espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart, a partir de obtenção extrativista. Segundo a autora, a macaúba pode ser utilizada como forrageiras para animais e matéria-prima na

produção de linhas, cordas e redes (folhas); confecção de cestos, balaios e chapéus (pecíolo); alfinetes para rendeiras (espinhos); palmito e uma fécula nutritiva que produz um tipo de vinho (caule). Entretanto, o produto economicamente mais expressivo desta palmeira é o fruto. Entre os usos alimentícios do fruto da macaúba (mesocarpo) estavam a produção de licor, sorvete, doces, geléias, cocadas e óleo de cozinha. A amêndoa da macaúba era utilizada para a fabricação de paçoca e óleo. Além da aplicação alimentícia, o óleo da amêndoa da macaúba era utilizado na produção de sabão e como hidratante capilar.

Há perspectivas reais de utilização da macaúba como matéria-prima para produção de biodiesel no Brasil. Sua alta produtividade, a facilidade de extração e o baixo custo da produção de óleos, colocam a macaúba como uma das plantas oleaginosas mais promissoras para a inclusão da cadeia produtiva do biodiesel.

E também, um dos principais aspectos para a utilização da macaúba na produção de biocombustíveis, deve-se ao fato de seu fruto gerar co-produtos muito valorizados. As tortas produzidas a partir do processamento da polpa e da amêndoa são aproveitáveis em rações animais com ótimas características nutricionais e boa palatabilidade. Tem-se, ainda, como importante subproduto o carvão produzido a partir do endocarpo, que apresenta elevado poder calorífico (consulta internet, <<http://www.paginarural.com.br/noticias>>, A.G. Silva, UFV, 2008; BHERING, 2010; BIODIESEL..., 2010).

Projetos de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) estão sendo coordenados pela Embrapa Agroenergia, no sentido de viabilizar a utilização comercial da macaúba e torná-la uma espécie realmente atrativa para a produção de biodiesel. Em um deles, com financiamento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e em parceria com a Embrapa Cerrados estão sendo realizados levantamentos da ocorrência de aglomerados nativos de macaúba em Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal.

Práticas de extrativismo sustentável têm sido estudadas para evitar o rápido esgotamento da fonte energética. Para isso, é realizado o inventário detalhado na área de abrangência dos aglomerados, o planejamento da conservação e uso dos recursos genéticos disponíveis, a definição de tipos de atividades permitidas e a elaboração de normas de uso da área.

Além disso, estudos para desenvolver sistemas de produção, onde a macaúba possa ser cultivada em plantios racionais, estão sendo desenvolvidos. Para isso, são realizadas pesquisas com melhoramento genético, plantio, adubação, espaçamento entre plantas, obtendo as informações necessárias para o estabelecimento de sistemas de produção sustentáveis (BHERING, 2010; BIODIESEL..., 2010).

3.9.3 Potencial alimentício

Enquanto potencial alimentício, RAMOS et al. (2007) demonstraram que a biodisponibilidade de β -caroteno, um precursor da vitamina A, proveniente da polpa da macaúba, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart, é maior que a biodisponibilidade de β -caroteno puro.

HIANE et al. (2006)^b realizaram a avaliação nutricional da proteína da amêndoa de macaúba, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart, mediante determinação do balanço nitrogenado, digestibilidade verdadeira, valor biológico, razão de eficiência protéica e composição em aminoácidos e concluíram que é possível utilizar as amêndoas para suplementar dietas, especialmente quando adotadas formas de preparo que melhorem sua digestibilidade.

A caracterização de proteínas e análises da composição centesimal e teores de minerais foram realizados nas amêndoas da macaúba, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart, por HIANE et al. (2006)^a. As amêndoas apresentaram alto teor de lipídeo (51,7%), proteína (17,6%) e fibra (15,8%). Treonina e lisina foram os aminoácidos mais limitantes, relativamente, ao padrão teórico para crianças de 2 a 5 anos de idade, recomendado pela FAO/WHO. Amêndoas de macaúba mostraram ser ricas em cálcio, fósforo e manganês, em comparação com algumas amêndoas de frutos como caju e coco.

Ressaltando-se que, em 2001, o Brasil priorizou a redução da desnutrição por micronutrientes, com ênfase nas carências de vitamina "A" e ferro, através das Diretrizes da Política Nacional de Alimentação e Nutrição, (MS, 2001), os produtos derivados da macaúba, como a polpa e a farinha, podem, potencialmente, ser usados na produção de vitaminas, de sorvetes, bolos e pães, agregando maior valor nutritivo.

3.9.4 Óleo da amêndoa da macaúba

A palmeira da macaúba encontra melhores condições de rendimento em terras de cerrado, praticamente não sofre ataque de doenças e produz muito óleo, que representa cerca de 30% de cada fruta. Seu potencial oleaginoso se compara ou supera o potencial das plantas mais produtivas. Segundo o SBRT (2008), estima-se que a macaúba tenha uma produtividade de 5t de óleo do tipo oléico-palmítico e 1,4t de óleo do tipo láurico em plantios

com uma densidade de 200 plantas/ha, o que se compara favoravelmente com a produtividade do óleo de dendê.

Os teores de óleo são ligeiramente maiores na polpa (60%), em relação à amêndoa (55%). Assim como do dendê, são extraídos dois tipos de óleo do fruto da macaúba. Da amêndoa, é retirado um óleo fino e transparente que representa em torno de 15% do total de óleo da planta, rico em ácido láurico e oléico, tendo potencial para utilizações na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (**Figura 4a**).

O óleo extraído da polpa é de cor vermelho amarelado e rico em ácido oléico e palmítico e tem boas características para o processamento industrial, mas apresenta sérios problemas de perda de qualidade com o armazenamento (**Figura 4b**). Assim como ocorre com o dendê, os frutos devem ser processados logo após a colheita, pois se degradam rapidamente, aumentando a acidez (BORA & ROCHA, 2004; HIANE et al., 2005).



Figura 4 – (a) Óleo da amêndoa da macaúba. (b) Óleo da polpa da macaúba.

Fonte: Disponível em <<http://www.cocalbrasil.com.br>>

Diversos autores estudaram o perfil de ácidos graxos presentes no óleo da amêndoa do fruto da macaúba (**Tabela 1**). LAGO et al. (1991) verificaram a composição lipídica do óleo de amêndoa de macaúba da espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., com o uso das técnicas de cromatografia a gás e cromatografia líquida de alta eficiência. O principal ácido graxo encontrado no óleo foi o láurico (38,2%), seguido pelo ácido oléico (22,8%) e ácido caprílico (11,9%).

HIANE et al (2005) estudaram a amêndoa do fruto da macaúba, também, da espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., quanto ao conteúdo de óleo, as características físico-químicas e a composição em ácidos graxos. A amêndoa da macaúba apresentou 52,9% de teor de óleo, sendo 42,5% de ácidos graxos monoinsaturados, 49,7% de ácidos graxos

saturados. Quanto à composição em ácidos graxos, o óleo da amêndoa apresentou, principalmente, ácido oléico (40,2%), ácido láurico (13%) e ácido palmítico (12,6%). Os ácidos láurico e oléico foram os principais ácidos graxos saturados e monoinsaturados obtidos, respectivamente. Além disso, foi encontrado alto teor de ácido linolênico (1,9%), quando comparado aos óleos de oliva e girassol.

Tabela 1 – Resumo de estudos realizados acerca do perfil de ácidos graxos do óleo da amêndoa da macaúba

Autores	Principais Ácidos Graxos	Teor (%)
LAGO et al. (1991)	láurico	38,2
	oléico	22,8
	caprílico	11,9
HAINE et al. (2005)	oléico	40,2
	láurico	13
	palmítico	12,6
AMAYA-FARFÁN et al. (1986)	láurico	48
	oléico	13
AMARAL (2007)	láurico	44
	oléico	25,8
	mirístico	8,4

Enquanto que, AMAYA-FARFÁN et al. (1986), investigando a composição em ácidos graxos do óleo da amêndoa da macaúba da atual espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., encontraram, em predominância, os ácidos láurico (48%) e oléico (13%), aproximando-se do perfil do óleo de babaçu. Foram encontrados 86,6% de ácidos graxos saturados no óleo da amêndoa dessa espécie.

BORA & ROCHA (2004) analisaram a composição em ácidos graxos dos óleos da polpa e da amêndoa do fruto do gênero *Acrocomia*, encontrando um total de 24 e 18 ácidos graxos nos óleos da polpa e na amêndoa respectivamente. Os principais ácidos graxos saturados nos óleos da polpa e da amêndoa foram o palmítico e láurico com 13,3 e 45,5% do total de ácidos graxos. Ácido oléico foi o ácido graxo monoinsaturado predominante em ambos os óleos com uma concentração de 63,2 e 19,7%, respectivamente.

AMARAL (2007) estudando o perfil de ácidos graxos do óleo da amêndoa da macaúba, também, da espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart, por cromatografia

gasosa, obteve como principal ácido graxo, o ácido láurico (44%), seguido por ácido oléico (25,8%) e mirístico (8,4%).

As características físico-químicas do óleo da amêndoa da macaúba também tem sido alvo de alguns estudos e estão resumidas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Resumo de estudos realizados acerca das características físico-químicas do óleo da amêndoa da macaúba

Variáveis	AMARAL (2007)	HIANE et al. (2005)	BORA & ROCHA (2004)
Teor de umidade (%)	0,275	-	-
Índice de acidez (mg KOH g ⁻¹)	12,8	-	2,1
Índice de acidez (ác. oléico %p/p)	-	0,21	-
Índice de peróxido (meq K g ⁻¹)	15,57	0,00	1,37
Índice de saponificação (mg KOH ⁻¹)	308	258	-
Índice de refração	1,4560	1,4539	1,4110
Índice de iodo (g I ₂ 100 g ⁻¹)	28,68	54,05	18,00

3.10 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Para desenvolver ou melhorar um processo, é necessário planejar um procedimento experimental para avaliar os efeitos que suas variáveis independentes ou fatores têm sobre a resposta. Parece inevitável a opção de se avaliar um fator por vez (*one-at-a-time*), mantendo as outras variáveis fixadas para controlar o processo, avaliando separadamente cada fator.

Os métodos clássicos, que avaliam um parâmetro ou variável por vez, mantendo os demais constantes, falham ao não considerarem as interações entre as variáveis envolvidas no processo, significando perda de tempo e dinheiro (ELIBOL & OZER, 2002; VARGAS et al., 2008). Mas nos últimos anos, tem sido cada vez maior a procura por métodos científicos que diminuam os números de ensaios e aumentem a precisão dos resultados. A resolução do problema através de um planejamento estatístico ou Planejamento Experimental Fatorial pode ser feita usando um número menor de medidas, identificando a relação entre as variáveis e a resposta, ou seja, explorando todo o espaço experimental (CONTESINI et al., 2009).

A otimização de processos de aplicação de enzimas, com aplicação de metodologia de planejamento experimental fatorial, em conjunto com análise de superfícies de resposta, têm sido realizados com maior eficiência. Essas metodologias, além de demandarem um menor número de experimentos ao avaliarem as respostas às alterações simultâneas de vários fatores, permitem que as mesmas sejam avaliadas na forma de uma superfície sobre aquele espaço experimental formado pelas variáveis estudadas. Planejamento experimental fatorial e metodologia de superfície de resposta são ferramentas importantes na determinação das condições ótimas de um processo e têm sido usados com sucesso para otimizar e avaliar os efeitos dos parâmetros na produção de enzimas e em suas aplicações (BURKET et al., 2004; VARGAS et al., 2008).

Segundo ELIBOL & OZER (2002), a metodologia de superfície resposta é uma técnica matemática e estatística usada para determinar os efeitos de diversas variáveis e que pode ser aplicada para otimizar diferentes processos biotecnológicos. Alterando tais variáveis ao mesmo tempo, a dependência entre elas pode ser mostrada graficamente num diagrama de contorno das respostas. As respostas, no caso, são representadas por linhas de contorno, e o “cume” dessas linhas representa a região desenhada pelas variáveis em estudo, na qual a resposta conseguida é máxima (COLEN, 2006). A superfície de resposta, bem como a projeção de seus cortes sobre o plano dos fatores gerando as curvas de contorno, pode simplificar a interpretação dos resultados.

A aplicação da metodologia se inicia a partir das condições experimentais que usualmente têm sido usadas, levando em consideração o nível da resposta às condições empregadas para as variáveis inferentes. Para saber se é possível melhorar o rendimento, empregando-se outros valores para as variáveis em questão, é necessário investigar a superfície de resposta (COLEN, 2006). A faixa ótima das variáveis em questão, fornecida pela superfície de resposta, é muito mais interessante do que apenas um valor pontual, pois ela fornece informações sobre a robustez do processo (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

3.10.1 Delineamento Composto Central Rotacional

É usual que sejam feitos alguns ensaios no ponto central do espaço experimental. Ensaios no ponto central podem fornecer informações muito úteis sobre o comportamento das respostas entre os níveis inicialmente atribuídos aos fatores, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo. Já a adição de pontos axiais é uma alternativa interessante, para se ajustar às respostas experimentais um modelo de segunda ordem,

gerando um delineamento extremamente útil que é o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (RODRIGUES & IEMMA, 2005). A partir dos resultados do DCCR, traça-se o gráfico de superfície de resposta, podendo-se estabelecer a melhor combinação de fatores e as condições operacionais ótimas para o sistema estudado ou determinar a região que satisfaça as especificações operacionais (OLIVEIRA et al., 1999).

3.10.2 Melhoria de processos envolvendo reações hidrolíticas catalisadas por lipases

Alguns trabalhos tentando desenvolver ou melhorar processos de hidrólise enzimática por lipases têm sido realizados.

OLIVEIRA et al. (1999) verificaram a ação da lipase comercial FAP de *Rhizopus* sp. no processo de hidrólise parcial de gordura de babaçu, empregando a metodologia da superfície de resposta. Neste trabalho, o efeito das variáveis independentes concentração enzimática (U/mL) e tempo de reação (horas) e suas interações foram estudados em relação à resposta grau de hidrólise (%). As reações de hidrólise ocorreram em recipientes contendo a gordura de babaçu, água e a solução de lipase, a 40 °C, em banho de água. Após a reação, a mistura foi transferida para funil de separação para a decantação da fase gordurosa. Um Delineamento Composto Central Rotacional foi realizado havendo 12 ensaios, sendo 8 axiais e 4 centrais. O parâmetro tempo variou de 1 a 31 horas, enquanto que a concentração enzimática variou de 3 a 327U/mL, partindo de 16 horas e 165U/mL como pontos centrais. A maior porcentagem de hidrólise ocorreu nas condições de 165U/mL e 31 horas de reação. Após ajuste do modelo, ficou estabelecido que a porcentagem de hidrólise era dependente dos termos lineares “tempo de reação” e “concentração da enzima”, e do termo quadrático “concentração da enzima”. E o R² de quase 88%, demonstrou o ajustamento do modelo aos dados experimentais.

FREITAS et al. (2007) submeteram lipase pancreática suína a estudos de verificação do efeito da adição de sais sobre a atividade enzimática. A adição de diferentes sais, na mesma concentração, junto ao substrato, resultou tanto no aumento, quanto na diminuição da atividade lipásica. O cátion Na⁺ promoveu o maior acréscimo à atividade da enzima, por este motivo, em seguida, foi utilizado NaCl em um experimento fatorial 2², na tentativa de se compreender a influência da concentração deste sal e da concentração da lipase, e suas interações sobre a resposta (% hidrólise) do óleo de soja. O maior grau de hidrólise, 35%, foi alcançado com os maiores níveis de concentração de enzima (3%p/p) e NaCl (0,08%p/p). O

efeito da adição de NaCl foi pronunciado quando se utilizou níveis intermediários de concentração de lipase. A análise estatística demonstrou efeitos significativos de ambas as variáveis sobre a resposta grau de hidrólise. A concentração de enzima e de NaCl e suas interações foram estatisticamente significantes, enquanto que o quadrado dos efeitos, não, sendo portanto, excluídos da análise.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido utilizando a infraestrutura dos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise do Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG.
- Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da UFMG.

A metodologia do presente trabalho foi estruturada em 3 grandes fases apresentadas nas **Figuras 5,6,7**.

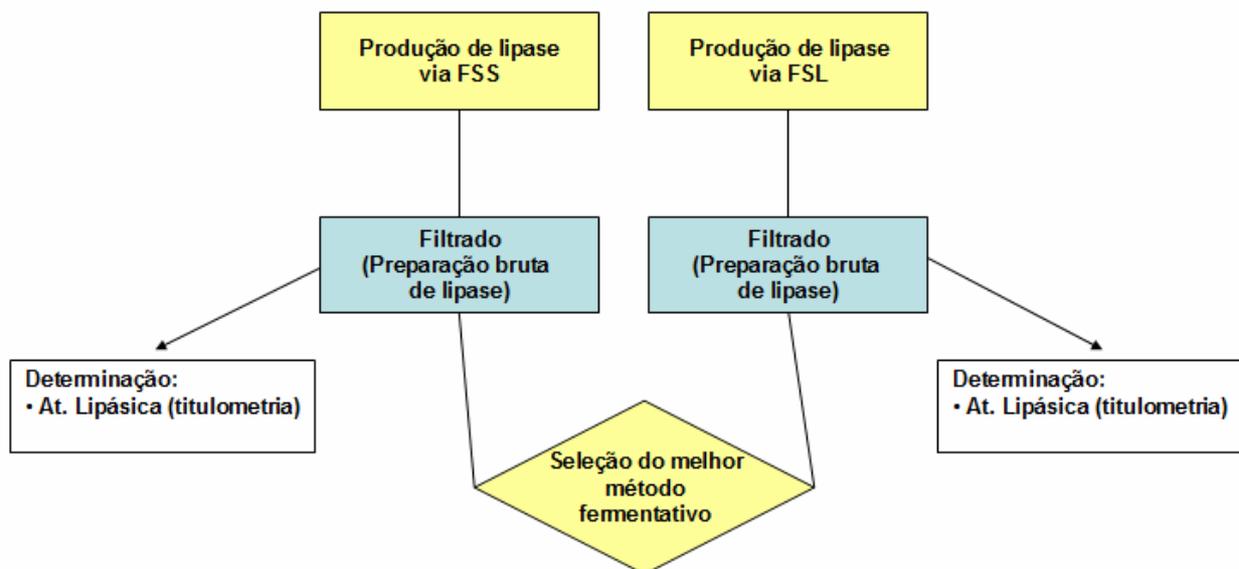


Figura 5 – Fluxograma Fase 1.

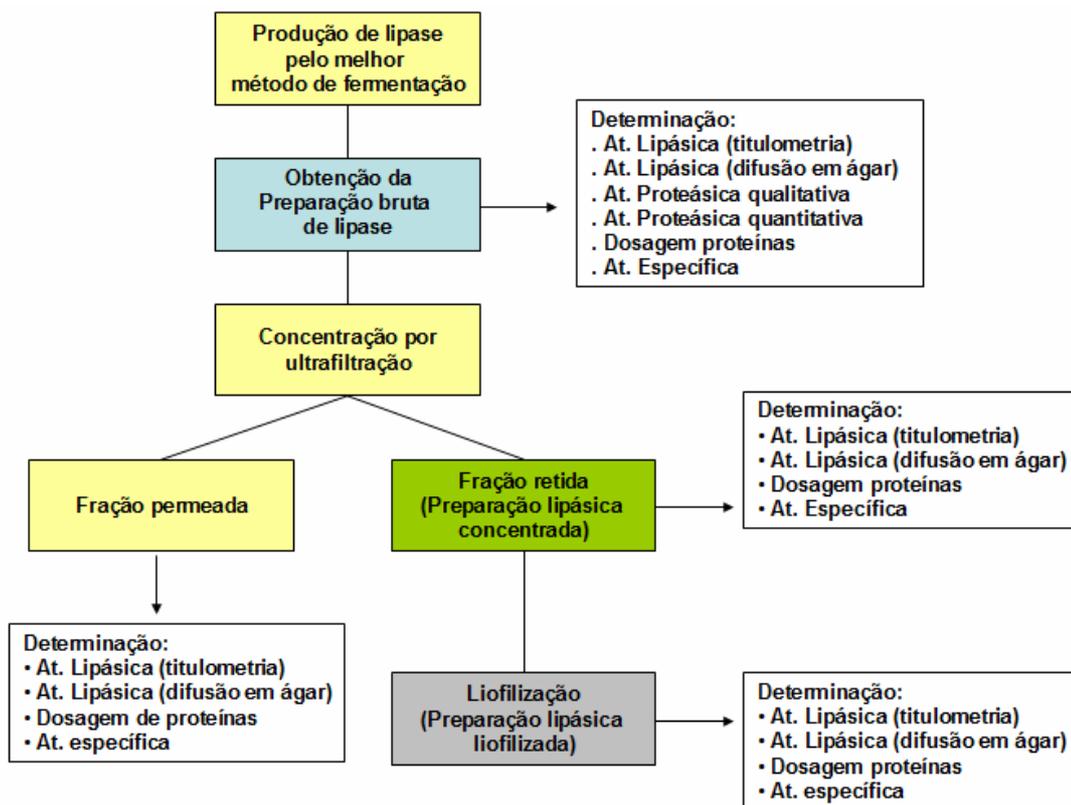


Figura 6 – Fluxograma Fase 2.

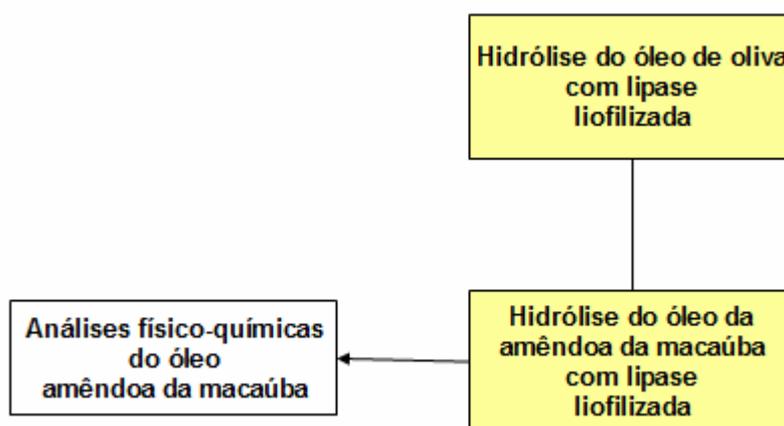


Figura 7 – Fluxograma Fase 3.

FASE 1

4.1 PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA EXTRACELULAR

Material

O ágar bacteriológico foi adquirido da Difco (EUA) e a peptona bacteriológica, da Biobrás (Brasil). O corante Azul Victoria foi adquirido da Aldrich (EUA) e o óleo de oliva, da Sigma (EUA). Os reagentes empregados eram de grau analítico, adquiridos de fontes comerciais. As batatas orgânicas eram da marca Fito (Brasil).

Métodos

4.1.1 Fonte de lipase extracelular

A lipase estudada neste trabalho foi produzida por fungo filamentoso da espécie *Colletotrichum gloesporioides* com capacidade lipolítica comprovada por COLEN (2006).

4.1.2. Manutenção do microorganismo

A cepa de *C. gloesporioides* previamente isolada e selecionada era mantida em ágar batata e dextrose (PDA), sob óleo mineral esterilizado (*master stock*), com subculturas no mesmo meio, a cada 60 dias (*production stock*). A composição e o modo de preparo do PDA foram os seguintes:

Ágar batata e dextrose

Glicose	20g/L
Ágar bacteriológico	20g/L
Infuso de batata orgânica	1L

A glicose foi dissolvida no infuso de batata orgânica e a mistura, homogeneizada. Após acertar o pH para 6,5, adicionou-se o ágar, que foi fundido. O meio ainda quente foi distribuído em tubos. Os tubos foram arrolhados e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

O infuso de batata foi preparado como se segue:

Infuso de batata

Batata orgânica descascada	250g
Água destilada	250mL

A batata orgânica, em cubos, foi colocada em balão de 1L, juntamente com os 250mL de água destilada. O balão foi levado à autoclave em vapor fluente durante 30 minutos. O conteúdo do balão foi filtrado em gaze e seu volume, completado para 1L.

4.1.3 Fermentação em Substrato Líquido (FSL)

4.1.3.1 Preparação do inóculo

Para preparo dos inóculos, o microorganismo em estudo foi cultivado a 30°C em estufa FANEM (São Paulo, SP), na superfície inclinada de PDA (ver item 4.1.2), durante 10 dias.

Após 10 dias de crescimento, foi preparada uma suspensão de esporos, lavando-se o cultivo da cepa na superfície inclinada com 10mL de água esterilizada. A concentração de esporos, na suspensão homogênea, foi da ordem de 10^6 esporos/mL, determinada por contagem em câmara de Newbauer.

4.1.3.2 Meio de cultura líquido para a produção de lipase via FSL

Para a produção da lipase, através da FSL, utilizou-se o meio descrito por COLEN (2006):

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona bacteriológica	10,0
Óleo de oliva	4,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
KH ₂ PO ₄	1,0
NaNO ₃	1,0
Ajustar para pH	6,0

Em frascos Erlenmeyers de 250mL, foram adicionados 50mL do meio de cultura. Os frascos, convenientemente coberto por tampões tipo sanduíche de gaze e algodão, e coifas de papel, foram submetidos à esterilização. Após resfriamento, os meios receberam 5mL da suspensão de esporos, como inóculo, em condições assépticas.

Os frascos foram incubados por 72 horas a 30°C em incubadora orbital MARCONI (Piracicaba, SP), a 160rpm. Estas condições foram determinadas por COLEN (2006), como sendo ótimas para a produção de lipase extracelular por *C. gloesporioides*. Em seguida, o micélio formado durante o cultivo de 72 horas, foi separado por filtração em papel de filtro qualitativo. O filtrado, livre de células, foi chamado de **caldo fermentado**, que continha a **preparação bruta de lipase** a ser analisada. O caldo fermentado foi avaliado segundo a cor, o aspecto, o pH (em potenciômetro da QUIMIS) e a atividade lipásica.

Foram realizadas duas repetições do estudo de produção de lipase via FSL, e em cada repetição, foram inoculados três frascos Erlenmeyers. Para cada repetição, foram preparados 2 frascos controles, os quais não receberam o inóculo de suspensão de esporos, ou seja, não poderia ocorrer crescimento nestes dois frascos.

4.1.3.3 Determinação da atividade lipásica

4.1.3.3.1 Método titulométrico

A dosagem da atividade lipásica por método titulométrico, foi feita em duas etapas, como descrito por WATANABE et al. (1977).

1ª Etapa: Incubação enzimática

A reação enzimática foi desenvolvida em frascos Erlenmeyers de 250mL de capacidade, em banho-maria a 30°C, sob agitação (150ciclos/min), durante 10 minutos em equipamento do tipo Dubnoff da marca SOLAB (Piracicaba, SP). A mistura da reação continha:

Emulsão (25%v/v) de óleo de oliva em sol. álcool polivinílico a 2%p/v	5mL
Sol. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0	5mL
Preparação bruta de lipase	1mL

A reação foi iniciada pela adição de 1mL da preparação bruta de lipase. Após 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 20mL de acetona/etanol (1:1). Em paralelo, empregou-se como controle (branco), a enzima inativada, ou seja, a preparação bruta de lipase foi previamente submetida a banho-maria fervente por 10 minutos. E ainda, no ensaio em branco, a preparação inativada foi adicionada à mistura de reação já contendo 20mL de acetona/etanol (1:1).

2ª Etapa: Titulação dos ácidos graxos liberados na reação enzimática

Em cada Erlenmeyer, após a reação enzimática (ensaios controle e enzimático), adicionaram-se 5 gotas de solução indicadora de timolftaleína 0,04%. Prosseguiu-se com a titulação dos ácidos graxos liberados com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05M, até ponto de viragem, caracterizado pelo aparecimento de coloração azul clara. O volume de solução de NaOH gasto em cada titulação foi anotado.

Cálculo da atividade lipásica:

$$\text{Atividade lipásica (U/mL)} = \frac{(V_{\text{enzimático}} - V_{\text{controle}}) \times f_c \times D \times 50}{t} \quad (6)$$

em que,

$V_{\text{enzimático}}$: volume de solução de NaOH 0,05M gasto para titular os ácidos graxos da reação enzimática.

V_{controle} : volume de solução de NaOH 0,05M gasto para titular os ácidos graxos presentes no branco da amostra.

f_c : fator de correção da solução titulante de NaOH 0,05N padronizada.

D : fator diluição.

t : tempo de reação, em minutos.

50: fator aplicado para expressar o resultado em micromoles de ácido graxo por mL de amostra. Representa o número de micromoles de NaOH por mL de solução 0,05M.

Definição da unidade de atividade lipásica:

Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 micromol (μmol) de ácidos graxos por minuto, nas condições padronizadas do teste.

4.1.4 Fermentação em Substrato Sólido (FSS)

4.1.4.1 Preparação do inóculo

Para preparo dos inóculos, o microorganismo em estudo foi cultivado a 30°C, na superfície inclinada de ágar batata e dextrose, durante 10 dias. A composição e o modo de preparo do PDA, e a preparação da suspensão de esporos foram realizados de acordo com o item 4.1.2 e 4.1.3.1, respectivamente.

4.1.4.2 Meio de cultura para a produção de lipase via FSS

Para a produção da lipase em estudo, através da FSS, utilizou-se o meio descrito por COLEN (2006). O meio para FSS foi distribuído em frascos de boca larga de 500mL de capacidade, com as respectivas quantidades de componentes:

Componentes	Quantidade por frasco
Solução salina concentrada 10x	2,0mL
Solução de peptona 10%	5,0mL
Emulsão (25%v/v) de óleo de oliva em sol. GA 1,25%p/v	5,0mL
Casca de arroz (lavada e seca)	15,0g
Água destilada	8,0mL

A solução salina concentrada 10x foi preparada como se segue:

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	10g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2g
KCl	0,2g
Água destilada	100,0mL

Os componentes líquidos eram misturados, homogeneizados e tinham o pH ajustado para 6,0, antes de serem adicionados à casca de arroz previamente lavada e seca.

Os frascos, convenientemente coberto por tampões, tipo sanduíche, de gaze e algodão, e coifas de papel (**Figura 8**), foram submetidos à esterilização. Após resfriamento,

os meios receberam 2,5mL da suspensão de esporos, como inóculo, em condições assépticas.

Os frascos foram mantidos em repouso durante 6 dias, a 30°C. Diariamente, cada frasco foi agitado manualmente por cerca de 1 minuto. Para a extração da enzima, foram adicionados 100mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0, em cada frasco. Os frascos foram submetidos à agitação branda (150rpm) por 1 hora, em agitador de frascos (MARCONI, Piracicaba, SP) (COLEN, 2006). Após agitação, os conteúdos dos frascos foram filtrados em papel de filtro qualitativo para obtenção do filtrado, livre de células, que foi chamado de **caldo fermentado**, que continha a **preparação bruta de lipase** a ser analisada. O caldo fermentado foi avaliado segundo a cor, o aspecto e a atividade lipásica.



Figura 8 – Frascos contendo o meio para FSS, após a esterilização.

Foram realizadas duas repetições do estudo de produção de lipase via FSS e, em cada repetição, foram inoculados quatro frascos. Em cada repetição, foram preparados 2 frascos controles, os quais não receberam o inóculo de suspensão de esporos, ou seja, não poderia ocorrer crescimento nestes dois frascos.

4.1.4.3 Determinação da atividade lipásica

4.1.4.3.1 Método titulométrico

A dosagem da atividade lipásica por método titulométrico, foi feita em duas etapas, de acordo com o método empregado por WATANABE et al. (1977), já descrito no item 4.1.3.3.1.

4.2 SELEÇÃO DO MELHOR PROCESSO DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR

A escolha do processo fermentativo, que seria utilizado nas próximas etapas desta pesquisa, se deu pela simples comparação de resultados, em termos de atividade lipásica, entre a produção de lipase via FSL e FSS. Dessa forma, ficou estabelecido que toda a preparação de lipase necessária, a partir de então, seria produzida por FSL que forneceu melhores resultados (ver item 5.1).

4.3 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE ESTOCADA EM REFRIGERADOR A 4 °C

Na preparação bruta de lipase obtida via FSL, dosou-se a atividade lipásica, logo após a sua produção e, de 10 em 10 dias, ao longo do tempo (40 dias) em que permanecia no refrigerador. A fim de se evitar o crescimento de bactérias e fungos no caldo estocado, foi adicionada de solução de azida sódica na concentração de 0,01%. As análises foram realizadas pelo método titulométrico e sempre em triplicata.

4.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE ESTOCADA EM *FREEZER* A -20 °C

A preparação bruta de lipase foi dividida em alíquotas de 10mL, estocadas em frascos tipo penicilina, que foram mantidas em *freezer* BOSCH, a -20 °C, durante 40 dias. As dosagens da atividade lipásica foram realizadas pelo método titulométrico no caldo fermentado, logo após sua produção e, periodicamente, de 10 em 10 dias, nas alíquotas congeladas. Para a realização das análises, cada alíquota foi retirada do *freezer* e descongelada naturalmente, à temperatura ambiente. Após o descongelamento, a amostra foi

cuidadosamente homogeneizada e sua atividade, analisada. As análises foram realizadas sempre em triplicata.

FASE 2

4.5 ANÁLISES SOBRE A PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE DESTINADA À CONCENTRAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO

Um novo volume de caldo fermentado, contendo a preparação bruta de lipase, foi produzido, via FSL, o qual foi destinado às etapas de concentração e liofilização, após as análises cabíveis.

Material

O ágar bacteriológico foi adquirido da Difco (EUA), o corante azul Victoria foi adquirido da Aldrich (EUA) e o óleo de oliva, da Sigma (EUA) que é altamente refinado e de baixa acidez. Os reagentes empregados eram de grau analítico, adquiridos de fontes comerciais.

Métodos

4.5.1 Determinação da atividade lipásica

4.5.1.1 Método titulométrico

A dosagem da atividade lipásica por método titulométrico, foi feita em duas etapas, de acordo com o método empregado por WATANABE et al. (1977), já descrito no item 4.1.3.3.1.

4.5.1.2 Ensaio em placa de Petri

A atividade lipásica do caldo fermentado foi determinada, também, pela medida do halo de hidrólise de um substrato lipídico, pela difusão da enzima em gel de ágar

bacteriológico. As preparações foram analisadas em géis identificados como: ATV e AEPV, segundo OLIVEIRA (2000) e COLEN (2006).

Composição do gel ATV (em 100mL):

Tributirina	0,6mL
Ágar bacteriológico	1,5g
Corante Azul Victoria (10mg/mL)	1,0mL
Tampão Tris-HCL 0,02M pH 8,9 (com azida sódica 0,2g/L)	100,0mL

Composição do gel AEPV (em 100mL):

Emulsão (25% v/v) de óleo de oliva em álcool polivinílico a 2% p/v	1,5mL
Ágar bacteriológico	1,5g
Corante Azul Victoria (10mg/mL)	1,0mL
Tampão Tris-HCL 0,02M pH 8,9 (com azida sódica 0,2g/L)	100,0mL

Após fusão do ágar na solução tampão, o substrato foi adicionado e a suspensão emulsionada em liquidificador durante um minuto. Após a incorporação da solução do corante, a mistura foi distribuída em placas de Petri.

Após a gelificação do ágar, foram escavados 4 poços de 8mm de diâmetro, com auxílio de um cilindro de aço inoxidável, em pontos bem distribuídos, por placa de gel. Sobre os poços, devidamente identificados na parte externa da placa, depositou-se uma alíquota de 20µL do filtrado. Os poços de uma mesma placa receberam alíquotas de um mesmo filtrado. Após incubação a 30°C, por 24, mediu-se o diâmetro do halo de hidrólise, de cor azul, no gel de coloração bonina, com uma régua milimetrada. A medida do diâmetro do poço foi descontada. O resultado foi expresso em milímetros de halo. Foram utilizadas 2 placas de ATV e duas placas de AEPV, portanto, totalizando 8 ensaios para cada meio.

O corante Azul Victoria foi adicionado para facilitar a visualização do halo de hidrólise.

O uso de dois substratos diferentes (óleo de oliva e tributirina) para detecção de atividade lipásica, está de acordo com JENSEN (1983) e SMITH & HAAS (1992).

4.5.2 Determinação qualitativa de atividade proteásica

O caldo fermentado, obtido via FSL, destinado à concentração e liofilização da enzima, poderia conter enzimas proteolíticas capazes de degradarem proteínas presentes na preparação, inclusive lipase. A pesquisa destas enzimas faz-se necessária para que as medidas necessárias fossem tomadas logo no início. A pesquisa de proteases foi realizada em meio de gelatina, como descrito por OLIVEIRA (2000).

Meio de gelatina

Gelatina	120g
Tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,0 ou 8,0	1000,0mL
Azida sódica	0,25g

A gelatina foi dissolvida no tampão, aquecendo-o até fervura, e a azida, adicionada na solução ainda quente. Após homogeneização, o meio foi distribuído, em porções de 10mL, em tubos 18 x 180mm que foram armazenados em refrigerador para solidificação da gelatina.

Em dois tubos, contendo o meio de gelatina solidificada, no pH 7 ou 8, foi aplicada uma alíquota de 100 μ L do caldo de cultura fermentado. Após incubação por 5 dias em estufa FANEM (São Paulo, SP), a 30°C, os tubos foram colocados em banho de gelo para solidificação da gelatina íntegra e visualização da gelatina hidrolisada. Após a solidificação da gelatina, no banho de gelo, o aparecimento de camada líquida na superfície do meio, indicaria a hidrólise da gelatina por proteases. Foram realizados, paralelamente, ensaios controles, nos quais foram inoculadas alíquotas de 100 μ L do caldo de cultura proveniente dos frascos controles (que não receberam inóculo de suspensão de esporos).

4.5.3 Determinação quantitativa de atividade proteásica

A atividade proteásica no caldo de cultura fermentado foi determinada por método colorimétrico com azocaseína, segundo TOMARELLI et al. (1949). Este método consiste em quatro etapas como se segue:

1ª etapa: Preparo da solução de substrato

Preparou-se uma solução de azocaseína em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 na concentração de 25mg/mL.

2ª etapa: Preparo do controle do substrato

Solução Tampão Tris HCl 0,05M pH 8,0	1,0mL
Solução de substrato	1,0mL
Repouso	30 °C/30 min.
Solução de ácido tricloroacético (TCA) 5%	8,0mL
Repouso	banho de gelo/10 min.
Filtrar em papel de filtro	
Fazer reação de cor (4ª etapa) e zerar o espectrofotômetro a 445nm	

3ª etapa: Reação enzimática

Reação enzimática Teste (enzima)

Solução de substrato	1,0mL
Preparação enzimática	1,0mL
Repouso	30 °C/30 min.
Solução de TCA 5%	8,0mL
Repouso	banho de gelo/10 min.
Filtrar em papel de filtro	

Reação enzimática Controle (branco)

Preparação enzimática	1,0mL
Solução de TCA 5%	8,0mL
Solução de substrato	1,0mL
Repouso	banho de gelo/10 min.
Filtrar em papel de filtro	

As reações foram paralisadas com a adição da solução de TCA 5%, formando precipitado amarelo. Quanto maior a concentração de enzimas proteásicas, maior seria o grau de digestão do substrato (azocaseína), portanto, menor seria a quantidade de precipitado formado. Os filtrados obtidos foram submetidos à reação de cor.

4ª etapa: Reação de cor

Filtrado	5,0mL
Solução de KOH 0,5N	5,0mL
Leitura: absorvância a 445nm	

A adição da solução de KOH dispensou ao filtrado uma coloração avermelhada.

A atividade proteásica foi calculada, em triplicata, através da diferença entre as leituras de absorvância da reação enzimática Teste e da reação enzimática Controle, em espectrofotômetro FEMTO (São Paulo, SP) (leitura de 200 a 1100nm). Esta diferença foi dividida por 30, para que o resultado fosse dado por minuto, ou seja:

$$\text{Atividade proteásica} = \frac{(\text{Abs. reação Teste} - \text{Abs. reação Controle})}{30} \quad (7)$$

Definição da unidade de atividade proteásica por método colorimétrico:

Uma unidade de atividade proteásica corresponde à quantidade de enzima que causa uma diferença de 0,01 unidades de absorvância entre a amostra teste e o seu controle, por minuto, nas condições do ensaio (TOMARELLI et al, 1949).

4.5.4 Dosagem de proteínas, pela leitura da absorvância em 280nm, da preparação bruta de lipase

A concentração de proteínas, na preparação bruta de lipase, foi avaliada através da medida de absorvância em 280nm, segundo GROVES et al. (1968, citado por PETERSON, 1983). Este método é baseado no fato de que as proteínas mostram absorção na região de 280nm, que é atribuída ao grupo fenólico da tirosina e ao grupo indólico do triptofano.

A absorvância da amostra foi medida em 280nm e 260nm, utilizando espectrofotômetro FEMTO (São Paulo, SP) e cubetas de quartzo muito bem limpas e em perfeito estado. As leituras foram aplicadas na seguinte fórmula de correção:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260} \quad (8)$$

A real vantagem desse procedimento foi a sua não destrutividade da amostra, para que esta pudesse ser utilizada em outros procedimentos. Quanto maior fosse a quantidade de preparação bruta de lipase, maior seria a quantidade de enzima liofilizada obtida pelos procedimentos subseqüentes.

4.5.5 Atividade lipásica específica da preparação bruta de lipase

A atividade lipásica específica (U/mg de proteína) foi calculada a partir dos resultados encontrados com a dosagem da atividade lipásica, pelo método titulométrico (item 4.5.1.1) e pela dosagem de proteínas (item 4.5.4).

Conhecendo a quantidade de proteínas (em mg) que se tem na amostra, é possível saber, conseqüentemente, quantas unidades de enzima há por 1mg de proteína.

4.6 CONCENTRAÇÃO, POR ULTRAFILTRAÇÃO, DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE

Material

O ágar bacteriológico foi adquirido da Difco (EUA), o corante Azul Victoria foi adquirido da Aldrich (EUA) e o óleo de oliva, da Sigma (EUA). Os reagentes empregados eram de grau analítico, adquiridos de fontes comerciais.

Método

A preparação bruta de lipase foi concentrada em aparelho de ultrafiltração Labscale™ TFF System (MILLIPORE), em membrana Pellicon® XL (MILLIPORE) de acetato de celulose,

que retém proteínas com peso molecular acima de 10.000Da. O volume foi concentrado 45 vezes, a uma velocidade de 40mL de permeado/minuto.

Após a etapa de ultrafiltração, foram obtidas duas frações: a **fração retida**, que continha a **preparação lipásica concentrada**, e a **fração permeada**.

E, em ambas as frações, foram realizadas as dosagens da atividade lipásica, da concentração de proteínas e da atividade específica.

4.6.1 Determinação da atividade lipásica da fração retida

4.6.1.1 Método titulométrico

A dosagem da atividade lipásica por método titulométrico, foi feita em duas etapas, de acordo com o método empregado por WATANABE et al. (1977), já descrito no item 4.1.3.3.1.

Entretanto, antes de iniciar a análise, foi necessário ter o cuidado de fazer a diluição, em água destilada, da fração retida que havia sido concentrada 45 vezes. A partir da amostra diluída, a determinação da atividade lipásica foi feita em triplicata.

4.6.1.2 Ensaio em placa de Petri

A atividade lipásica da fração retida, após sua diluição, foi determinada, também, pela medida do halo de hidrólise de um substrato lipídico, pela difusão da enzima em gel de ágar bacteriológico, como descrito no item 4.5.1.2.

4.6.2 Dosagem de proteínas, pela leitura da absorvância em 280nm, na fração retida

A concentração de proteínas, na fração retida, após sua diluição, foi avaliada através da medida de absorvância em 280nm, segundo GROVES et al. (1968, citado por PETERSON, 1983), como descrito no item 4.5.4.

A real vantagem desse procedimento foi a sua não destrutividade da amostra, ou melhor, da fração retida que havia sido diluída, para que esta pudesse ser utilizada em outros procedimentos e não fosse preciso lançar mão de novas diluições a partir da fração retida

original. Quanto maior fosse a quantidade da fração retida original, maior seria a quantidade de enzima liofilizada obtida nos procedimentos subseqüentes.

4.6.3 Atividade lipásica específica da fração retida

A atividade lipásica específica (U/mg de proteína) foi calculada a partir dos resultados encontrados com a dosagem da atividade lipásica, pelo método titulométrico (item 4.6.1.1) e pela dosagem de proteínas (item 4.6.2).

Conhecendo a quantidade de proteínas (em mg) que se tem na amostra, é possível saber, conseqüentemente, quantas unidades de enzima há por 1mg de proteína.

4.6.4 Determinação da atividade lipásica da fração permeada

A dosagem da atividade lipásica, na fração permeada, foi necessária para verificar se realmente a membrana de ultrafiltração foi capaz de reter toda a enzima. Tal fato seria verificado caso não houvesse atividade lipásica nessa fração.

4.6.4.1 Método titulométrico

A dosagem da atividade lipásica por método titulométrico, foi feita em duas etapas, de acordo com o método empregado por WATANABE et al. (1977), já descrito no item 4.1.3.3.1.

4.6.4.2 Ensaio em placa de Petri

A atividade lipásica da fração permeada foi determinada, também, pela medida do halo de hidrólise de um substrato lipídico, pela difusão da enzima em gel de ágar bacteriológico, como descrito no item 4.5.1.2.

4.6.5 Dosagem de proteínas, pela leitura da absorvância em 280nm, na fração permeada

A concentração de proteínas, na fração permeada foi avaliada através da medida de absorvância em 280nm, segundo GROVES et al. (1968, citado por PETERSON, 1983), já descrito no item 4.5.4, uma vez que este mesmo método foi empregado para dosagem de proteínas na fração retida.

4.6.6 Atividade lipásica específica da fração permeada

A atividade lipásica específica (U/mg de proteína) foi calculada a partir dos resultados encontrados com a dosagem da atividade lipásica, pelo método titulométrico (item 4.6.4.1) e pela dosagem de proteínas (item 4.6.5).

Conhecendo a quantidade de proteínas (em mg) que se tem na amostra e, se houver atividade lipásica é possível saber, conseqüentemente, quantas unidades de enzima há por 1mg de proteína.

4.7 LIOFILIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO LIPÁSICA CONCENTRADA

Material

O ágar bacteriológico foi adquirido da Difco (EUA), o corante Azul Victória foi adquirido da Aldrich (EUA) e o óleo de oliva, da Sigma (EUA). Os reagentes empregados eram de grau analítico, adquiridos de fontes comerciais.

Métodos

A preparação lipásica concentrada foi dividida em béqueres de vidro de 50mL (aproximadamente 10mL por béquer), que foram preparados para o processo de liofilização. Os béqueres preparados foram colocados em um recipiente contendo nitrogênio líquido, para que as alíquotas de fração retida pudessem ser congeladas. Uma vez congeladas, essas

alíquotas foram colocadas, juntamente com seus respectivos béqueres, no aparelho liofilizador, durante 24 horas.

Após o processo de liofilização, o pó formado pela enzima liofilizada foi pesado e acondicionado em frasco de vidro tipo penicilina coberto por folha de alumínio e devidamente identificado. O pó liofilizado foi chamado de **preparação lipásica liofilizada**. O frasco penicilina contendo a enzima liofilizada foi muito bem fechado e armazenado, no interior de um frasco de boca larga, em refrigerador a 4°C.

A fração retida pela ultrafiltração foi submetida ao processo de liofilização para que a preparação lipásica concentrada pudesse ser conservada por longo período de tempo e para que estivesse apta para o uso a qualquer momento, sem ter que repetir todo o processo de produção, o que, certamente, levaria ao gasto de tempo, além de muito trabalho (BON et al., 2008^b).

4.7.1 Determinação da atividade lipásica da preparação lipásica liofilizada

4.7.1.1 Método titulométrico

A dosagem da atividade lipásica por método titulométrico, foi feita em duas etapas, de acordo com o método empregado por WATANABE et al. (1977), já descrito no item 4.1.3.3.1.

Entretanto, antes de iniciar a análise, foi necessário fazer a solubilização de uma massa conhecida do pó liofilizado contendo a enzima. Para isso, pesou-se cerca de 1mg de pó liofilizado em balança analítica BIOPRECISA e que foi transferido quantitativamente para balão volumétrico (25mL), utilizando tampão Tris-HCL 0,1M pH 8,0. A partir da amostra solubilizada, a determinação da atividade lipásica (U/mg de pó liofilizado) foi feita em triplicata.

4.7.1.2 Ensaio em placa de Petri

A atividade lipásica da enzima liofilizada foi determinada, também, pela medida do halo de hidrólise de um substrato lipídico, pela difusão da enzima em gel de ágar bacteriológico, como descrito no item 4.5.1.2. Esta análise ocorreu após a solubilização da enzima, que se encontrava liofilizada, como descrito no item 4.7.1.1.

4.7.2 Dosagem de proteínas, pela leitura da absorvância em 280nm, na preparação lipásica liofilizada

A concentração de proteínas, na preparação lipásica liofilizada, após sua solubilização, foi avaliada através da medida de absorvância em 280nm, como descrito no item 4.5.4.

Como a enzima liofilizada havia sido diluída em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0, foi feito um ensaio em branco paralelamente à leitura da amostra, realizando a leitura de absorvância apenas da solução tampão.

A real vantagem desse procedimento foi a sua não destrutividade da amostra, ou melhor, da amostra solubilizada, para que esta pudesse ser utilizada em outros procedimentos e não fosse preciso lançar mão de novas solubilizações a partir do pó liofilizado, uma vez que este seria utilizado, em maior quantidade, em procedimentos subseqüentes.

4.7.3 Atividade lipásica específica da preparação lipásica liofilizada

A atividade lipásica específica (U/mg de proteína) foi calculada a partir dos resultados encontrados com a dosagem da atividade lipásica, pelo método titulométrico (item 4.7.1.1) e pela dosagem de proteínas (item 4.7.2).

Conhecendo a quantidade de proteínas (em mg) que se tem na amostra, é possível saber, conseqüentemente, quantas unidades de enzima há por 1mg de proteína.

4.8 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA PREPARAÇÃO LIPÁSICA LIOFILIZADA ESTOCADA EM REFRIGERADOR A 4°C

Dosou-se a atividade lipásica da enzima liofilizada, logo após a sua produção (tempo zero) e, de 10 em 10 dias, ao longo do tempo (80 dias) em que permanecia no refrigerador. As análises foram realizadas pelo método titulométrico e sempre em triplicata.

FASE 3

4.9 ENSAIOS PRELIMINARES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE OLIVA

Material

Foi utilizado óleo de oliva da marca Sigma (EUA), altamente refinado e de baixa acidez, ideal para ser empregado como substrato em reações com lipases. Os reagentes empregados eram de grau analítico, adquiridos de fontes comerciais.

Métodos

A ação hidrolítica da preparação lipásica liofilizada foi previamente avaliada sobre óleo de oliva Sigma (rico em triacilgliceróis formados por ácidos graxos poliinsaturados) como substrato.

Para que o processo de hidrólise mediado por lipases ocorra, é necessário atender dois requisitos básicos: que haja formação de uma interface lipídio – água e que a lipase seja adsorvida nesta interface. A eficiência da reação é maior com maior área da interface. Por outro lado, como toda reação enzimática, depende de outros fatores como temperatura, pH e tempo de reação, além, obviamente, da concentração da enzima.

Assim, foram realizados ensaios preliminares para determinar as melhores condições de **concentração de enzima (U/25mL)** e de **tempo de reação (horas)**. Diferentes estudos têm avaliado os valores de pH e de temperatura ótimos para a hidrólise de óleos e gorduras mediada por lipases, valores estes que estão quase sempre entre 6,5 e 8,5, para o pH, e entre 30 e 40 °C, para a temperatura (KHOR et al., 1983; FU et al., 1995; OLIVEIRA, 2000; BUENO, 2005; PADILHA & AUGUSTO-RUIZ, 2007). Diante disso, durante os ensaios, o pH foi mantido em 8,0 e a temperatura em 30 °C, de acordo com o estabelecido por OLIVEIRA (2000) e COLEN et al. (2006).

Realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para elaborar o modelo preditivo. Este modelo, também chamado de segunda ordem, foi empregado para avaliar a influência das variáveis independentes **concentração de enzima** e **tempo de reação (Tabela 3)** sobre a variável resposta definida como o **grau de hidrólise**.

Os valores estabelecidos para os pontos centrais (codificados como 0) basearam-se no estudo realizado por OLIVEIRA et al. (1999).

Tabela 3 – Valores utilizados no DCCR para as duas variáveis

Variáveis independentes	Variáveis codificadas	Níveis					Variação
		-1,414	-1	0	+1	+1,414	
Tempo (horas)	X ₁	2	6	16	26	30	10
Conc. enzima (U/25mL)	X ₂	24	65	165	265	306	100

Foram realizados 12 ensaios no total, segundo a matriz mostrada na **Tabela 4**, incluindo quatro pontos axiais e quatro repetições do ponto central. Os resultados do DCCR foram usados para ajustar uma equação polinomial de segunda ordem e avaliados de acordo com os efeitos de cada variável de entrada e suas interações, verificando a validade da equação quadrática obtida tanto em termos de coeficiente de determinação.

Tabela 4 - Matriz do DCCR para a combinação das variáveis concentração de enzima e tempo de reação

Ensaio	Tempo (horas)	Concentração enzimática (U/25mL)	Variáveis Codificadas	
			x ₁	x ₂
1	6	65	-1	-1
2	26	65	+1	-1
3	6	265	-1	+1
4	26	265	+1	+1
5	2	165	-1,414	0
6	30	165	+1,414	0
7	16	24	0	-1,414
8	16	306	0	+1,414
9	16	165	0	0
10	16	165	0	0
11	16	165	0	0
12	16	165	0	0

Os ensaios foram todos desenvolvidos em frascos Erlenmeyers (250mL), sob agitação 160rpm, em incubadora orbital MARCONI (Piracicaba, SP) com temperatura controlada em 30°C, durante o tempo de reação necessário em cada ensaio. As condições basais das reações foram:

Emulsão (25% v/v) de óleo de oliva em sol. GA 1,25 % p/v	13,0mL
Sol. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0	12,0mL
Preparação lipásica reconstituída	25,0mL

As diferentes concentrações de enzima (U/25mL) utilizadas nos ensaios foram obtidas a partir da solubilização de massa conhecida da preparação lipásica liofilizada, cuja atividade (U/mg de pó) já havia sido determinada (item 4.7.4), em 25mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. À esta solução deu-se o nome de **preparação lipásica reconstituída**.

Primeiramente, as soluções de lipases reconstituídas foram distribuídas nos respectivos frascos Erlenmeyers. Em seguida, em cada frasco, foi adicionado os 12mL de solução tampão. E, por último, o volume correspondente à emulsão foi distribuído em cada frasco, dando início à reação. Em paralelo, para cada ensaio, empregaram-se 2 controles (brancos) com 25mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0, ao invés de 25mL de preparado lipásica reconstituída.

Decorrido o tempo de reação, os frascos Erlenmeyers, contendo a mistura de reação, foram aquecidos em banho-maria fervente durante 15 minutos para destruição da enzima. Após resfriamento, a concentração de ácidos graxos liberados foi determinada por titulação com NaOH 0,05N, após ter sido descontada a quantidade de ácidos graxos presentes no controle da reação.

O grau de hidrólise (%) foi calculado para cada ensaio, segundo MOZAFFAR & WEETE (1995) e PADILHA & AUGUSTO-RUIZ (2007), aplicando a fórmula:

$$\text{Grau de hidrólise (\%)} = \frac{\text{micromoles de ácido graxo liberado} \times 100}{\text{IS} \times (1000/56,1) \times m} \quad (14)$$

em que,

IS = índice de saponificação do óleo de oliva

m = massa (g) de óleo de oliva

O ensaio que apresentou a melhor resposta, ou seja, o maior grau de hidrólise do óleo de oliva, foi repetido por mais 3 vezes para confirmação do resultado.

4.10 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA

Material

O óleo da amêndoa da macaúba foi obtido da empresa Cocal Brasil que se localiza na cidade de Abaeté, em Minas Gerais (Brasil). Os demais reagentes eram todos de grau analítico e adquiridos de diferentes fornecedores.

Métodos

Foram adquiridas 3 amostras de um mesmo lote de óleo da amêndoa da macaúba. Os frascos contendo as amostras foram cobertos por papel alumínio, devidamente identificados e mantidos em temperatura ambiente até o momento das análises. As 3 amostras do óleo foram identificadas com as letras A, B e C. Todas as amostras apresentavam-se líquidas e homogêneas durante as análises físico-químicas. As três amostras de óleo foram analisadas em triplicata.

4.10.1 Acidez em ácido oléico

A determinação de acidez, em ácido oléico, do óleo da amêndoa da macaúba foi realizada segundo IAL (2005), e resumiu-se em titular, com solução de álcali padrão, a acidez do produto, assim como os ácidos graxos obtidos dos lipídios. As amostras do óleo estavam homogêneas e completamente líquidas. Foram pesados 2g do óleo da amêndoa da Macaúba em frasco Erlenmeyer (125mL) e adicionados 25mL de solução de éter-álcool (2:1) neutra. Após adição de duas gotas do indicador fenolftaleína, o conteúdo do frasco Erlenmeyer foi titulado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N até o aparecimento da coloração rósea. A acidez em ácido oléico foi calculada através da equação:

$$(V \times f_c \times 100 \times 0,0282) / P = \text{Acidez em ácido oléico (\% m/m)} \quad (9)$$

em que,

V = volume (mL) de solução de hidróxido de sódio 0,1N gasto na titulação

f_c = fator da solução de hidróxido de sódio

P = massa (g) da amostra

4.10.2 Índice de iodo pelo método de Wijs

O índice de iodo foi determinado pelo método de Wijs, que se baseia no princípio da fixação do iodo nas ligações etilênicas dos ácidos graxos, seguindo o procedimento descrito em IAL (2005). A amostra foi filtrada através de papel de filtro para remover impurezas e traços de umidade e foram pesados 0,25g do óleo em Erlenmeyer (500mL) de boca esmerilhada, com tampa, seguido da adição de 10mL de cicloexano. Com auxílio de bureta, 25mL da solução de Wijs foram transferidos para o frasco Erlenmeyer contendo a amostra. Após ser tampado, o frasco foi agitado cuidadosamente e deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Foram adicionados ao frasco 10mL da solução de iodeto de potássio (KI) a 15% e 100mL de água fervida e fria, seguido de titulação com solução de tiossulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 0,1N até aparecimento de fraca coloração amarela, quando, então, 2mL de solução indicadora de amido 1% foi adicionada. A titulação continuou até o desaparecimento da cor azul. Uma determinação em branco foi preparada, procedendo da mesma forma que a amostra. O índice de iodo foi calculado através da equação:

$$[(V_B - V_A) \times M \times 12,69] / P = \text{Índice de iodo} \quad (10)$$

em que,

M = molaridade da solução de Na₂S₂O₃

V_B = volume (mL) gasto na titulação do branco

V_A = volume (mL) gasto na titulação da amostra

P = massa (g) da amostra

4.10.3 Índice de saponificação

A determinação do índice de saponificação, que expressa o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para saponificar um grama de amostra, foi realizada, segundo IAL (2005). Foram pesados entre 4 e 5g de amostra completamente seca, à qual 50mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH) foram adicionados. Um branco foi preparado e sua análise ocorreu simultaneamente à amostra. Com o condensador conectado e fervura suave, a amostra foi saponificada completamente por 1 hora. Após resfriamento do frasco, a parte interna do condensador foi lavada com água. O condensador foi desconectado e 1mL de indicador fenolftaleína, adicionado, procedendo a titulação com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5M até desaparecimento da cor rósea. O índice de saponificação foi calculado através da equação:

$$[28,05 \times f_c \times (V_B - V_A)] / P = \text{Índice de saponificação} \quad (11)$$

em que,

V_A = volume gasto na titulação da amostra

V_B = volume gasto na titulação do branco

f_c = fator da solução de HCl 0,5M

P = massa (g) da amostra

4.10.4 Índice de peróxido

A determinação do índice de peróxido ocorreu, segundo método descrito por IAL (2005). Este método se baseia na determinação de todas as substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000g de amostra, que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste. Em frasco Erlenmeyer (250mL), foram pesados ($5 \pm 0,05$)g do óleo da amêndoa da macaúba e adicionados 30mL da solução de ácido acético-clorofórmio (3:2), seguido de agitação até completa dissolução. Foram adicionados 0,5mL da solução saturada de iodeto de potássio, deixando em repouso ao abrigo da luz, por exatamente 1 minuto. Foram acrescentados 30mL de água destilada, seguido de titulação com tiosulfato de sódio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N até que a coloração amarela tivesse quase desaparecido. Foi adicionado 0,5mL de solução indicadora de amido e a titulação continuou até total desaparecimento da

coloração azul. Uma prova em branco foi preparada, nas mesmas condições, e titulada. O índice de peróxido foi calculado através da equação:

$$[(V_A - V_B) \times N \times f \times 1000] / P = \text{Índice de peróxido, em meq/1000g amostra} \quad (12)$$

em que,

V_A = volume (mL) da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N gasto na titulação da amostra

V_B = volume (mL) da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N gasto na titulação do branco

N = normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

f_c = fator da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N

P = massa (g) da amostra

4.10.5 Teor de umidade

O teor de umidade, que corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida, também foi determinado, segundo IAL (2005). Em cápsula de porcelana previamente tarada, foram pesados 5g da amostra do óleo da amêndoa da macaúba. A cápsula contendo a amostra foi aquecida, em estufa, por 1 hora a 105 °C, resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até peso constante. O teor de umidade foi calculado através da equação:

$$(100 \times N) / P = \text{umidade, a } 105^\circ\text{C, \% m/m} \quad (13)$$

em que,

N = perda de massa(g)

P = massa (g) da amostra

4.11 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA

O ensaio que apresentou o maior grau de hidrólise do óleo de oliva foi selecionado e a partir dele, a variável concentração de enzima foi mantida constante, efetuando-se um estudo cinético, com acompanhamento da evolução do grau de hidrólise do **óleo da amêndoa da macaúba**, no intervalo de 0 a 48 horas. As medidas do grau de hidrólise foram realizadas a cada 8 horas.

As reações foram desenvolvidas em frascos Erlenmeyers (250mL), sob agitação 160rpm, em incubadora orbital MARCONI (Piracicaba, SP) com temperatura controlada em 30°C. Para cada intervalo, havia 3 frascos Erlenmeyers com a mistura de reação, portanto, cada ponto da curva (grau de hidrólise em função do tempo de reação) foi calculado em triplicata. As condições basais da reação foram:

Emulsão (25%v/v) de óleo da amêndoa em sol. GA 1,25%p/v	13,0mL
Sol. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0	12,0mL
Preparação lipásica reconstituída	25,0mL

O prosseguimento da reação de hidrólise, a paralisação da reação e a dosagem de ácidos graxos liberados foram realizados exatamente como na hidrólise do óleo de oliva (item 4.6.2).

O grau de hidrólise (%) foi calculado para cada ensaio, segundo MOZAFFAR & WEETE (1995) e PADILHA & AUGUSO-RUIZ (2007), aplicando a fórmula:

$$\text{Grau de hidrólise (\%)} = \frac{\text{micromoles de ácido graxo liberado} \times 100}{\text{IS} \times (1000/56,1) \times m} \quad (15)$$

em que,

IS = índice de saponificação do óleo da amêndoa da macaúba

m = massa (g) de óleo da amêndoa da macaúba

Foi avaliada também a evolução da reação quanto à concentração de ácidos graxos em função do tempo.

4.12 MODELO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com o planejamento experimental foram analisados com o programa Statistica 7.0, para o cálculo do modelo matemático e análise de variância, e para a construção do gráfico em curva de nível e superfície de resposta. O delineamento composto central rotacional foi empregado para estudar a combinação de duas variáveis independentes – concentração de enzima e tempo de reação – codificadas como X_1 e X_2 , respectivamente. Cada variável experimental possui os níveis -1,41; -1; 0; +1; +1,41. Foram realizadas um total de 12 combinações, incluindo quatro repetições do ponto central (no valor codificado 0) e quatro pontos axiais (nos valores codificados: -1,41 e +1,41). A função resposta (Y) medida foi o grau de hidrólise do óleo de oliva. Os resultados do DCCR foram usados para ajustar uma equação polinomial de segunda ordem representada pela equação 16:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (16)$$

As variáveis de cada fator estimado foram divididas em linear, quadrático e interação entre os componentes. Os coeficientes do polinômio foram representados por β_0 (termo constante), β_1 , β_2 (efeitos lineares), β_{11} e β_{22} (efeitos quadráticos), β_{12} (efeito de interação).

A tabela de análise de variância (ANOVA) gerou os coeficientes de regressão e os termos individuais lineares, quadráticos e de interação foram determinados. A significância de todos os termos polinomiais foi julgada estatisticamente considerando o valor de F e a probabilidade $p = (0,05)$. Foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 5% ($p < 0,05$). A validade da equação quadrática obtida foi verificada em termos de coeficiente de determinação (R^2). Os coeficientes de regressão também foram usados para fazer os cálculos estatísticos e gerar os mapas de contornos a partir do modelo de regressão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA EXTRACELULAR

A capacidade de produção de lipase pela cepa do fungo filamentoso *Colletotrichum gloesporioides* foi avaliada em condições de fermentação submersa e fermentação em substrato sólido. Os parâmetros fermentativos mostrados na **Tabelas 5** são resultados dos estudos de cultivo submerso, em meio de cultura líquido (FSL), e de cultivo em substrato sólido (FSS). Em ambos, a atividade lipásica foi calculada por método titulométrico.

Tabela 5 - Parâmetros fermentativos do cultivo submerso (FSL), em frascos sob agitação, e do cultivo em substrato sólido (FSS) de *Colletotrichum gloesporioides*

Processo fermentativo	Tempo de cultivo	pH final	Atividade lipásica (U/mL)
FSL	72 horas	8,4	19,0 ^a
FSS	6 dias	-	7,0 ^b

^a valores médios de três ensaios, duas repetições.

^b valores médios de quatro ensaios, duas repetições.

Após o período de 72 horas de FSL, a massa micelial foi separada por filtração, e apresentou-se com coloração palha, aspecto amorfo e abundante. O filtrado obtido (caldo fermentado contendo a preparação bruta de lipase) encontrava-se ligeiramente turvo e amarelado. O aspecto do filtrado não estava de acordo com o verificado por COLEN (2006), que o descreveu como sendo límpido e com ausência de gotículas de óleo devido à exaustão do óleo de oliva. Portanto, a turbidez do filtrado, ao final das 72 horas de fermentação, pode indicar que o óleo presente no meio não foi totalmente hidrolisado ficando presente sob a forma de emulsão, e que a capacidade máxima de produção de lipase pelo fungo pode não ter sido alcançada.

Realmente, através da FSL, o valor de atividade lipásica obtido (19U/mL) foi menor que o encontrado por COLEN (2006) que, com a mesma composição do meio de cultura, com a mesma cepa e com o mesmo tempo de fermentação, alcançou 35,8U/mL. Entretanto,

apesar de a atividade lipásica de 19U/mL ter sido baixa, em comparação ao valor de 35,8U/mL, o pH final de 8,4 corresponde aos valores de pH encontrados, de acordo com este mesmo autor. O aumento do pH em questão pode, talvez, ser explicado pelo consumo de NO_3^- e de aminoácidos, pois ocorre, como decorrência, o consumo de íons H^+ .

Segundo COLEN (2006), as fontes orgânicas de nitrogênio funcionam como suprimentos de aminoácidos e fatores de crescimento. As peptonas, provavelmente as fontes de N orgânico mais usadas, são obtidas pela hidrólise enzimática de proteínas da carne, de caseína, de gelatina e de soja. As proteinases empregadas podem ser de vários tipos como pepsina, pancreatina, tripsina e papaína. Dependendo do tipo de proteína usada como substrato, e da enzima empregada, o produto resultante da proteólise apresentará composição diferenciada, não apenas quanto ao tamanho da cadeia carbônica (polipeptídeos, peptídeos menores e aminoácidos), mas também, quanto ao tipo e quantidade dos aminoácidos, apresentando os produtos, portanto, variações de composição tanto de natureza quantitativa como qualitativa. Diante disso, a peptona bacteriológica BIOBRÁS incorporada ao meio para a realização da FSL pode ter sido um dos fatores que influenciaram o resultado de atividade lipásica alcançado.

De acordo com EGGLI & ZIN (2003), as condições de cultivo influenciam fortemente a composição e desempenho metabólico das células microbianas, e ainda, segundo RIGO et al. (2010), espécies de fungos podem apresentar diferentes graus de produção, mesmo quando meios similares são usados. Diante disso, as condições aplicadas neste estudo de produção de lipase por *C. gloesporioides* podem, de algum modo, ter sido alteradas, seja por flutuação de temperatura durante a fermentação ou pelos reagentes utilizados.

Além disso, segundo SHELLEY et al. (1987), nem sempre as condições ótimas de temperatura de crescimento e de produção da enzima, para uma mesma cepa, são as mesmas. Os efeitos decorrentes de alterações das condições dos cultivos podem ser diferentes entre os microorganismos. ALFORD & STEINLE (1966), por exemplo, testaram 28 cepas de diferentes microorganismos frente a 36 condições diferentes. Apesar de ter sido detectada a atividade lipásica nos cultivos de todas as cepas em uma ou outra condição, nenhuma das condições permitiu a detecção da atividade em 100% das cepas testadas.

Ao final de 6 dias de FSS, as cascas de arroz utilizadas como suporte para crescimento encontravam-se cobertas por fungo filamentososo de cor branca. Após extração da enzima e separação da massa micelial por filtração, o filtrado (caldo fermentado contendo a preparação bruta de lipase) apresentava-se turvo e de cor âmbar. A turbidez do filtrado pode estar relacionada à presença do óleo de oliva junto ao caldo fermentado, mesmo após filtração, sob a forma de emulsão. Tal fato, mais uma vez, indica que o óleo presente no meio

não foi totalmente hidrolisado e que, provavelmente, a capacidade máxima de produção de lipase pelo fungo não foi alcançada. Porém, o não alcance da capacidade máxima de produção já era esperado, tal como relatado por COLEN (2006), que encontrou um valor de atividade lipásica cerca de 8 vezes menor na FSS, em comparação à atividade na FSL, utilizando a mesma cepa de *C. gloesporioides*.

Não foi detectada atividade lipásica nos frascos controles (que não receberam inóculo de suspensão de esporos) utilizados em ambos os processos fermentativos, indicando que não houve contaminação dos meios de cultura e que a lipase produzida nos frascos não-controles foi proveniente do microorganismo em estudo.

Na condição de FSL, a cepa de *C. gloesporioides* mostrou a maior atividade lipásica. Por isso, este processo fermentativo foi escolhido para os estudos posteriores de produção, concentração e aplicação de lipase.

5.2 EFEITO DA ESTOCAGEM DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE, EM DIFERENTES CONDIÇÕES, SOBRE A ATIVIDADE LIPÁSICA

O efeito da estocagem da preparação bruta de lipase produzida via FSL, em refrigerador, a 4°C, durante 40 dias, sobre a atividade lipásica, está mostrado na **Figura 9**. Como pode ser observado, houve uma queda progressiva da atividade lipásica que, ao final de 40 dias, era de 61% da atividade total inicialmente presente na preparação bruta de lipase. OLIVEIRA (2000) também detectou uma queda da atividade lipásica após estocar o caldo fermentado por *C. gloesporioides*, a 4°C. Entretanto, a queda foi menos acentuada, de forma que após 80 dias de armazenamento, a atividade chegou a 80% do valor inicial.

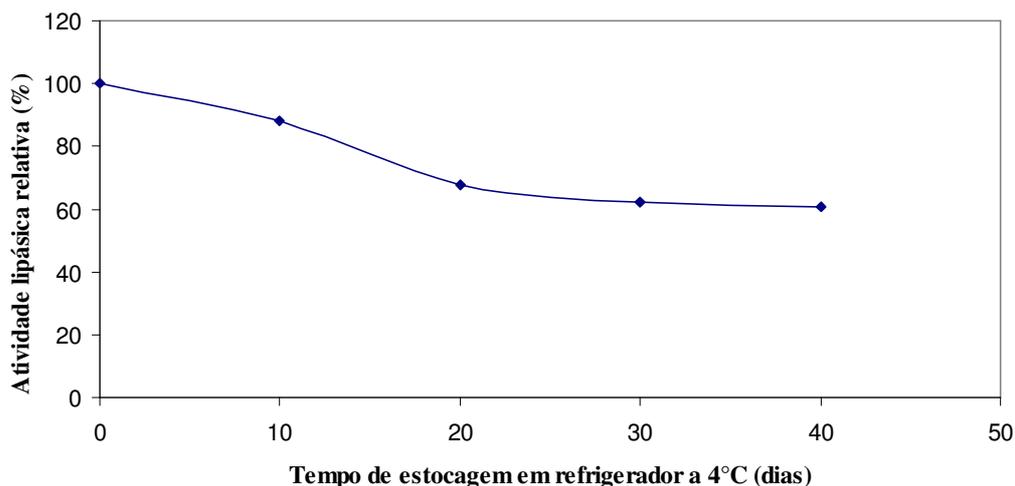


Figura 9 – Efeito do tempo de estocagem da preparação bruta de lipase, a 4°C, sobre a atividade lipásica. Atividade lipásica determinada por método titulométrico no primeiro dia, logo após a obtenção da preparação bruta de lipase, tomada como 100%.

Os resultados obtidos do estudo do efeito da estocagem da preparação bruta de lipase obtida via FSL, em *freezer* a -20°C, durante 40 dias, estão mostrados na **Figura 10**. Observa-se que também houve uma queda progressiva da atividade lipásica que, ao final de 40 dias, era de 84% da atividade total inicialmente presente na preparação bruta de lipase. Este resultado não está de acordo com o encontrado por OLIVEIRA (2000), cujo caldo fermentado, pela mesma espécie de fungo, ou seja, *C. gloesporioides*, estocado a -20°C não apresentou diminuição da atividade lipásica após 240 dias de armazenamento.

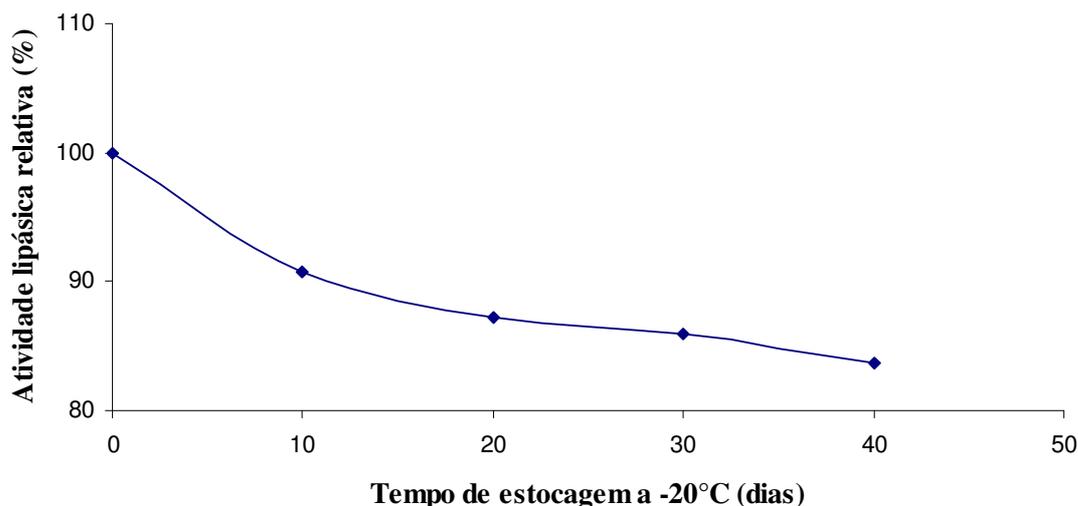


Figura 10 – Efeito do tempo de estocagem do caldo fermentado, a -20°C, sobre a atividade lipásica. Atividade lipásica determinada por método titulométrico no primeiro dia, logo após a obtenção da preparação bruta de lipase, tomada como 100%.

5.3 ANÁLISES SOBRE A PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE DESTINADA À CONCENTRAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO

5.3.1 Atividade lipásica por titulometria

Um novo processo de FSL foi executado, obtendo-se 954mL de preparação bruta de lipase, que foi submetida a uma série de análises antes de prosseguir nas etapas de concentração e liofilização. Os parâmetros fermentativos mostrados nas **Tabelas 6** são resultados dos estudos de cultivo submerso, em meio de cultura líquido (FSL).

Tabela 6 - Parâmetros fermentativos do cultivo submerso (FSL) de *Colletotrichum gloesporioides* em frascos sob agitação

Processo fermentativo	Tempo de cultivo (horas)	pH final ^a	Atividade lipásica (U/mL) ^a
FSL	72	8,4	19,2

^a valores médios de 3 ensaios.

5.3.2 Atividade lipásica por difusão em ágar

Além do método titulométrico, a medida dos halos de hidrólise formados em ágar contendo emulsão de óleo de oliva em álcool polivinílico, em presença de corante Azul Victoria (AEPV) e em ágar contendo tributirina emulsionada, em presença do mesmo corante (ATV), foi adequada para a detecção de atividade lipásica no caldo fermentado. Os resultados estão apresentados na **Tabela 7**.

A atividade lipásica pode ser detectada em placas de Petri, empregando-se um substrato lipídico incorporado ao gel de ágar que continha Azul Victória como corante indicador (que reage com os ácidos graxos do meio). Após incubação, a lipólise fez com que fosse formado um halo azul, região mais clara, ao redor dos poços escavados.

Tabela 7 – Detecção de atividade lipásica da preparação bruta de lipase obtida, via FSL, por ensaios em placas com géis de ágar alcalinos contendo tributirina ou emulsão de óleo de oliva como substratos

Tempo de incubação (horas)	Atividade lipásica	
	Diâmetro de halo em géis de ágar (mm)	
	Tributirina (ATV)	Emulsão óleo de oliva (AEPV)
24	7,5	9,8

^aForam dispensados 20µL da preparação bruta de lipase em cada poço.

^bOs resultados correspondem à média entre as medidas dos halos. Para cada meio foram preparadas 2 placas, cada qual contendo 4 poços.

Pode ser notado que ocorreu a detecção de atividade lipásica em ambos os géis de ágar ATV e AEPV. Resultado semelhante foi encontrado por OLIVEIRA (2000) que afirmou ter detectado igualmente bem a atividade lipásica utilizando os dois substratos em pH alcalino, após 48 horas de incubação. GONÇALVES (2007) também detectou atividade lipásica encontrando diâmetros muito próximos em ambos os meios alcalinos, utilizando lipases de três diferentes cepas de leveduras.

A tributirina é um substrato solúvel que, ao ser hidrolisado, gera dibutirina, monobutirina, glicerol e ácido butírico, todos eles solúveis em água. O substrato de tributirina tendo sido usado na forma de emulsão (preparado no ágar ainda fluido) permitiu a detecção de halo claro ao redor de outro halo de cor azul menos intensa, como pode ser observado nas **Figuras 11a e 11b**. Segundo THOMSON et al. (1999), os ácidos graxos livres de cadeia curta provenientes da hidrólise da tributirina, em razão de se difundirem mais, formam halo de tonalidade menos intensa.

Os diâmetros dos halos, em meio AEPV, foram maiores, indicando a presença de lipases que atuam sobre glicerídeos de cadeia longa (CARDENAS et al. 2001).

Como recomendado por JENSEN (1983) e SMITH & HAAS (1992), a detecção de atividade lipásica através do emprego de tributirina foi confirmada utilizando óleo de oliva (lipídio insolúvel) como substrato presente no meio AEPV. Esta confirmação se faz necessária, pois, segundo CARDENAS et al. (2001), apesar de ser econômica e de fácil preparo, a tributirina em ágar (ATV) não é um substrato adequado para detectar lipases verdadeiras, pois pode ser hidrolisada por outras esterases, também.

A verdadeira atividade lipásica pode ser constatada pelos halos de cor azul mais intensa formados nas placas de ágar contendo emulsão de óleo de oliva, em presença de corante Azul Victoria (AEPV) (**Figuras 11c e 11d**). A lipólise liberou ácidos graxos do óleo de oliva que provocaram diminuição do pH, alterando a coloração para azul, ficando mais intensa com o aumento da concentração de ácidos graxos livres. Ou ainda, segundo THOMSON et al. (1999), o aparecimento de halo com tonalidade intensa, pode ser devido aos ácidos graxos livres de cadeia longa obtidos a partir do óleo de oliva, que possuem solubilidade limitada em água.

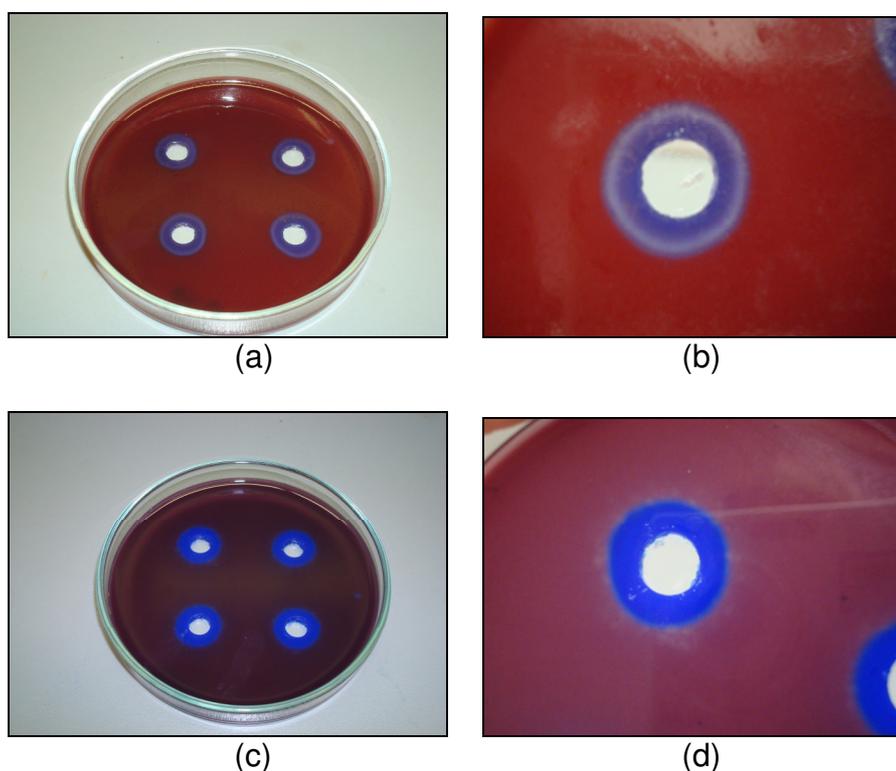


Figura 11 – Halos de hidrólise formados nos meios ATV e AEPV, após 24 horas de incubação. (a) Meio ATV com halos claros ao redor do halo escuro de cor azul. (b) Detalhe do halo formado no meio ATV. (c) Meio AEPV com halos de cor azul. (d) Detalhe do halo formado no meio AEPV.

São evidentes as vantagens do uso do método baseado na medida do halo de hidrólise, para detecção da atividade lipásica. Amostras de apenas 20 μ L da preparação bruta de lipase foram suficientes para formar halos de hidrólise bem visíveis, confirmando o observado por SANDOVAL & MARTY (2007), que consideram os ensaios em placa de Petri muito sensíveis, permitindo que seja realizada uma detecção direta, mesmo que haja uma baixa quantidade de lipase. Além disso, a técnica é econômica e de execução muito simples

e cômoda. O tempo de incubação de 24 horas, não causou nenhuma dificuldade na execução do trabalho.

5.3.3 Atividade proteásica qualitativa

O aspecto do meio de gelatina utilizado para a detecção de atividade proteásica, antes de receber a alíquota de preparação bruta de lipase, pode ser visto na **Figura 12a**. O aspecto foi o mesmo para ambos os valores de pH 7,0 e 8,0. Na **Figura 12b**, pode-se observar o aspecto do meio de gelatina contendo a alíquota da preparação bruta de lipase e logo após o período de incubação.

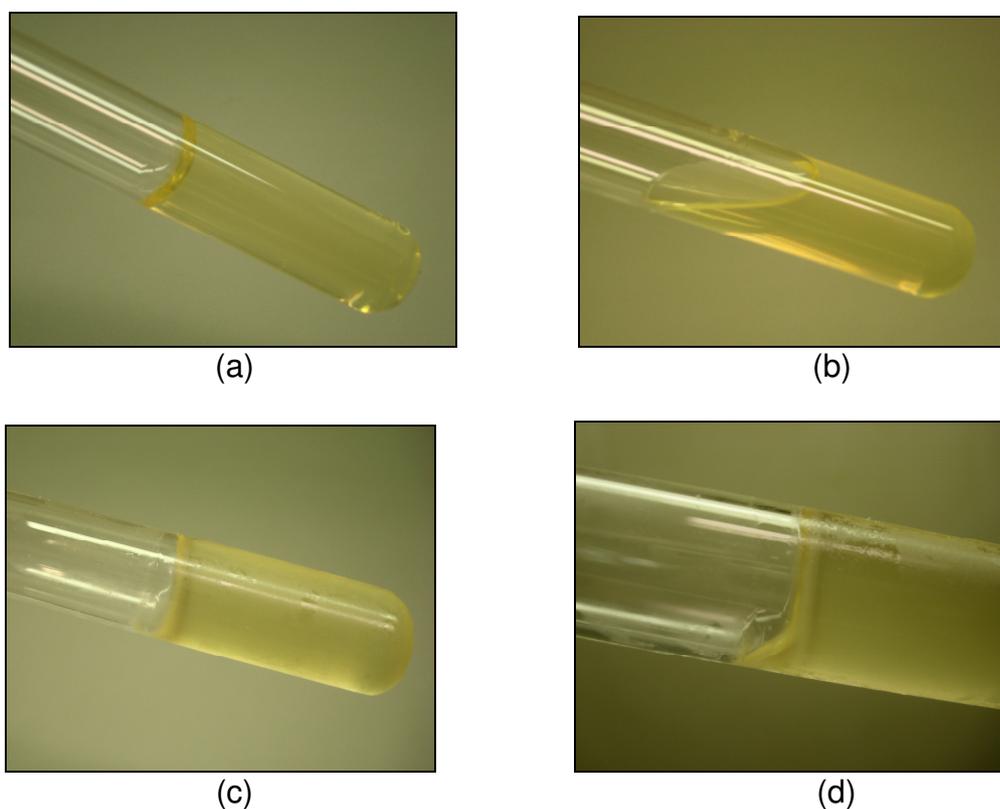


Figura 12 – Aspectos do meio de gelatina usado para detecção de atividade proteásica. (a) Meio de gelatina pH 7,0 ou 8,0 antes do período de incubação em estufa. (b) Meio de gelatina após o período de incubação em estufa. (c) Meio de gelatina pH 7,0 após incubação em estufa, seguido de banho de gelo. Hidrólise da gelatina não foi visualizada. (d) Meio de gelatina pH 8,0 após incubação em estufa, seguido de banho de gelo. Hidrólise da gelatina foi visualizada pela camada líquida sob o meio.

De acordo com PAPAGIANNI & MOO-YOUNG (2002), durante o crescimento fúngico para produção de lipases podem ser formadas proteases extracelulares ou, no caso de rompimento da hifa, pode ocorrer liberação de proteases intracelulares. A presença delas na preparação enzimática bruta pode dificultar o processo seguinte de recuperação da lipase e interferir na sua estabilidade. Dessa forma, o monitoramento da produção de protease é muito importante durante a produção de lipase por fermentação.

Não foi evidenciada atividade proteásica na preparação bruta de lipase através do teste sobre meio de gelatina em pH 7,0, ou seja, a superfície do meio não apresentou camada líquida de gelatina hidrolisada após o banho de gelo como pode ser observado na **Figura 12c**. Entretanto, a atividade proteásica ficou evidenciada pelo teste sobre meio de gelatina em pH 8,0, uma vez que houve a formação de camada líquida sob a superfície do meio, mesmo após o banho de gelo, indicando a presença de gelatina hidrolisada por enzimas proteolíticas (**Figura 12d**). Porém, deve ser ressaltado que sob a superfície do meio de gelatina pH 8,0, que apresentou resultado positivo para atividade proteásica, houve um pequeno crescimento de fungo filamentososo após o período de incubação.

O resultado, indicando a detecção de atividade proteásica na preparação bruta de lipase em meio de gelatina de pH 8,0, está em desacordo com COLEN (2006) que, através da técnica de difusão da enzima e formação de halo de proteólise em gel de ágar bacteriológico (com leite em pó desnatado, reconstituído e incorporado, e em pH 8,0), não evidenciou atividade proteásica no caldo fermentado durante 72 horas, após 24 horas de incubação. OLIVEIRA (2000) também não detectou atividade proteásica em caldo fermentado por *C. gloesporioides*, utilizando meio de gelatina em pH 7,0 e 8,0.

Nos tubos controles, em que se dispensaram alíquotas dos frascos que não foram inoculados de suspensão de esporos, não foi detectada atividade lipásica, nem em pH 7,0 e nem em pH 8,0.

5.3.4 Atividade proteásica quantitativa

Através do método colorimétrico, utilizando azocaseína como substrato, não foi evidenciada atividade proteásica na preparação bruta de lipase. Tal fato contradiz o resultado positivo, para a pesquisa de atividade proteásica, encontrado no experimento com meio de gelatina em pH 8,0, no qual ocorreu a presença de uma camada líquida sob sua superfície. Entretanto, como ressaltado no item 5.3.3, houve um pequeno crescimento de fungo filamentososo sob a superfície deste mesmo meio de gelatina hidrolisado, após o tempo

de incubação. Diante disso, e de resultados negativos para a pesquisa de atividade proteásica encontrados por outros autores, é possível que a hidrólise do meio de gelatina em pH 8,0 tenha ocorrido devido à produção de proteases pelo fungo filamentosso que cresceu sob sua superfície, pois, caso contrário, deveria ter sido quantificada atividade proteásica no caldo fermentado através do método colorimétrico.

5.3.5 Concentração de proteínas e atividade específica

Foi obtido uma concentração de proteínas de 0,11mg/mL, na preparação bruta de lipase, alcançando, portanto, uma atividade lipásica específica de 174,5U/mg de proteína. A massa total de proteínas presentes no caldo fermentado foi de 100,5mg (partindo de um volume de 914,0mL de preparação bruta). Estes resultados estão apresentados na **Tabela 8**.

O método escolhido para dosar a concentração de proteínas nas amostras durante a realização desta pesquisa foi a medida de absorvância em 280nm, segundo GROVES et al. (1968, citado por PETERSON, 1983), pelos seguintes motivos:

a) Este método é não destrutivo, ou seja, a amostra analisada pode ser reutilizada em outras análises. Dessa forma, não houve perda de volume de preparação bruta contendo a enzima ao dosar proteínas, fato muito importante, uma vez que seria obtida uma maior quantidade de enzima concentrada na etapa seguinte, para dar continuidade aos experimentos.

b) Outros métodos, como o de Lowry e o do Biureto, não puderam ser empregados, já que as amostras submetidas às análises poderiam conter interferentes para os dois métodos, tal como óleo, que causariam turbidez na amostra, com conseqüente aumento da absorção, além de serem métodos destrutivos (ZAIA et al., 1998).

5.4 CONCENTRAÇÃO DA PREPARAÇÃO BRUTA DE LIPASE POR ULTRAFILTRAÇÃO

Foram submetidos 900mL de preparação bruta de lipase ao tratamento de concentração, em membrana de ultrafiltração, com corte de peso molecular acima de 10KDa, e fluxo tangencial. O processo de ultrafiltração originou duas frações: a fração retida (preparação lipásica concentrada) e a fração permeada. Ao final da ultrafiltração, a fração

retida ou preparação lipásica concentrada apresentou um volume de 20mL, ou seja, a preparação bruta de lipase foi concentrada 45 vezes.

5.4.1 Atividade lipásica por titulometria

Foram recuperados 81% da atividade lipásica original, encontrando-se um valor de atividade de 709U/mL na fração retida (**Tabela 8**). A perda de atividade lipásica ocorrida no processo foi, portanto, de 19%. Estes resultados mostram uma boa recuperação da atividade lipásica na preparação lipásica concentrada. A pequena perda de atividade pode ser atribuída, primeiramente, à adsorção, como resultado da interação entre os resíduos de aminoácidos presentes na enzima com os grupos do material da membrana, ou também, devido à força de cisalhamento gerada durante o processo de ultrafiltração, em que as moléculas absorveram energia suficiente para quebrarem as ligações químicas (KRSTIC et al., 2007; SONG et al., 2007).

Tabela 8 – Resumo das análises sobre as diferentes preparações lipásicas de *Colletotrichum gloesporioides*

Etapa	Ativ. lipásica	Proteína total (mg)	Ativ. específica (U/mg proteína)	Fator de concentração	Recuperação (%)
Prep. bruta de lipase ^a	19,2U/mL	100,5	174,5	1	100
Prep. lipásica concentrada ^b (Ultrafiltração)	709U/mL	54,0	262,6	1,5	81
Prep. lipásica liofilizada ^c (Liofilização)	75U/mg	45,3	3750,0	-	-

^aVolume de 914,0mL

^bVolume de 20,0mL

^cMassa de 2,2628g

Estes resultados estão de acordo com SZTAJER et al. (1992) que recuperaram 85% de atividade lipásica na fração retida por ultrafiltração tangencial a partir do caldo fermentado por *Penicillium simplissimum*. KOJIMA & SHIMIZU (2003) alcançaram uma recuperação de 70% de atividade lipásica, após concentração do caldo fermentado por *Pseudomonas*

fluorescens por ultrafiltração perpendicular, com membrana de 6KDa de limite de exclusão. E após ultrafiltração perpendicular, com membrana de peso de corte de 10KDa, HIOL et al (1999) recuperaram 98% de atividade lipásica na fração concentrada por 20 vezes do caldo fermentado por *Mucor hiemalis f. hiemalis*.

Diferentemente, OLIVEIRA (2000) observou uma perda de 76% da atividade lipásica quando concentrou o caldo de cultura fermentado pela mesma espécie de microorganismo, ou seja, por *C. gloesporioides*, por ultrafiltração. STOCKLEIN et al. (1993) observaram uma perda de 70% da atividade lipásica ao concentrarem o caldo de cultura fermentado por *Penicillium expansum*. Entretanto, vale ressaltar que ambos os autores utilizaram ultrafiltração perpendicular que favorece o fenômeno da polarização por concentração, prejudicando a concentração da enzima. CASTRO-OCHOA et al. (2005) obtiveram 100% de recuperação da atividade lipásica após concentrarem 2 vezes, por ultrafiltração tangencial, o caldo fermentado por *Bacillus thermoleovorans*, apesar de terem utilizado uma membrana de 50KDa de peso de corte. Porém, quando concentraram frações ativas da enzima obtidas por etapas cromatográficas, com membrana de 10KDa, alcançaram apenas 27% de recuperação da atividade lipásica.

A fração permeada não apresentou atividade lipásica, indicando que toda a enzima presente no caldo de cultura fermentado ficou retida na fração concentrada pelo processo de ultrafiltração. Resultado semelhante foi obtido por SONG et al. (2007). Estes autores também detectaram 100% de retenção da lipase por membrana hidrofílica de peso de corte de 50KDa, utilizada no processo de ultrafiltração.

5.4.2 Atividade lipásica por difusão em ágar

A partir da diluição de um determinado volume da fração retida para chegar a uma concentração de lipase correspondente à original da preparação bruta de lipase (ou seja, diluição de 45 vezes) foi feita a detecção da atividade lipásica por difusão em ágar. Os resultados indicam uma correspondência entre as medidas dos halos em géis ATV e AEPV obtidas a partir do caldo fermentado (**Tabela 7**) e a partir da fração retida diluída à concentração original (**Tabela 9**). As medidas dos halos obtidas foram pouco menores em ambos os meios, o que de fato já era esperado, visto que a enzima não foi recuperada em sua totalidade após a ultrafiltração, quando alcançou um total de 81% de recuperação.

Tabela 9 – Detecção de atividade lipásica da fração retida, após ultrafiltração, e diluída, por ensaios em placas com géis de ágar alcalinos contendo tributirina ou emulsão de óleo de oliva como substratos

	Tempo de incubação (horas)	Atividade lipásica	
		Diâmetro de halo em géis de ágar (mm) ^{b,c}	
		Tributirina (ATV)	Emulsão óleo de oliva (AEPV)
Fração retida diluída ^a	24	6,5	9

^aDiluída à concentração original (45x).

^bForam dispensados 20µL da fração retida diluída em cada poço.

^dOs resultados correspondem à média entre as medidas dos halos. Para cada meio foram preparadas 2 placas, cada qual contendo 4 poços.

Pelo fato de a fração permeada não ter apresentado atividade lipásica por método titulométrico, não foi realizada a detecção de atividade lipásica por difusão em ágar.

5.4.3 Concentração de proteínas e atividade específica

A concentração de proteínas na fração retida, ou na preparação lipásica concentrada, foi de 2,7mg/mL, alcançando, portanto, uma atividade lipásica específica de 262,6U/mg de proteína. Enquanto que, no permeado, foi obtida uma concentração de proteínas de 0,05mg/mL. A massa total de proteínas presentes na fração permeada foi de 54mg. A concentração por ultrafiltração proporcionou um fator de concentração de 1,5 vezes em relação à preparação bruta de lipase, como apresentado no resumo da **Tabela 8**.

Resultados semelhantes foram obtidos por HIOL et al. (1999) que alcançaram um valor 3,5 vezes maior de atividade lipásica específica na fração retida por ultrafiltração, em relação ao caldo fermentado por *Mucor hiemalis f. hiemalis*. CASTRO-OCHOA et al. (2005), concentrando caldo fermentado por *Bacillus thermoleovorans* por ultrafiltração, obtiveram um fator de purificação de 6 vezes. No trabalho de KOJIMA & SHIMIZU (2003), não houve fator de purificação após etapa de concentração por ultrafiltração, uma vez que a atividade específica permaneceu a mesma. A utilização do método de dosagem de proteínas por absorvância a 280nm está de acordo com SONG et al. (2007), que dosaram a concentração

de lipases, como proteínas, nas frações retida e permeada por ultrafiltração, utilizando esta mesma técnica.

5.5 LIOFILIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO LIPÁSICA CONCENTRADA

5.5.1 Atividade lipásica por titulometria

A preparação lipásica após a liofilização apresentava-se como pó em tom palha e muito higroscópico. Ao todo, uma massa de 2,2628g de preparação lipásica liofilizada foi obtida, apresentando 75U/mg de pó liofilizado, como atividade lipásica.

5.5.2 Atividade lipásica por difusão

A partir da preparação lipásica reconstituída, obtida como descrito em material e métodos, foi feita a detecção da atividade lipásica por difusão em ágar. Os resultados estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Detecção de atividade lipásica da fração liofilizada reconstituída, por ensaios em placas com géis de ágar alcalinos contendo tributirina ou emulsão de óleo de oliva como substratos

Tempo de incubação (horas)	Atividade lipásica	
	Diâmetro de halo em géis de ágar (mm)	
	Tributirina (ATV)	Emulsão óleo de oliva (AEPV)
24	2	6

5.5.3 Concentração de proteínas e atividade específica

A concentração de proteínas, na preparação liofilizada, foi de 0,02mg de proteína/mg de pó liofilizado, alcançando, portanto, uma atividade lipásica específica de 3.750U/mg de proteína. A massa total de proteínas presentes foi de 45,3mg. Tais resultados encontram-se resumidos na **Tabela 8**.

5.6 EFEITO DA ESTOCAGEM DA PREPARAÇÃO LIPÁSICA LIOFILIZADA, A 4°C, SOBRE A ATIVIDADE LIPÁSICA

O efeito da estocagem da preparação lipásica liofilizada em refrigerador, a 4°C, durante 80 dias, sobre a atividade lipásica, está mostrado na **Figura 13**. Como pode ser observado, houve uma queda de 10% da atividade lipásica após 10 dias de estocagem, quando, a partir daí, permaneceu estável até o final dos 80 dias. A queda inicial da atividade lipásica pode ter ocorrido pela adsorção da lipase, uma proteína, à superfície do vidro do frasco tipo penicilina onde a enzima liofilizada ficou armazenada (comunicação pessoal, G.A. Ramaldes, FAFAR/UFMG, 2010). Segundo PITOMBO (2005) e BON et al. (2008^b), produtos liofilizados possuem boa estabilidade durante o armazenamento, além de terem modificações físico-químicas e perda de atividade diminuídas ou inibidas, o que resultou na manutenção da atividade lipásica após os 10 primeiros dias até o final dos 80 dias estudados. Além disso, a liofilização inibe o crescimento microbiano por reduzir a disponibilidade de água.

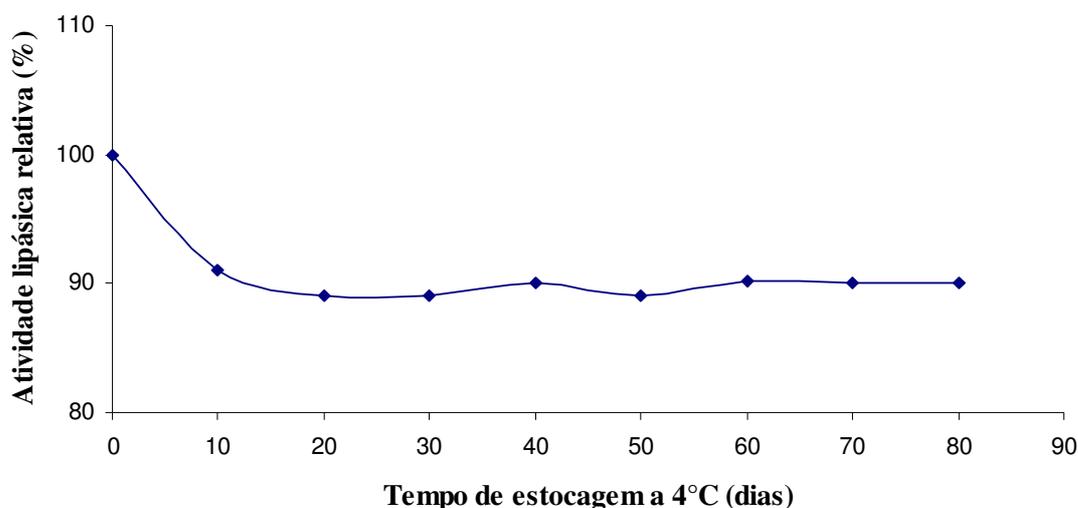


Figura 13 – Efeito do tempo de estocagem, a 4°C, sobre a atividade lipásica da preparação liofilizada de lipase. Atividade lipásica determinada por método titulométrico no primeiro dia, logo após a obtenção da preparação lipásica liofilizada, tomada como 100%.

5.7 ENSAIOS PRELIMINARES ACERCA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE OLIVA

Os valores experimentais para o grau de hidrólise do óleo de oliva sob diferentes condições de concentração de enzima e tempo de hidrólise estão apresentados na **Tabela 11**. Os cálculos realizados para a determinação do grau de hidrólise do óleo de oliva encontram-se no **Apêndice A**.

Tabela 11 – DCCR para a hidrólise enzimática e grau de hidrólise

Ensaio n°	Tempo (horas)	Concentração enzimática (U/25mL)	Variáveis Codificadas		Y ^c
			X ₁ ^a	X ₂ ^b	
1	6	65	-1	-1	25,4
2	26	65	1	-1	25,1
3	6	265	-1	1	41,1
4	26	265	1	1	43,3
5	2	165	-1,414	0	25,6
6	30	165	1,414	0	42,3
7	16	24	0	-1,414	18,8
8	16	306	0	1,414	43,7
9	16	165	0	0	34,4
10	16	165	0	0	36,2
11	16	165	0	0	34,1
12	16	165	0	0	36,3

^aTempo (horas)

^bConcentração de enzima (U/25mL)

^cGrau de hidrólise (%)

Com os resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na **Tabela 12**. Com exceção do termo quadrático do tempo (x_1^2), do termo quadrático da concentração (x_2^2), e da interação tempo e concentração (x_1x_2), todos os parâmetros do modelo foram altamente significativos a 5% de probabilidade, como pode ser observado na **Figura 14**.

Tabela 12 – Coeficiente de regressão para a resposta (Y)

Interações	Coeficiente de regressão	Erro padrão	p - valor
Constante	35,246	1,658	0,000
X ₁	3,190	1,174	0,034
x ₂	8,651	1,174	0,000

O modelo matemático empírico codificado encontrado, está apresentado na **Equação 17**.

$$y = 35,25 + 3,19x_1 + 8,65x_2 \quad (17)$$

Este modelo foi obtido a partir da regressão linear múltipla (modelo quadrático) dos dados experimentais. Nenhum ensaio teve que ser abandonado para que o modelo fosse ajustado.

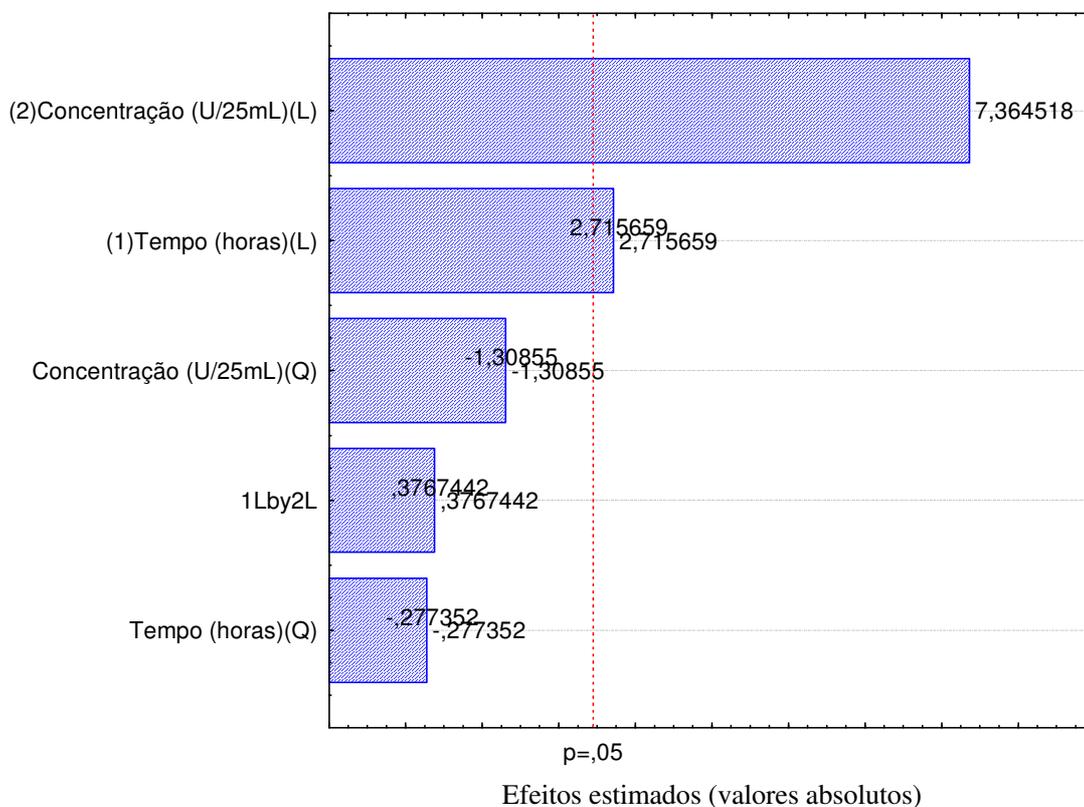


Figura 14 – Diagrama de Pareto.

Na **Tabela 13**, estão apresentados os resultados da Análise de Variância (ANOVA). Como F_{calc} para a regressão é significativo e a porcentagem de variação (R^2) pelo modelo foi boa, cerca de 90%, então, o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. A variação da resposta (R^2) indica o coeficiente de determinação da regressão efetuada. O valor obtido mostra que cerca de 90% dos pontos se ajustam ao modelo, demonstrando ser bom o ajustamento do modelo aos dados experimentais.

Uma boa variação de resposta também foi encontrada por OLIVEIRA et al. (1999), que alcançaram um valor de 87,8% para o R^2 ao realizarem o DCCR para a hidrólise parcial da gordura de babaçu por lipase comercial (*Rhizopus* sp.), trabalhando como variáveis independentes, a concentração de enzima (3 a 327U/mL) e o tempo de reação (1 a 31 horas), e como variável dependente, o grau de hidrólise (%).

Tabela 13 – ANOVA para a resposta y

Fontes de variação	Soma Quadrática SQ	Graus de liberdade	Quadrados Médios QM	F _{calc}	p-valor
Regressão	678,24	2	339,12	35,30	0,0001
Resíduos	86,47	9	9,61		
Total	764,71	11	69,52		

A **Tabela 14** apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo para o grau de hidrólise, os desvios e os desvios relativos para cada ensaio do DCCR. Pode-se observar que os desvios foram baixos na região estudada.

Tabela 14 – Valores experimentais e valores estimados de grau de hidrólise do óleo de oliva

Ensaio	Resposta experimental (Y)	Resposta prevista (y)	Desvio	Desvio relativo (%)
1	25,40	21,94	3,46	13,6
2	25,10	27,07	-1,97	-7,9
3	41,10	37,99	3,11	7,6
4	43,30	45,63	-2,33	-5,4
5	25,60	30,02	-4,42	-17,3
6	42,30	39,02	3,28	7,8
7	18,80	19,62	-0,82	-4,4
8	43,70	44,02	-0,32	-0,7
9	34,40	35,25	-0,85	-2,5
10	36,20	35,25	0,95	2,6
11	34,10	35,25	-1,15	-3,4
12	36,30	35,25	1,05	2,9

Na **Figura 15**, observa-se uma distribuição aleatória entre os resíduos dos ensaios, sugerindo resíduos independentes. E a **Figura 16** mostra que as especificações do modelo estão satisfeitas.

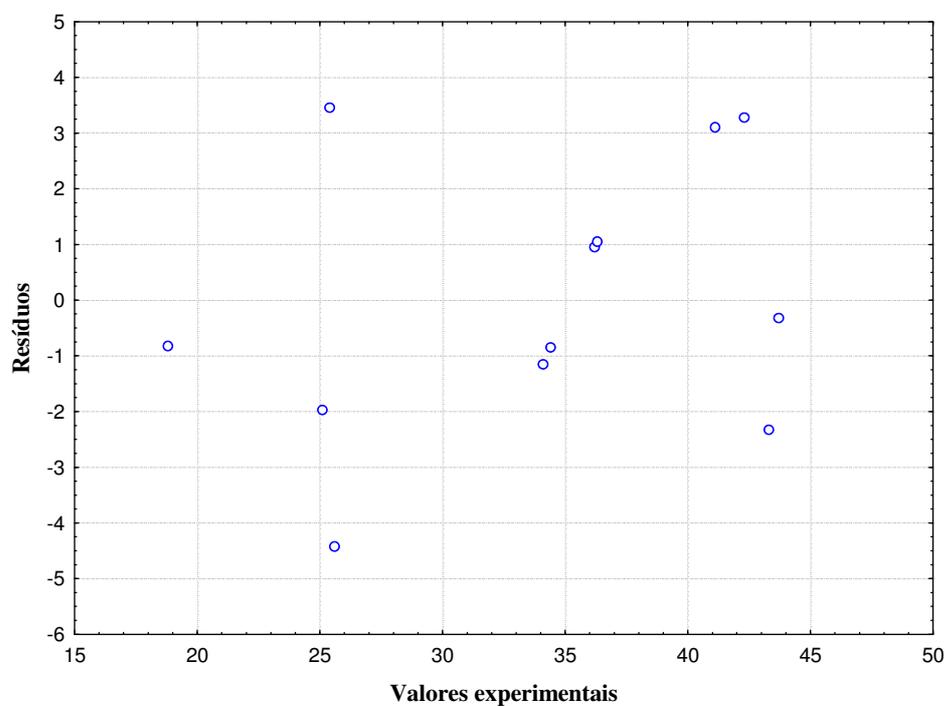


Figura 15 – Valores experimentais versus resíduos.

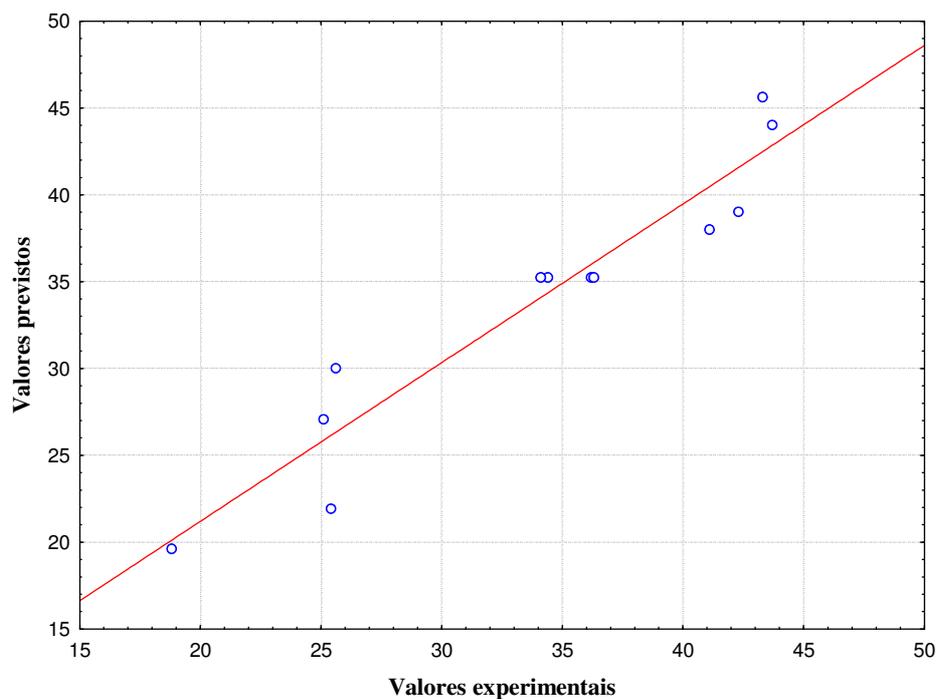


Figura 16 – Valores previstos versus valores experimentais.

5.7.1 Efeito da concentração de enzima e do tempo, no grau de hidrólise

As superfícies de resposta (**Figura 17**) e linhas de contorno (**Figura 18**) gerados através do modelo válido (**Equação 17**) mostram a representação tri e bi-direcional, respectivamente, da relação entre variável resposta (grau de hidrólise) e as variáveis independentes codificadas, tempo de reação e concentração de enzima.

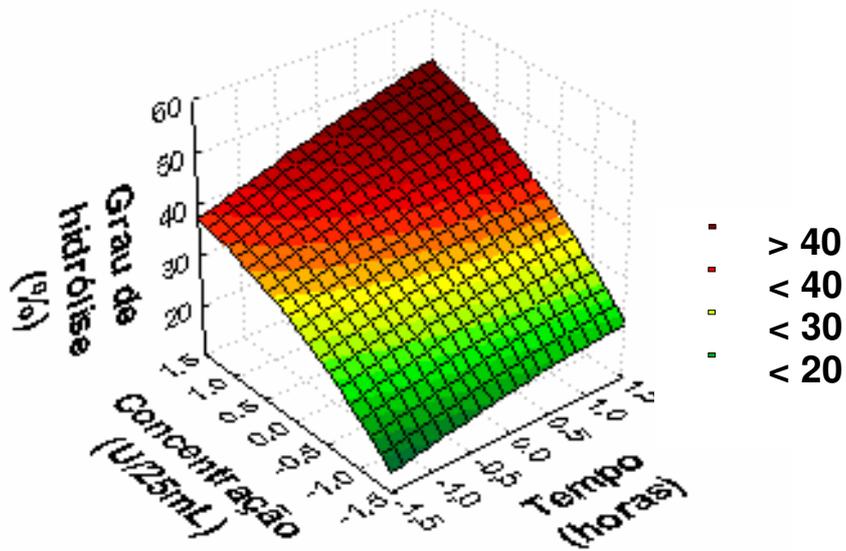


Figura 17 – Superfície de resposta para a hidrólise enzimática do óleo de oliva (escalas de tempo e concentração de enzima em valores codificados).

Os termos lineares, concentração de enzimas e tempo de reação, têm um efeito positivo no grau de hidrólise ($p < 0,05$), como pode ser observado no gráfico de superfície de resposta, na **Figura 17**. O grau de hidrólise foi aumentado com o acréscimo na concentração de enzima e no tempo. Com um tempo de reação de 16 horas e concentração de enzima de 306U/25mL o maior grau de hidrólise foi obtido (aproximadamente 43,7%). Entretanto, não houve diferença significativa entre o maior grau de hidrólise (43,7%) e o obtido com 26 horas e 265U/mL (43,3%). Dessa forma, opta-se pela condição mais vantajosa, que, neste caso, foi considerada a de menor tempo de reação.

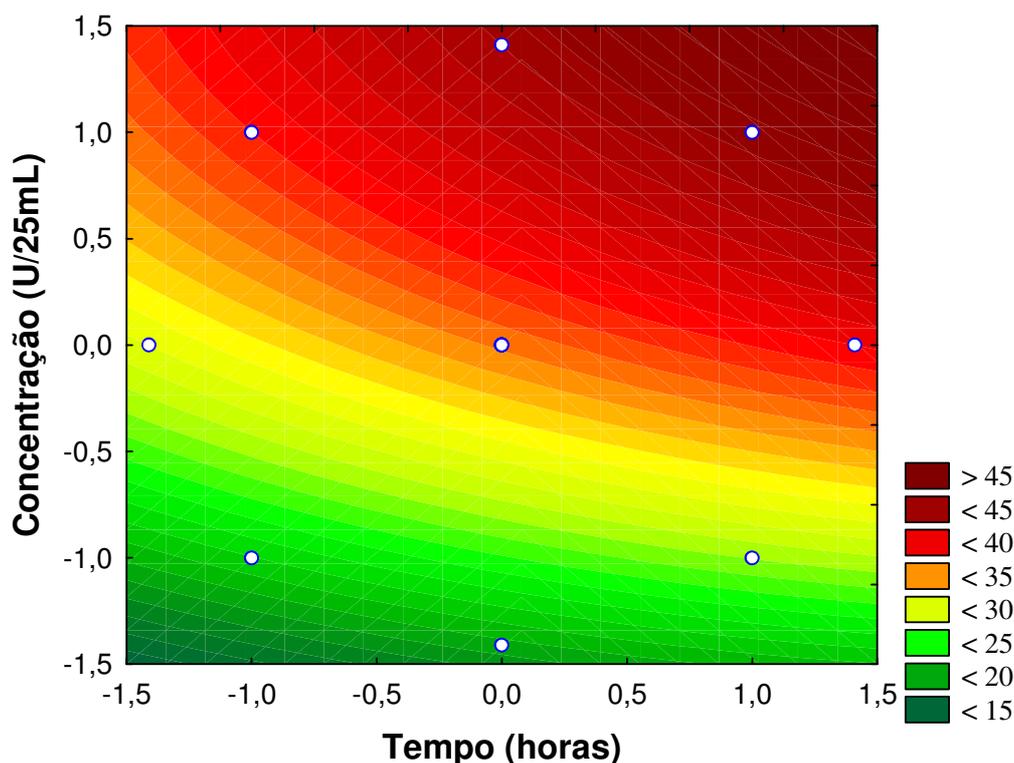


Figura 18 – Gráfico de contornos para a hidrólise enzimática do óleo de oliva (escalas de tempo e concentração de enzima em valores codificados).

O grau de conversão alcançado se aproximou do resultado apresentado por OLIVEIRA et al. (1999), cujos pontos centrais utilizados serviram de referência para este trabalho (ver item 4.9). Estes autores alcançaram o máximo de 41,44%, na hidrólise parcial de gordura de babaçu por lipase comercial, trabalhando como variáveis independentes, a concentração de enzima (3 a 327U/mL) e o tempo de reação (1 a 31 horas). SONG et al (2007) estudando a hidrólise do óleo de oliva por lipase de *C. rugosa*, alcançaram 37% de conversão, após 12 horas de reação, a 30 °C, na concentração de enzima de 2mg/mL. ZAREVUCKA et al. (2003), visando o enriquecimento de ácidos ômega por hidrólise enzimática do óleo de groselha preta por lipase de *Mucor miehei* e *Pseudomonas fluorescens*, alcançaram respectivamente 55 e 65% de conversão, a 40 °C por 24 horas e 90U/mL de concentração.

Segundo DRAVANOV & KHALAMEIZER (1997), a ação de lipases é regulada por numerosos fatores externos. Diante disso, as variações entre as condições nas quais as reações de hidrólise se desenvolvem, culminam em diferentes graus de conversão.

Para confirmar a escolha da combinação tempo e concentração mais vantajosa, três novas análises foram realizadas nas condições de 16 horas e 306U/25mL ($X_1= 0$ e $X_2= +1,41$). O grau de conversão médio não diferiu ($p < 0,05$) do grau de hidrólise que havia sido encontrado através do ensaio 8 (resultados não mostrados).

Não foi possível obter o ponto ótimo, ou seja, o maior grau de hidrólise, no menor tempo de reação, com a menor concentração da enzima, visto que o planejamento experimental não cobriu esta faixa. Teoricamente, de acordo com a superfície de resposta, com um tempo e concentração próximos de 30 horas ($X_1 = +1,41$) e 306U/25MI ($X_2 = +1,41$), respectivamente, o grau de hidrólise estaria próximo a 60%. Portanto, dando continuidade à otimização, o deslocamento deveria ser realizado para uma nova região experimental, tendo os valores de 26 horas e 265U/25mL como pontos centrais. Como ressaltado no item 4.9, a região experimental avaliada foi baseada no trabalho de OLIVEIRA et al. (1999), que também não atingiram o ponto ótimo, quando avaliaram a influência do tempo e da concentração no grau de hidrólise da gordura de babaçu, empregando lipase comercial.

Conforme as condições utilizadas no processamento de hidrólise enzimática do óleo de oliva, o grau de hidrólise variou de 18,8 a 43,7%, havendo um aumento no grau de hidrólise de, aproximadamente, 57%.

5.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA

Na **Tabela 15**, são apresentados os resultados das caracterizações do teor de umidade, índice de acidez, índice de saponificação, índice de peróxidos, e índice de iodo do óleo da amêndoa da macaúba.

Os resultados foram obtidos a partir de análises de três amostras de um único lote do óleo da amêndoa da macaúba. Todas as características físico-químicas avaliadas, em cada amostra, foram realizadas em triplicata. Os valores encontrados para uma mesma característica físico-química, nas três amostras, não diferiram entre si a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), conforme apresentado no **Apêndice B**. Dessa forma, na **Tabela 15**, estão apresentados os resultados referentes à média entre os valores obtidos nas três amostras.

As amostras do óleo apresentaram 0,47% de umidade, valor maior que o encontrado por AMARAL (2007), que foi 0,27%, porém utilizando outro método de determinação, o método de Karl Fischer. Apesar de o método para determinação do teor de umidade em óleos preconizado por IAL (2005) ser o de perda por dessecação em estufa a 105 °C, este método não remove somente água, mas também outras substâncias que se volatilizam nessas condições. Enquanto que o método de Karl Fischer exclui a influência da umidade do ar e fornece condições para uma titulação cujo ponto final é bem determinado. Talvez, a escolha

do método justifique o teor de umidade mais elevado encontrado nas amostras do óleo da amêndoa.

Segundo, HIANE et al. (2005), o índice de acidez pode indicar maneiras impróprias de colheita, amadurecimento e armazenamento dos frutos da macaúba, presença de água e enzimas, além de processos insatisfatórios de extração, que podem levar à quebra de glicerídeos com aumento de ácidos graxos livres, podendo levar à oxidação do óleo. O valor de 12,1% encontrado para o índice de acidez está de acordo com o observado por AMARAL (2007) que alcançou 12,8%, e pode ser considerado alto quando comparado ao índice relatado por HIANE et al. (2005) que foi de apenas 0,21%, no óleo da amêndoa. Porém, segundo RODRIGUES (2007), a acidez de um óleo ou gordura é uma característica muito variável, como pode ser observado por este mesmo autor que encontrou uma faixa de índice de acidez entre 0,5 e 9% para amostras do óleo da amêndoa da macaúba.

Tabela 15 – Caracterização físico-química do óleo da amêndoa da macaúba

Características	Óleo da amêndoa da macaúba^a
Umidade (%)	0,47
Índice de saponificação (mg KOH g _{óleo} ⁻¹)	241,4
Índice de peróxido (meq Kg _{óleo} ⁻¹)	3,94
Índice de acidez (% m/m)	12,1
Índice de iodo (g I ₂ 100 g _{óleo} ⁻¹)	31,10

^aMédia dos valores obtidos a partir de três amostras de um único lote do óleo da amêndoa da macaúba. Cada amostra foi analisada em triplicata.

O índice de peróxido, assim como a acidez de um óleo ou gordura, também é uma característica muito variável, e está diretamente relacionado ao seu estado de conservação, uma vez que são formados durante o processo de autooxidação.

O processo de autooxidação e a resultante deterioração são, frequentemente, descritos pelo termo rancificação. Usualmente, rancificação refere-se à deterioração oxidativa, mas na verdade, rancificação refere-se às alterações hidrolíticas resultantes de atividade enzimática (deMAN, 1999). As insaturações presentes nos óleos e gorduras são centros ativos que, entre outras coisas, podem reagir com o oxigênio. Esta reação culmina na formação de produtos de oxidação que podem tornar o óleo ou a gordura impróprios para o consumo. Pelo

fato de sua determinação ser relativamente fácil, os peróxidos são frequentemente usados para mensurar o progresso da oxidação em óleos e gorduras. Os peróxidos podem ser formados durante o processo de obtenção do óleo ou durante seu armazenamento, através da autooxidação que é favorecida pela presença de oxigênio, pelo grau de insaturação dos lipídeos, pela presença de pró-oxidantes como lipooxidasas, pela exposição à luz e pela temperatura de armazenamento.

O índice de peróxido de $3,94\text{meq/Kg}_{\text{óleo}}$ demonstra-se satisfatório, segundo BRASIL (2005), uma vez que o intervalo de índice de peróxido estabelecido para óleos prensados a frio e não refinados deve ser menor que $15\text{meq/Kg}_{\text{óleo}}$. Dessa forma, pode-se considerar que as amostras do óleo da amêndoa da macaúba estavam bem conservadas. Amostras de óleo da amêndoa bem conservadas também foram descritas por HIANE et al. (2005), os quais não detectaram formação de peróxidos nas amostras, e por RODRIGUES (2007) que encontrou $8\text{meq/Kg}_{\text{óleo}}$ como índice de peróxido. Enquanto, AMARAL (2007) alcançou um valor de $15,28\text{meq/Kg}_{\text{óleo}}$. Entretanto, deve-se ter a cautela de considerar que a ausência ou baixo nível de peróxido não indicam necessariamente que o óleo não tenha sofrido reações de oxidação, uma vez que a determinação pode ocorrer no período de decomposição dos peróxidos, que são instáveis e podem ser transformados em produtos secundários.

O índice de iodo encontrado para o óleo da amêndoa de $31,10\text{g I}_2/100\text{g}_{\text{óleo}}$, foi muito próximo aos valores relatados por AMARAL (2007) e RODRIGUES (2007), que alcançaram $28,68$ e $32\text{g I}_2/100\text{g}_{\text{óleo}}$, respectivamente. O índice de iodo foi maior que o verificado para o óleo de palmiste, por exemplo, que é também obtido da amêndoa do fruto do dendê, que foi de $18,9\text{g I}_2/100\text{g}_{\text{óleo}}$ (BORA et al., 2003). Este índice representa a massa de iodo consumida pelas insaturações presentes nas cadeias carbônicas dos ácidos graxos. Assim, quanto maior o número de insaturações, maior é a quantidade de iodo consumida. Este resultado confirma a elevada composição de ácidos graxos saturados que pode chegar a $49,7\%$ do total de ácidos graxos (HIANE et al., 2005). Dentre os ácidos graxos de cadeia saturada, o ácido láurico atinge até 48% , segundo AMAYA-FARFAN (1986) e AMARAL (2007). Por outro lado, o índice de iodo de $31,10$, determinado nas amostras do óleo da amêndoa da macaúba, está em desacordo com o encontrado por HIANE et al. (2005) que atingiu o valor de $54,05\text{g I}_2/100\text{g}_{\text{óleo}}$, o que indica um maior número de insaturações nos ácidos graxos presentes. O maior número de insaturações e o aumento do índice de iodo verificado por estes autores puderam realmente ser confirmados pelo teor encontrado de ácido oléico ($40,17\%$), um ácido graxo monoinsaturado, que, surpreendentemente, superou o teor de ácido láurico ($12,95\%$).

O índice de saponificação de $241,4\text{ mg KOH/g}_{\text{óleo}}$ encontrado nas amostras do óleo está de acordo com HIANE et al. (2005), que alcançaram 259 , mas em desacordo com

AMARAL (2007), que por sua vez, encontrou um valor de 308. Considerando que, segundo HIANE et al. (2005), o índice de saponificação de óleos de refino deve estar compreendido entre 181 e 265mg KOH/g_{óleo}, o resultado encontrado (241,4) garante a conformidade das amostras do óleo da amêndoa, quanto ao índice de saponificação.

5.9 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA

A evolução da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba foi acompanhada no intervalo de 0 a 48 horas como apresentado na **Figura 19**. A concentração da enzima foi mantida em 306U/25mL, determinada a partir da combinação de tempo e concentração de enzima escolhida como a mais vantajosa, de acordo com o item 5.7. O cálculo do grau de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba está descrito no **APÊNDICE C**.

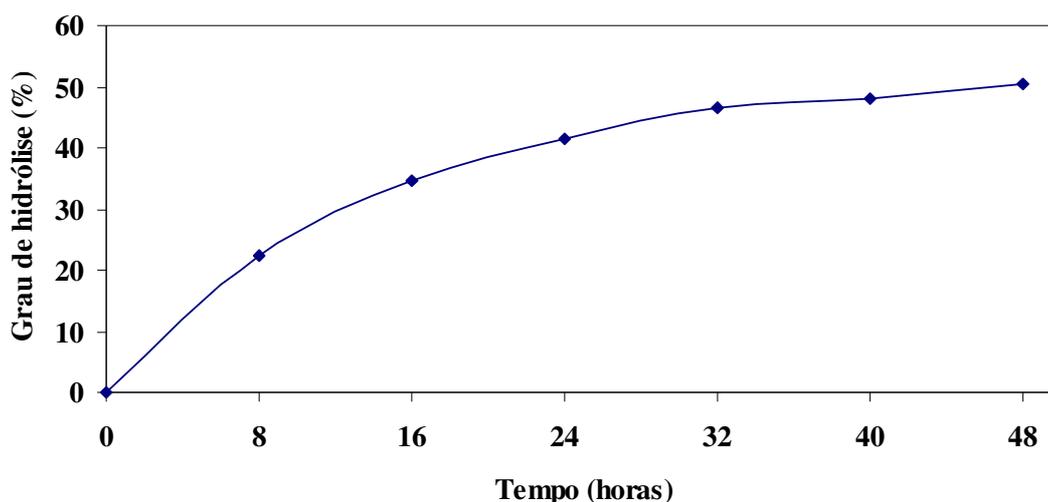


Figura 19 – Grau de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba em função do tempo de reação.

Há uma relação direta entre o grau e hidrólise e o tempo de reação. Para uma mesma concentração de enzima, um aumento do tempo leva ao aumento do grau de hidrólise, até um patamar máximo. A taxa de hidrólise é inicialmente alta, mas decai com o tempo devido à diminuição da concentração do substrato (NOOR et al., 2003; BUENO, 2005). Um perfil de hidrólise similar foi obtido por NOOR et al. (2003), que alcançaram a hidrólise de quase todo o óleo de palma na concentração de 25g/L, após 1h 30m de reação, utilizando lipase a

92,5kLU/L. FREITAS et al. (2007) destacaram que o perfil da hidrólise do óleo de soja por lipase foi sigmoidal, de modo que as reações foram mais rápidas nas primeiras 6 horas, atingindo até 63% de conversão. Estes autores alcançaram o máximo de 70% de grau de hidrólise após 24 horas de reação, a 40 °C.

A concentração de ácidos graxos aumentou em função do tempo de hidrólise, como era esperado (**Tabela 16 e Figura 20**). Observa-se, na **Figura 20**, que a produção de ácidos graxos é inicialmente muito rápida, devendo-se, segundo BUENO (2005), à alta velocidade de formação ($d(\text{RCOOH}) / dt$) que tende a diminuir com a mudança cinética da reação.

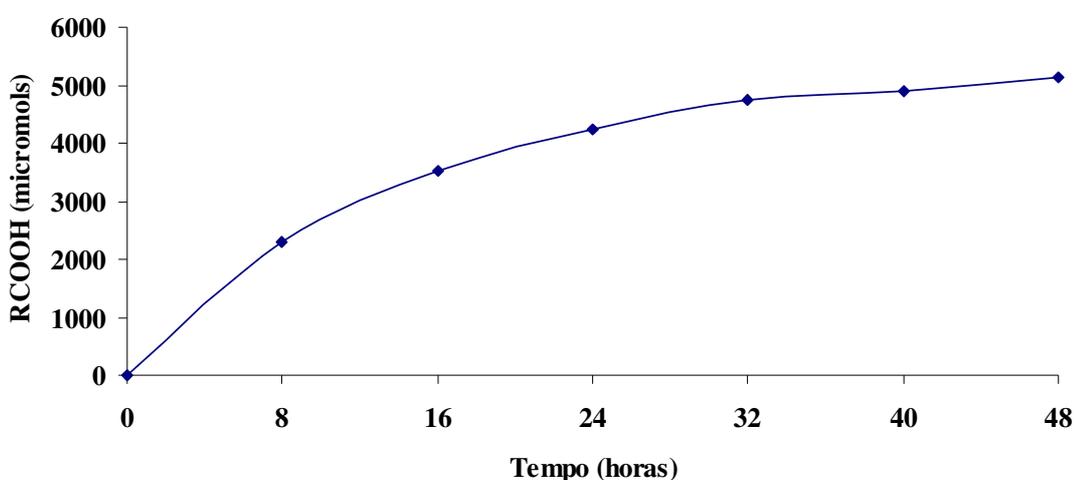


Figura 20 – Concentração de ácidos graxos em função do tempo de hidrólise.

Observa-se, também, que a produção de ácidos graxos tende a se estabilizar a partir de 32 horas, aproximadamente, quando se atingiu próximo de 92% do total produzido em 48 horas. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por outros autores. STAUFFERT (2000) e PADILHA & AUGUSTO-RUIZ (2007), estudando a hidrólise enzimática do óleo de peixe e FREITAS et al. (2007), estudando a hidrólise enzimática do óleo de soja, relataram também o aumento da concentração de ácidos graxos em função do tempo de reação, tendendo à estabilização.

Tabela 16 – Porcentagem de hidrólise e concentração de ácidos graxos

Tempo (horas)	Grau de hidrólise (%)^a	Concentração de ácidos graxos (μmols)^a
0	0,00	0,00
8	22,5 \pm 1,1	2289,3 \pm 23,8
16	34,5 \pm 0,3	3513,0 \pm 33,8
24	41,5 \pm 0,8	4228,3 \pm 44,3
32	46,5 \pm 0,4	4738,3 \pm 41,3
40	48,0 \pm 0,2	4893,3 \pm 28,4
48	50,5 \pm 1,2	5170,7 \pm 26,4

^aMédia de três repetições

6 RELAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS

A fermentação em substrato líquido (FSL) mostrou-se como o melhor processo fermentativo para a produção de lipase extracelular pela cepa do fungo filamentoso *Colletotrichum gloesporioides*, que alcançou cerca de 19U/mL de atividade lipásica.

Após o processo de FSL, foi obtido o filtrado a partir do caldo fermentado, contendo a preparação bruta de lipase, que se apresentou ligeiramente turvo e amarelado.

A preparação bruta de lipase, contendo 0,01% de azida sódica, não se conservou bem a 4°C, ocorrendo uma queda progressiva da atividade lipásica que, ao final de 40 dias, era de 61% da atividade lipásica total inicialmente presente.

A preparação bruta de lipase, contendo 0,01% de azida sódica, não se conservou bem a -20°C, ocorrendo uma queda da atividade lipásica que, ao final de 40 dias, era de 84% da atividade total inicialmente presente.

Não foi quantificada atividade proteásica na preparação bruta de lipase.

A concentração da preparação bruta de lipase, em membrana de ultrafiltração com fluxo tangencial, foi realizada sem perda representativa da atividade lipásica, possibilitando cerca de 81% de recuperação e alcançando 709U/mL de atividade lipásica, além de possibilitar um fator de purificação de 1,5 vezes.

O processo de ultrafiltração reteve, na fração concentrada, toda a enzima presente na preparação bruta de lipase, sem encontrar, dessa forma, atividade lipásica na fração permeada.

O processo de liofilização da preparação lipásica concentrada resultou na formação da preparação lipásica liofilizada, que se apresentou como pó em tom palha, muito higroscópico e com 75U/mg de pó liofilizado, como atividade lipásica.

A liofilização e o armazenamento da preparação lipásica liofilizada, a 4°C, possibilitaram a sua utilização por um período de 80 dias, durante os quais se conservou bem e manteve-se estável.

A medida dos halos de hidrólise formados em ágar contendo emulsão de óleo de oliva em álcool polivinílico, em presença de corante Azul Victória (AEPV) e em ágar contendo tributirina emulsionada, em presença do mesmo corante (ATV), foi adequada para a detecção de atividade lipásica nas preparações bruta, concentrada e liofilizada de lipases.

Os ensaios preliminares acerca da hidrólise enzimática do óleo de oliva levaram à elaboração da equação ajustada que explicou a variação do grau de hidrólise em função da variação simultânea da concentração de enzima e do tempo de reação: $y = 35,25 + 3,19x_1 +$

8,65x₂. Verificou-se que os termos quadráticos do tempo e da concentração, e a interação tempo e concentração não foram significativos, pouco influenciando o grau de conversão nas faixas estudadas.

Não foi possível obter o ponto ótimo, ou seja, o maior grau de hidrólise, no menor tempo de reação, com a menor concentração da enzima, visto que o planejamento experimental não cobriu esta faixa. O grau de hidrólise máximo alcançado foi de 43,7% e a combinação escolhida como a mais vantajosa foi a de menor tempo de reação, ou seja, 16 horas e 306U/25mL. Portanto, dando continuidade à otimização, o deslocamento deveria ser realizado para uma nova região experimental, tendo os valores de 26 horas e 265U/25mL como pontos centrais. O grau de hidrólise do óleo de oliva variou de 18,8 a 43,7%, havendo um aumento de, aproximadamente, 57%.

Através das análises físico-químicas ficou sugerido que as amostras do óleo da amêndoa da macaúba encontravam-se bem conservadas.

Finalmente, a evolução da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba foi acompanhada ao longo do tempo, com a concentração da enzima mantida em 306U/mL, apresentando uma relação direta entre o grau de hidrólise e o tempo de reação, de forma que, para uma mesma concentração de enzima, um aumento do tempo leva ao aumento do grau de hidrólise, até um patamar máximo. A taxa de hidrólise foi inicialmente alta, mas decaiu com o tempo devido à diminuição da concentração do substrato.

A concentração de ácidos graxos aumentou em função do tempo de hidrólise sendo que a produção de ácidos graxos foi inicialmente muito rápida, tendendo a se estabilizar a partir de 32 horas de reação quando se atingiu próximo de 92% do total produzido em 48 horas. Houve uma relação linear entre a produção de ácidos graxos e o rendimento da reação de hidrólise.

7 CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível a obtenção da lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* na forma liofilizada, e que foi utilizada para a realização da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIGOR, R.D.; MARMER, W.N.; FOGLIA, T.A.; JONES, K.C.; DICICCIO, R.J.; ASHBY, R.; UADIA, P.O. Production of cocoa butter-like fats by the lipase-catalyzed interesterification of palm oil and hydrogenated soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 80, p. 1193-1196, 2003.
- AÇIKEL, U.; ERŞAN, M.; AÇIKEL, Y.S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Food Bioprod. Proc.*, v. 8, p. 31-39, 2010.
- ALFORD, J.A.; STEINLE, E.E. Improved plating method for the determination of microbial lipolysis. *Bacteriol. Proc.*, v. 66, p. 14-19, 1966.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: Embrapa – CPAC, 1998. 464 p
- AMARAL, F.P. *Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba [Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart] - Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp. 2007. 66p. (Dissertação, Mestrado em Agronomia).*
- AMAYA-FARFÁN, J.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; NOLETO CRUZ, P.; MARQUES, E.P. Fatty acid and amino acid composition of some indigenous fruits of northeastern Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 6, p. 86-92, 1986.
- AZEREDO, L.A.I.; GOMES, P.M.; SANTANNA JR., G.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Curr. Microb.*, v. 54, p. 361–365, 2007.
- BHERING, L. Macaúba: matéria-prima nativa com potencial para a produção de biodiesel. Disponível em: <<http://www.cnpae.embrapa.br/artigos-de-divulgacao/macauba-materia-prima-nativa-com-potencial-para-producao-de-biodiesel.pdf/view>>. Janeiro 2010. Acesso em: 8 de fev. de 2010.
- BIAN, C.; YUAN, C.; LIN, L.; LIN, J; SHI, X.; YE, X.; HUANG, Z.; HUANG, M. Purification and preliminary crystallographic analysis of a *Penicillium expansum* lipase. *Biochim. Bioph. Acta*, v. 1752, p. 99 –102, 2005.
- BIODIESEL sai à caça de novas matérias-primas para crescer. Disponível em:<<http://www.cnpae.embrapa.br/pasta-NoticiasUd/pastanoticiasud.2010-02-03.7484529003/noticiasud.2010-02-03.7603175515>>. Fevereiro 2010. Acesso em 8 de fev. de 2010.

- BON, E.P.S; GÍRIO, F.; COLLAÇO, M.T.A.; CORVO, M.L. Apresentação. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506p.^a
- BON, E.P.S.; JR, N.P.; GOTTSCHALK, L.M.F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J.C.; FERRARA, M.A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506p.^b
- BONDAR, G. *Palmeiras do Brasil*. São Paulo: Instituto de Botânica, 1964. n.2, p. 500-554.
- BORA, P. S., ROCHA, R. V. M.. Macaíba palm: Fatty and amino acids composition of fruits. *Ciênc. Technol. Aliment.* v. 4, n.3, p. 158-162, 2004.
- BORA, P.S.; ROCHA, R.V.M; NARAIN, N.; MOREIRA-MONTEIRO, A.C.; MOREIRA, R.A. Characterization of principal nutritional components of Brazilian oil palm (*Eliaes guineensis*) fruits. *Biores. Technol.*, v. 87, p. 1–5, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 3 de agosto de 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Política Nacional de Alimentação e Nutrição*. 2001. Disponível em: <<http://200.214.130.94/nutricao/documentos/pnan.pdf>> Acesso em: 2 de fevereiro 2010.
- BUENO, T. *Obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja*. Lorena: Faculdade de Engenharia Química da USP. 2005. 115p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).
- BURKERT, J.F.M; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bior. Technol.*, v. 91, p. 77-84, 2004.
- CAI, Y; WANG, L.; LIAO, X.; DING; Y; SUN, J. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. *Proc. Biochem.*, v. 44, p. 786–790, 2009.
- CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enz. Microb. Technol.*, v. 28, p. 145-154, 2001.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quim. Nova*, v. 26, p.75-80, 2003.

- CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quím. Nova*, v. 27, p. 146-156, 2004.
- CASTRO-OCHOA, L.D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enz. Microb. Technol.*, v 37, p. 648-654, 2005.
- CHEN, Z.; FRANCO, C.F.; BAPTISTA, R.P.; CABRAL, J.M.S; COELHO, A.V.; RODRIGUES JR., C.J.; MELO, E.P. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 73, p. 1306–1313, 2007.
- CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, p. 193–197, 2004.
- COLAK, A.; CAMEDAN, Y.; FAIZ, O.; SESLI, E.; KOLWOGLU, Y. Na enterolytic activity from a wild edible mushroom, *Lycoperdon perlatum*. *J. Food Biochem.*, v. 33, p. 482-499, 2009.
- COLEN, G., *Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2006. 206p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World J. Microb. Biotech.*, v. 22, p. 881–885, 2006.
- CONTESINI, F.J.; SILVA, V.C.F; MACIEL, R.F.; LIMA R.J.; BARROS, F.F.C; CARVALHO, P.O. Response surface analysis for the production of a enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *The J. Microbiol.*, v. 47, p. 563-571, 2009.
- CRUZ, M.E.M.; MARTINS, M.B.; CORVO, M.L.; GASPAR, M.M.; OLIVEIRA, E.M.M.; FERRARA, M.A. Enzimas em medicamentos e diagnósticos. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506 p.
- deMAN, J.M. *Principles of food chemistry*. 3. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999. 460P.
- DHARMSTHITI, S.; KUHASUNTISUK, B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: Biochemical properties and applications for wastewater treatment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 21, p. 75-80, 1998.
- DRAVANOV, K.; KHALAMEIZER, V.B. Current state of study of microbial lipases. *Chem. Nat. Comp.*, v. 33, p. 113-126, 1997.

- DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; FILHO, E.X.F. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506 p.
- EGLI, T.; ZIN, M. The concept of multiple nutrient limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnol. Adv.*, v. 22, p. 35-43, 2003.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Proc. Biochem.*, v. 38, p. 367-372, 2002.
- ELLAIHAH, P., PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A.T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Proc. Biochem.*, v. 39, p. 525-528, 2004.
- FENNEMA, O. R. *Química de los alimentos*. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 1258 p.
- FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses. *Enz. Microb. Technol.* (2010), doi:10.1016/j.enzmictec.2010.01.002. Manuscrito aceito.
- FREIRE, D.M.A.; CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506 p.
- FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V.H.; SANTOS, J.C.; CASTRO, H.F. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 23, p. 1725–1731, 2007.
- FU, X.; ZHU, X.; GAO, K.; DUANT, J. Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 72, p. 527-530, 1995.
- GANDHI, N.N. Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 74, p. 621-634, 1997.
- GONÇALVES, F.A.G., *Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 66p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- GUNSTONE, F.D. Production and trade of vegetable oils. In: GUNSTONE, F.D. (Ed.) *Vegetable oils in food technology: Compositions, properties and uses*. Boca Raton: Blackwell Publishing, 2002. 352 p.
- GUPTA, R.; GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 64, p. 763–781, 2004.

- HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. Processos de separação por membranas. In: KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR., A. (Ed.) *Purificação de produtos biotecnológicos*. Barueri: Editora Manole, 2005. 444p.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enz. Microb. Technol.*, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HIANE, P. A.; PENTEADO, M. V. C.; BADOLADO, E. Teores de ácidos graxos e composição centesimal do fruto e da farinha da bocaiúva (*Acrocomia mokaýayba* Barb. Rodr.). *Alim. Nutr.*, São Paulo, v. 2, p. 21-26, 1990.
- 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. *Braz. J. Food Technol.*, v. 8, p. 256-259, 2005.
- HIANE, P.A.; BALDASSO, P.A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 26, p. 683-689, 2006.^a
- HIANE, P.A.; MACEDO, M.R.L.; SILVA, G.M.; NETO, J.A.B. Avaliação nutricional da proteína de amêndoas de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (jacq.) lodd., em ratos Wistar em crescimento. *B.CEPPA*, v. 24, p. 191-206, 2006.^b
- HIOL, A.; JONZO, M.D.; DRUET, D.; COMEAU, L. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enz. Microb. Technol.*, v. 25, p. 80–87, 1999.
- HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 64, p.175-186, 2004.
- HOPPE, A.; THEIMER, R.R. Titrimetric test for lipase activity using triolein emulsions. *Phytochemistry*, v. 42, p. 973-978, 1996.
- HUANG, J.; LIU, Y.; SONG, Z.; JIN, Q.; LIU, Y.; WANG, X. Kinetic study on the effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil: study of the interfacial area and the initial rates. *Ultras. Sonochem.*, v. 17, p. 521–525, 2010.
- IAL (Instituto Adolfo Lutz). *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4^a Ed. São Paulo: IMESP, 2005. 1018p.
- IIZUMI, T.; NAKAMURA, K.; FUKASE, T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.*, v. 54, p. 1253-1258, 1990.
- IWASHITA, K., Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J. Biosc. Bioeng.*, v.94, p.530-535, 2002.

- JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 53, p.315-351, 1999.
- JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbial. Rev.*, v.15, p.29-63, 1994.
- JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* v. 16, p. 396-403, 1998.
- JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, v. 18, p. 650-657, 1983.
- KHOR, H.T.; TAN, N.H.; CHUA, C.L. Lipase-catalysed hydrolysis of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 18, p. 650-657, 1983.
- KOJIMA, Y.; SHIMIZU, S. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *J. Biosc. Bioeng.*, v. 96, p. 219-226, 2003.
- KONTKANEN, H.; TENKANEN, M.; FAGERSTROM, R.; REINIKAINEN, T. Characterisation of steryl esterases activities in commercial lipase preparations. *J. Biotechnol.*, v. 108, p. 51-59, 2004.
- KRSTIC, D.M.; ANTOV, M.G.; PERIČIN, D.M.; HOFLINGER, W.; TEKIC, M.N. The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution. *Biochem. Eng. J.*, v. 33, p. 10–15, 2007.
- KUMAREVEL, T.S.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; GAUTHAM, N.; PONNUSAMY, M.N. Purification of lipase from *Cunninghamella verticillata* by stepwise precipitation and optimized conditions for crystallization. *World J. Microb. Biotech.*, v. 21, p. 23–26, 2005.
- LAGO, R.C.A.; PEREIRA, D.A.; PASSOS, P.R.A.; ROCHA, A.N.F.; JABLONKA, F.H.; SZPIZ, R.R.. Triacilgliceróis de óleo de amêndoa de macaúba. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 11, p. 66-79, 1991.
- LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 79, p. 191-195, 2002.
- LI, Z.; Youravong, W.; H-Kittikun, A. Separation of proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. *Biores. Technol.*, v. 97, p. 2364–2370, 2006.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Eds.). *Processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. V. 3, 593p. Coleção Biotecnologia industrial, 4 v.
- LIN, S.F.; LEE, J.C.; CHIOU, C.M. Purification and characterization of lipase from *Neurospora* sp. TT-241. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 73, p. 739-745, 1996.

- LORENZI, G.M.A.C. *Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável*. Curitiba: Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da UFPR. 2006. 166p. (Tese, Doutorado em Ciências).
- MHETRAS, N.C.; BASTAWDE, K.B., GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Biores. Technol.*, v. 100, p. 1486–1490, 2009.
- 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. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 37, 2002.
- MOZAFFAR, Z.; WEETE, J.D. Invert emulsion as a medium for fungal lipase activity. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 72, p. 1361-1366, 1995.
- NAMBOODIRI, V.M.H.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Am. Oil. Chem. Soc.*, v. 35, p. 495-502, 2000.
- NANDINI, K.E.; RASTOGI, N.K. Reverse micellar extraction for downstream processing of lipase: effect of various parameters on extraction. *Proc. Biochem.*, v. 44, p. 1172-1178, 2009.
- NEIDLEMAN, S.L. Enzymes in food industry: a backward glance. *Food Technol.*, v. 45, p. 88-91, 1991.
- NOOR, I.M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K.B. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Proc. Biochem.*, v. 39, p. 13-20, 2003.
- OLIVEIRA, A.L.A.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Hidrólise enzimática da gordura de babaçu. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, v. 19, p. 270-276, 1999.
- OLIVEIRA, D.A.; MOREIRA, P.A.; JÚNIOR, A.F.M.; PIMENTA, M.A.S. Potencial da biodiversidade vegetal da região norte do estado de Minas Gerais. *Unimontes Cient.*, v.8, p. 23-33, 2006.
- OLIVEIRA, D.T.M. *Lipase extracelular de fungo filamentoso: isolamento e caracterização parciais*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2000. 151p. (Dissertação, Mestrado em ciência de Alimentos).
- OLSON, G.R.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.*, v. 176, p. 1-6, 1994.
- PADILHA, M.E.S; AUGUSTO-RUIZ. w. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, p. 285-290, 2007.

- PAIVA, C.L.A.; SÁ-PEREIRA, P. A aplicação da biologia molecular na produção de enzimas. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506p.
- PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B.S. Production and applications of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 67, p. 160-169, 2005.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolic production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.*, v. 22, p. 189-259, 2004.
- PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M.; Protease secretion in glycoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Proc. Biochem.*, v.37, p.1271-1278, 2002.
- PATEL, R.N. Microbil / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enz. Microbial Technol.* V. 31, p. 804-826, 2002.
- PESSOA JR., A; KILIKIAN, B.V.; LUCARINI, A.C. Precipitação. In: KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR., A. (Ed.) *Purificação de produtos biotecnológicos*. Barueri: Editora Manole, 2005. 444p
- PETERSON, G.L. Determination of total protein. *Met. Enzymol.*, v. 91, p. 95-119, 1983.
- PITOMBO, R.N.M. Liofilização. In: PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B.V.(Ed.) *Purificação de produtos biotecnológicos*. São Paulo: Editora Manole, 2005. 444p.
- PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochem.*, v. 38, p. 1077-1082, 2003.
- PLOU, F.J.; BARANDIARÁN, M.; CALVO, M.V.; BALLESTEROS, A.; PASTOR, E. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalysed hydrolysis of triolein. *Enz. Microb. Technol.*, v. 18, p. 66-71, 1996.
- PRIMOZIC, M.; HABULIN, M.; KNEZ, Z. Parameter Optimization for the Enzymatic Hydrolysis of Sunflower Oil in High-Pressure Reactors. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 80, p.643-646, 2003.
- RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Optimization of medium composition for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 using response surface methodology. *Can. J. Microb.*, v. 53, p. 643-655, 2007.
- RAMOS, M.I.L.; SIQUEIRA, E.M.A.; ISOMURA, C.C.; BARBOSA, A.M.J.; ARRUDA, S.F. Bocaiúva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. improved vitamim A status in rats. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p.3186-3190, 2007.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2. ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573p.

- REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, v. 147-148, p. 237–250, 2009.
- RIGO, E.; NINOW, J.L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V.; POLLONI, E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements LWT - *Food Sci. Technol.* (2010), doi: 10.1016/j.lwt.2010.03.002. Manuscrito aceito.
- RODRIGUES, H.S. *Obtenção de ésteres etílicos e metílicos, por reações de transesterificação, a partir do óleo da palmeira Latino Americana macaúba – Acrocomia aculeata*. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. 2007. 236p. (Tese, Doutorado em Ciências).
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos – uma estratégia seqüencial de planejamentos*. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.
- SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enz. Microb. Technol.*, v. 40, p. 390-393, 2007.
- SANTOS, E.P.; VELASCO, M.V.; VILLA, A.L.V.; SIMÕES, S.I. Enzimas na indústria de cosméticos. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506p.
- SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W.S., SHEORAN, A., GIRI. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Proc. Bioch.*, v. 39, p. 239-247, 2003^a.
- SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, S.W. Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods*, v. 52, p. 1-18, 2003^b.
- SBRT (Serviço brasileiro de respostas técnicas). Resposta técnica. Instituto de Tecnologia do Paraná, 2006. Disponível em <<http://www.sbrt.ibict.br>>. Acesso em: 2 de agosto de 2008.
- SCHILLER, M.; LUBECK, M.; SUNDELIN, T.; MELÉNDEZ, L.F.C.; DANIELSEN, S.; JENSEN, D.F.; ORDENANA, K.M. Two subpopulations of *Colletotrichum acutatum* are responsible for anthracnose in strawberry and leatherleaf fern in Costa Rica. *Eur. J. Plant Pathol.*, v. 116, p. 107-118, 2006.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, 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 microorganism with special reference to dairy applications. *J. Microb. Meth.*, v. 6, p. 127-137, 1987.
- SHIMADA, Y.; MARUYAMA, K.; OKAZAKI, S.; NAKAMURA, M.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.7 1, p. 951-954, 1994.
- SHIMIZU, S.; OGAWA, J.; KATAOKA, M.; KOBAYASH, M. Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compound. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin: Springer Berlin/Heidelberg, 1997. v. 58, 230p.
- SMITH, J.L.; HASS, M.J. Lipolytic microorganisms. In: SPECK, M.L. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D.F.; APHA, 1992. p. 183-191.
- SONG, B.; DING, H.; WANG, S. Hydrolysis of olive oil catalyzed by surfactant-coated *Candida rugosa* lipase in a hollow fiber membrane reactor. *Biotechnol. Bioproc. Engin.*, v. 12, p. 121-124, 2007.
- SOUZA, R.F., SOARES, R.M.A., NASCIMENTO, R.P., COELHO, R.R.R., GOMES, R.C. Effect of different carbon sources on endochitinase production by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Cur. Microb.*, v. 51, p. 16–21, 2005.
- STAUFFERT, D. *Hidrólise enzimática de óleo de pescado*. Porto Alegre: Escola de Química e Alimentos da FURG. 2000. (Dissertação, Mestrado em Engenharia de Alimentos).
- STOCKLEIN, W.; SZTAJER, H.; MENGE, U; SCHMID, R.D. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1168, p. 181-189, 1993.
- SZTAJER, H.; BRYJAK, M. Capillar membranes for purification of *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Bioproc. Eng.*, v. 4, p. 257-259, 1989.
- SZTAJER, H.; LUNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMID, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplissimum*. *Biochim. Biophys. Acta*, v.. 1124, p. 253-261, 1992.
- TALUKDER, M.M.R; WU, J.C.; FEN, N.M.; MELISSA, Y.L.S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochem. Eng. J.*, v. 49, p. 207-212, 2010.
- TAN, T.; WANG, M.Z.B; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Proc. Bioch.*, v. 39, p. 459- 465, 2003.
- TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Proc. Biochem.*, v. 39, p. 1495-1502, 2004.

- THOMSON, C.A.; DELAQUIS, P.J.; MAZZA, G. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, v. 39, p. 165-187, 1999.
- TOMARELLI, R.M.; CHARNEY, J.; HARDING, M.L. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 34, p. 428-433, 1949.
- TORALLES, R.P. *Modelo experimental para reação de lipólise com lipase pancreática*. Porto Alegre: Escola de Química e Alimentos da FURG. 1998. (Dissertação, Mestrado em Engenharia de Alimentos).
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; DI LUCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. A review in microbial lipases production. *Food Bioproc. Technol.*, v. 3, p. 182-196, 2010.
- VACEK, M.; ZAREVÚCKA, M.; WIMMER, Z.; STRÁNSKY, K.; KOUTEK, B.; MACKOVÁ, M.; DEMNEROVÁ, K. Lipase-mediated hydrolysis of blackcurrant oil. *Enz. Microb. Technol.*, v. 27, p. 531-536, 2000.
- VARGAS, G.D.L.P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LUCCIO, M.D. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 83, p. 47-54, 2008.
- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.*, v. 15, p. 32-38, 1997.
- VIRTO, M.; CHAVARRI, F.; BUSTAMANTE, M.A.; BARRON, L.J.R.; ARAMBURU, M.; VICENTE, M.S.; PEREZ-ELORTONDO, F.J.; ALBISIU, M.; De RENOBALLES, M. Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. *Internat. Dairy J.*, v. 13, p. 391-399, 2003.
- VOLPATO, G.; FILICE, M.; AYUB, M.A.Z.; GUIBAN, J.M.; PALOMO, J.M. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. *J. Chromat. A*, v. 1217, p. 473-478, 2010.
- WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.*, v. 41, p. 1353-1358, 1977.
- WOLSKI, E.; MENUSSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, N.; MAZUTTI, M.A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *Food Sci. Technol.*, v. 42, p. 1557-1560, 2009.
- ZAIA, D.M.A.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quím. Nova*, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZAREVÚCKA, M.; VACEK, M.; WIMMER, Z.; STRÁNSKÝ, K.; DEMNEROVÁ, K. Enzymic transformations of blackcurrant oil: Enrichment with gamma linolenic acid and alpha linolenic acid. *Chem. Listy*, v. 97, p. 206-213, 2003.

APÊNDICE A

MEMÓRIA DE CÁLCULO DO GRAU DE HIDRÓLISE DO ÓLEO DE OLIVA PARA DADOS DA TABELA 12

$$\text{Grau de hidrólise (\%)} = \frac{\text{micromoles de ácido graxo liberado}}{\text{IS} \times (1000/56,1) \times m} \times 100$$

em que,

IS = índice de saponificação do óleo de oliva

m = massa (g) de óleo de oliva

Ensaio 1:

Foram gastos 42,2mL de NaOH 0,05N, portanto, 2110 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{2110}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 25,4$$

Ensaio 2:

Foram gastos 47,1mL de NaOH 0,05N, portanto, 2085 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{2085}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 25,1$$

Ensaio 3:

Foram gastos 68,3mL de NaOH 0,05N, portanto, 3415 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{3415}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 41,1$$

Ensaio 4:

Foram gastos 71,9mL de NaOH 0,05N, portanto, 3595 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{3595}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 43,3$$

Ensaio 5:

Foram gastos 42,6mL de NaOH 0,05N, portanto, 2130 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{2130}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 25,6$$

Ensaio 6:

Foram gastos 70,2mL de NaOH 0,05N, portanto, 3510 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{3510}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 42,3$$

Ensaio 7:

Foram gastos 31,2mL de NaOH 0,05N, portanto, 1560 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{1560}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 18,8$$

Ensaio 8:

Foram gastos 72,6mL de NaOH 0,05N, portanto, 3630 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{3630}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 43,7$$

Ensaio 9:

Foram gastos 57,2mL de NaOH 0,05N, portanto, 2860 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{2860}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 34,4$$

Ensaio 10:

Foram gastos 60,2mL de NaOH 0,05N, portanto, 3010 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{3010}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 36,2$$

Ensaio 11:

Foram gastos 57,4mL de NaOH 0,05N, portanto, 2830 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{2830}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 34,1$$

Ensaio 12:

Foram gastos 60,3mL de NaOH 0,05N, portanto, 3015 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{3015}{196 \times 17,8253 \times 2,3764} \times 100 = 36,3$$

APÊNDICE B

MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA 16

Teor de Umidade

Tabela B.1 - Média e o desvio padrão do teor de umidade do óleo da amêndoa da macaúba

Amostra	Média	Desvio padrão
A	0,491	0,05
B	0,436	0,03
C	0,487	0,04

Tabela B.2 - Teor de umidade, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba

Repetição/Tratamento	A	B	C
1	0,496	0,458	0,444
2	0,436	0,441	0,507
3	0,539	0,408	0,509
Total	1,47	1,31	1,46
Média	0,49	0,44	0,49
Var	0,002659	0,000657	0,001360

Tabela B.3 - Quadro ANOVA

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática (SQ)	Quadrados Médios (QM)	F _{calc.}	p	F 5%	F 1%
Tratamento	2	0,00563	0,00281	1,806	0,243	5,143	10,925
Resíduo	6	0,00935	0,00156				
Total	8	0,01498					

Conclusão:

$F_{\text{calc.}}$ é menor que $F_{\text{tab.}}$ a 5%. Logo, as médias dos teores de umidade das amostras A, B e C não diferem entre si a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Índice de Saponificação

Tabela B.4 - Média e o desvio padrão do índice saponificação do óleo da amêndoa da macaúba

Amostra	Média	Desvio padrão
A	240,44	1,96
B	242,03	2,64
C	241,72	1,10

Tabela B.5 - Índice de saponificação, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba

Repetição/Tratamento	A	B	C
1	242,22	244,18	242,97
2	238,33	242,81	240,88
3	240,77	239,08	241,32
Total	721,32	726,08	725,17
Média	240,44	242,03	241,72
Var	3,850766	6,978233	1,215884

Tabela B.6 - Quadro ANOVA

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática (SQ)	Quadrados Médios (QM)	F _{calc.}	p	F 5%	F 1%
Tratamento	2	4,2500	2,1250	0,529	0,6142	5,143	10,925
Resíduo	6	24,0898	4,0150				
Total	8	28,3398					

Conclusão:

$F_{\text{calc.}}$ é menor que $F_{\text{tab.}}$ a 5%. Logo, as médias dos índices de saponificação das amostras A, B e C não diferem entre si a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Índice de Peróxido

Tabela B.7 - Média e o desvio padrão do índice de peróxido do óleo da amêndoa da macaúba

Amostra	Média	Desvio padrão
A	3,78	0,34
B	4,05	0,61
C	3,98	0,33

Tabela B.8 - Índice de peróxido, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba

Repetição/Tratamento	A	B	C
1	4,18	3,81	4,19
2	3,58	3,59	4,16
3	3,58	4,74	3,60
Total	11,34	12,14	11,95
Média	3,78	4,05	3,98
Var	0,118699	0,374206	0,110153

Tabela B.9 - Quadro ANOVA

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática (SQ)	Quadrados Médios (QM)	F _{calc.}	p	F 5%	F 1%
Tratamento	2	0,1171	0,0586	0,291	0,757	5,143	10,925
Resíduo	6	1,2061	0,2010				
Total	8	1,3233					

Conclusão:

$F_{\text{calc.}}$ é menor que $F_{\text{tab.}}$ a 5%. Logo, as médias dos índices de peróxido das amostras A, B e C não diferem entre si a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Índice de Acidez

Tabela B.10 - Média e o desvio padrão do índice de acidez do óleo da amêndoa da macaúba

Amostra	Média	Desvio padrão
A	12,10	0,12
B	12,06	0,05
C	12,17	0,14

Tabela B.11 - Índice de acidez, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba

Repetição/Tratamento	A	B	C
1	11,98	12,07	12,02
2	12,21	12,11	12,28
3	12,10	12,00	12,22
Total	36,29	36,18	36,52
Média	12,10	12,06	12,17
Var	0,014191	0,003019	0,019368

Tabela B.12 - Quadro ANOVA

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática (SQ)	Quadrados Médios (QM)	F _{calc.}	p	F 5%	F 1%
Tratamento	2	0,0207	0,0103	0,85	0,4737	5,143	10,925
Resíduo	6	0,0732	0,0122				
Total	8	0,0938					

Conclusão:

$F_{\text{calc.}}$ é menor que $F_{\text{tab.}}$ a 5%. Logo, as médias dos índices de acidez das amostras A, B e C não diferem entre si a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Índice de Iodo

Tabela B.13 - Média e o desvio padrão do índice de iodo do óleo da amêndoa da macaúba

Amostra	Média	Desvio padrão
A	31,62	0,51
B	30,47	0,51
C	31,11	0,32

Tabela B.14 - Índice de iodo, em triplicata, das três amostras do óleo da amêndoa da macaúba

Repetição/Tratamento	A	B	C
1	32,14	31,01	31,38
2	31,11	30,40	31,18
3	31,63	30,01	30,76
Total	94,87	91,41	93,32
Média	31,62	30,47	31,11
Var	0,262894	0,255266	0,100044

Tabela B.15 - Quadro ANOVA

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática (SQ)	Quadrados Médios (QM)	F _{calc.}	p	F 5%	F 1%
Tratamento	2	2,0072	1,0036	4,87	0,055	5,143	10,925
Resíduo	6	1,2364	0,2061				
Total	8	3,2436					

Conclusão:

$F_{\text{calc.}}$ é menor que $F_{\text{tab.}}$ a 5%. Logo, as médias dos índices de iodo das amostras A, B e C não diferem entre si a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

APÊNDICE C

MEMÓRIA DE CÁLCULO DO GRAU DE HIDRÓLISE DO ÓLEO DA AMÊNDOA DA MACAÚBA PARA DADOS DA TABELA 17

$$\text{Grau de hidrólise (\%)} = \frac{\text{micromoles de ácido graxo liberado}}{\text{IS} \times (1000/56,1) \times m} \times 100$$

em que,

IS = índice de saponificação do óleo da amêndoa da macaúba

m = massa (g) de óleo da amêndoa da macaúba

Tempo 0:

Foram gastos 28,5mL de NaOH 0,05N, portanto, 1427 μ mols de ácidos graxos já havia sido liberados, e correspondiam à acidez característica do óleo.

$$\% = \frac{1427}{241,4 \times 17,8253 \times 2,3696} \times 100 = 13,9\%$$

Tempo 8:

Foram gastos 74,3mL de NaOH 0,05N, portanto, 3716 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{3716}{241,4 \times 17,8253 \times 2,3696} \times 100 = 36,4\% - 13,9\% = 22,5$$

Tempo 16:

Foram gastos 98,8mL de NaOH 0,05N, portanto, 4939 μ mols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{4939}{241,4 \times 17,8253 \times 2,3696} \times 100 = 48,4\% - 13,9\% = 34,5$$

Tempo 24:

Foram gastos 103,1mL de NaOH 0,05N, portanto, 5654μmols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{5654}{241,4 \times 17,8253 \times 2,3696} \times 100 = 55,4\% - 13,9 = 41,5$$

Tempo 32:

Foram gastos 123,3mL de NaOH 0,05N, portanto, 6165μmols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{6165}{241,4 \times 17,8253 \times 2,3696} \times 100 = 60,4\% - 13,9 = 46,5$$

Tempo 40:

Foram gastos 126,4mL de NaOH 0,05N, portanto, 6319μmols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{6319}{241,4 \times 17,8253 \times 2,3696} \times 100 = 61,9\% - 13,9 = 48$$

Tempo 48:

Foram gastos 131,5mL de NaOH 0,05N, portanto, 6576μmols de ácidos graxos foram liberados.

$$\% = \frac{6576}{241,4 \times 17,8253 \times 2,3696} \times 100 = 64,4\% - 13,9 = 50,5$$