

Grãos de Destilaria como Fonte Indireta de Lipases: Produção, Caracterização e Aplicação

BRUNA CAPOVILLE

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para a obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.**

Botucatu - SP

Fevereiro de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

LABORATÓRIO DE BIOPROCESSOS

**Grãos de Destilaria como Fonte Indireta de Lipases: Produção,
Caracterização e Aplicação**

BRUNA CAPOVILLE

Prof^a. Adj^a. LUCIANA FRANCISCO FLEURI

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.**

Botucatu - SP

Fevereiro de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Capoville, Bruna.

Grãos de destilaria como fonte indireta de lipases :
produção, caracterização e aplicação / Bruna Capoville. -
Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Luciana Francisco Fleuri

Capes: 90400003

1. Resíduos agrícolas. 2. Fermentação. 3. Lipase.
4. Antioxidantes. 5. Sorgo. 6. Milho. 7. Enzimas de
fungos.

Palavras-chave: Ação anticarcinogênica; Ação
antimicrobiana; Atividade antioxidante; DDGS; Fermentação
em estado sólido; Lipases fúngicas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de incentivo à pesquisa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio financeiro para manutenção e melhoria em equipamentos do laboratório (processo 2015/01753-8);

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e ao Departamento de Química e Bioquímica pelo suporte técnico e estrutural;

Às parcerias com o Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, através da Prof^a. Dr^a. Márcia Ortiz Mayo, e com o Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular – LaBio, através do Prof. Dr. Willian Zambuzzi;

À professora adjunta Luciana Francisco Fleuri pela orientação, apoio e disponibilidade em ajudar, dentro e fora do laboratório;

À minha família, Neide, Claudiné, Laysa e Mel, fontes de luz em momentos de escuridão.

SUMÁRIO

Índice Geral

Resumo.....	14
<i>Abstract</i>	15
1. Introdução.....	16
2. Objetivos Do Trabalho.....	19
3. Revisão Bibliográfica.....	19
3.1. Fermentação Em Estado Sólido.....	19
3.2. " <i>Distiller's Dried Grains With Solubles</i> " (Grãos Secos De Destilaria Com Solúveis).....	21
3.3. Produção De Lipases Para Aplicação Em Reações De Hidrólise.....	26
3.4. Produção De Lipases Para Aplicação Em Reações De Síntese.....	28
- Esterificação.....	28
- Alcoólise.....	30
3.5. Produtos De Reações Catalisadas Por Lipases.....	32
4. Material E Métodos.....	33
4.1. Triagem De Micro-Organismos Produtores De Lipases.....	33
4.2. Determinação Da Atividade De Lipases.....	34
- Atividade de Hidrólise.....	34
- Atividade de Esterificação.....	35
- Determinação de Proteínas Totais.....	35
4.3. Concentração Enzimática.....	36

4.4. Caracterização Das Lipases.....	37
- Especificidade.....	37
- Regioespecificidade.....	38
- Massa Molecular.....	39
4.5. Otimização Da Produção De Lipases.....	39
4.6. Aplicação Das Lipases.....	40
- Biorremediação de Óleos Vegetais.....	41
- Produção de Biodiesel.....	41
4.7. Perfil Dos Produtos De Reações.....	42
4.8. Atividades Biológicas De Produtos De Reações.....	43
- Atividade Antioxidante.....	44
- Efeito sobre Viabilidade Celular.....	44
- Atividade Antibacteriana.....	45
- Atividade Antifúngica.....	46
5. Resultados E Discussão.....	46
5.1. Triagem De Micro-Organismos E Atividades De Lipases.....	46
5.2. Concentração Enzimática.....	48
5.3. Caracterização Das Lipases.....	50
- Especificidade.....	50
- Regioespecificidade.....	53
- Massa Molecular.....	55
5.4. Otimização Da Produção De Lipases.....	57
5.5. Aplicação Das Lipases.....	59

- Biorremediação de Óleos Vegetais.....	60
- Produção de Biodiesel.....	60
5.6. Perfil De Produtos De Reações.....	61
5.7. Atividades Biológicas De Produtos De Reações.....	65
- Atividade Antioxidante.....	65
- Efeito sobre Viabilidade Celular.....	68
- Atividade Antibacteriana.....	76
- Atividade Antifúngica.....	81
6. Conclusão.....	83
7. Prosseguimento Da Pesquisa.....	83
8. Referências Bibliográficas.....	85
Anexos.....	96

ÍNDICE ILUSTRAÇÕES

Índice Figuras

Figura 1. Processo de formação de DDGS, após fermentação de grãos. Os números indicados na figura elucidam as etapas que cada produto pode ser submetido. **1:** Centrifugação. **2:** Reutilização como fonte aquosa. **3:** Evaporação. **4:** Secagem.....22

Figura 2. Análise comparativa das atividades enzimáticas (U/g) de cada extrato enzimático em diferentes substratos. **1:** Lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho; **2:** Lipases de *Aspergillus niger* (INCQS 40065) cultivado em DDGS de milho; **3:** Lipases de *Penicillium* sp. 09 cultivado em DDGS de milho; **4:** Lipases de *Aspergillus brasiliensis* (INCQS 40036) cultivado em DDGS

de sorgo, sendo A: diferença estatística significativa quando comparado laurato a palmitato ($p < 0,0001$); *** ($p < 0,0007$) e **** ($p < 0,0001$): diferença estatística significativa quando comparado a butirato.....52

Figura 3. Análise dos produtos de degradação de trioleína para a determinação de regioespecificidade de lipases, sendo **A:** regioespecificidade de lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho; **B:** padrão de lipase 1,3-específica de *Rhizomucor miehei*. ***1:** monoleína; **2:** dioleína; **3:** ácido oleico; **4:** trioleína; **5:** glicerol; **6:** ácido esteárico.....55

Figura 4. Eletroforese de extrato enzimático de lipase obtido a partir de *Aspergillus niger* 01 sobre DDGS de milho e padrões de massa molecular.....56

Figura 5. Atividades de lipases (U/mL) observadas nos ensaios e preditos pelo modelo estatístico.....59

Figura 6. Análise dos produtos de alcoólise catalisada por lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho, sendo **A:** padrão oleato de etila; **B:** padrão palmitato de etila; **C:** Alcoólise sobre óleo de milho; **D:** Alcoólise sobre óleo de soja.....60

Figura 7. Viabilidade de fibroblastos (NIH-3T3), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (G + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAG); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol sem adição de extrato enzimático (BOG); e **Crtl:** Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....68

Figura 8. Viabilidade de queratinócitos (HaCaT), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (G + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAG); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol sem adição de extrato enzimático (BOG); e **Crtl:**

Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....69

Figura 9. Viabilidade de carcinoma bucal (SCC-9), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (G + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAG); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol sem adição de extrato enzimático (BOG); e **Crtl:** Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....71

Figura 10. Viabilidade de fibroblastos (NIH-3T3), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (M + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAM); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho sem adição de extrato enzimático (BOM); e **Crtl:** Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....72

Figura 11. Viabilidade de queratinócitos (HaCaT), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (M + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAM); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho sem adição de extrato enzimático (BOM); e **Crtl:** Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....73

Figura 12. Viabilidade de carcinoma (SCC-9), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (M + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAM); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho sem adição de extrato enzimático (BOM); e **Crtl:**

Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).....74

Figura 13. Placas com inibição de crescimento bacteriano representada pela formação de halos. Sendo **a:** Placa de *Staphylococcus aureus* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol por lipases de *Aspergillus niger* 01; **b:** Placa de *Pseudomonas aeruginosa* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol por lipases de *Aspergillus niger* 01; **c:** Placa de *Escherichia coli* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de milho por lipases de *Aspergillus niger* 01; **d:** Placa de *Staphylococcus aureus* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de milho por lipases de *Aspergillus niger* (INCQS 40065). *Quadrante A: disco de antibiótico anfotericina B. Quadrante B: controle salino. Quadrantes C e D: produtos de reação de lipases em duplicata.....77

Figura 14. Placa com inibição de crescimento de *Escherichia coli* representada pela formação de halos por produtos de reação de alcoólise de óleo de soja por lipases de *Aspergillus niger* 01. *Quadrante A: disco de antibiótico anfotericina B. Quadrante B: controle salino. Quadrantes C e D: produtos de reação de lipases em duplicata.....80

ANEXOS

Figura 1: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol em reação de hidrólise (Teste 1).....96

Figura 2: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol em reação de hidrólise (Teste 2).....96

Figura 3: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol em reação de hidrólise (Teste 3).....97

Figura 4: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de milho em reação de hidrólise (Teste 1).....97

Figura 5: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 sobre óleo de milho em reação de hidrólise (Teste 2).....	98
Figura 6: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 sobre óleo de milho em reação de hidrólise (Teste 3).....	98
Figura 7: Perfil de ésteres etílicos resultantes da atuação de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 sobre óleo de milho em reação de alcoólise.....	99
Figura 8: Perfil de ésteres etílicos resultantes da atuação de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 sobre óleo de soja em reação de alcoólise.....	99

Índice Tabelas

Tabela 1. Níveis codificados e valores reais do planejamento fatorial para a produção de lipases fúngicas em DDGS.....	40
Tabela 2. Produção de lipases fúngicas em DDGS de milho e sorgo e suas atividades de hidrólise.....	47
Tabela 3. Atividade lipolítica de extratos de lipases fracionados por sulfato de amônio.....	49
Tabela 4. Especificidade das lipases liofilizadas produzidas por fungos em DDGS de milho e sorgo em relação a ácidos graxos de cadeia curta, média e longa.....	51
Tabela 5. Níveis codificados para o planejamento experimental e atividades de lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 em DDGS de milho.....	57
Tabela 6: Análise dos efeitos e coeficientes de regressão na produção de lipases por <i>Aspergillus niger</i> 01 em DDGS de milho por fermentação em estado sólido.....	58
Tabela 7. Perfil de ácidos graxos resultantes de hidrólise de óleo de girassol realizada por lipases produzidas por <i>Aspergillus niger</i> 01.....	62

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos resultantes de hidrólise de óleo de milho realizada por lipases produzidas por <i>Aspergillus niger</i> 01.....	63
Tabela 9. Capacidade antioxidante de produtos de reação de hidrólise de óleos de girassol e milho por lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01 ou <i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065).....	65
Tabela 10. Capacidade antioxidante de produtos de reação de alcoólise de óleos de soja e milho por lipases de <i>Aspergillus niger</i> 01.....	66
Tabela 11. Atividade antibacteriana dos produtos de reação de hidrólise obtidos por lipases do projeto.....	76
Tabela 12. Atividade antibacteriana dos produtos de reação de alcoólise obtidos por lipases do projeto.....	79
Tabela 13. Associação de composição de produtos de reações e suas atividades biológicas.....	82

Abreviações

- 2-MP: monopalmitina;
- a.d.: anterior à destilação;
- AG: ácido(s) graxo(s);
- ATCC: *American Type Culture Collection*;
- BAG: branco de amostra em óleo de girassol;
- BAM: branco de amostra em óleo de milho;
- BHA: hidroxianisol butilado;
- BHT: hidroxitolueno butilado;
- bi: bilhões;
- BOG: branco de óleo de girassol;
- BOM: branco de óleo de milho;
- CCD: cromatografia em camada delgada;
- CG: cromatografia gasosa;

- CG-DIG: cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama;
- CG-EM: cromatógrafo a gás acoplado a espectrofotômetro de massas;
- CLA: ácido linoleico conjugado;
- Ctrl: controle;
- DDGS: *distiller's dried grains with solubles*;
- DG: grãos destilados;
- DMEM: *dulbecco's modified eagle's medium*;
- DMSO: dimetilsulfóxido;
- DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila;
- DS: solúveis destilados condensados;
- E.E.: extrato etéreo;
- EUA: Estados Unidos da América;
- F.B.: fibras brutas;
- FES: fermentação em estado sólido;
- FL: fermentação líquida;
- HaCaT: queratinócitos humano normais;
- INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde;
- IOC: Instituto Oswaldo Cruz;
- mi: milhões;
- ISO: *International Organization for Standardization*;
- MAGs: *monoacylglycerols*;
- MCSFA: *medium chain saturated fatty acids*;
- MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio];
- NIH-3T3: fibroblastos de camundongo normais;
- opm: oscilações por minuto;
- p-NP: p-nitrofenilfosfato;
- OPO: 1,3-oleil-2-palmitoilglicerol;

- P.B.: proteínas brutas;
- PDA: *potato dextrose agar*;
- p.f.: pós-fermentação;
- PUFAS: *polyunsaturated fatty acids*;
- Rf: fator de retenção;
- rpm: rotações por minuto;
- SCC-9: carcinoma epidermóide bucal;
- SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel eletrophoresis*;
- SFB: soro fetal bovino.

RESUMO

O descarte de resíduos agroindustriais pode causar poluição e desperdício se feito de maneira incorreta. Uma solução viável econômica e ecologicamente é usá-los como meio de cultura para crescimento fúngico por fermentação em estado sólido (FES), visando à obtenção de enzimas de interesse. Nesse contexto, grãos de destilaria secos com solúveis (DDGS) são ótima opção para a produção de lipases devido à grande geração mundial e a sua composição. Lipases são enzimas versáteis que podem expressar atividade hidrolítica e de síntese. O uso de resíduos como substrato acarreta uma produção enzimática barata, contornando o problema de acesso a essas enzimas, que são comercializadas a altos preços por poucas empresas. Assim sendo, este trabalho objetivou cultivar fungos por FES em DDGS de sorgo e milho, visando à produção de lipases e à sua caracterização quanto à especificidade, regiosseletividade e massa molecular. Objetivou também aplicar essas enzimas em reações de hidrólise (almejando a biorremediação), esterificação e alcoólise (almejando a produção de biodiesel), assim como testar os produtos destas reações quanto às capacidades antioxidante, antimicrobiana e de influenciar a viabilidade celular, correlacionando-as com estrutura química. As fermentações fúngicas produziram lipases 1,3-específicas com afinidade predominante por ácidos graxos de cadeia longa (até 246,5 U/g) e com o extrato bruto contendo proteínas de massas moleculares entre 14,12 e 37,15 kDa. As lipases foram capazes de catalisar reações de hidrólise e alcoólise, sendo que os produtos de reações (ácidos graxos, mono e diglicerídeos e ésteres etílicos) apresentaram capacidades antioxidantes (até 92,12%), antibacterianas e influenciaram as viabilidades de fibroblastos, queratinócitos e células de carcinoma bucal.

ABSTRACT

The disposal of agro-industrial waste can cause pollution and wastage if done incorrectly. An economically and ecologically viable solution is the use of the waste as a culture medium for fungal growth by solid state fermentation (SSF), aiming at the generation of enzymes of interest. In this context, distiller's dried grains with solubles (DDGS) are an excellent choice due to the worldwide production and their composition to produce lipases, versatile enzymes of wide applicability due to the hydrolytic and synthetic activity. The use of waste as a substrate generates a cheap production of lipases, what is an alternative to the problem of access to these enzymes, sold at high prices by a few companies. This work aimed to cultivate fungi by SSF in DDGS of sorghum and corn, targeting the production of lipases with their characterization as to specificity, regioselectivity and molecular mass; the application of the lipases in reactions of hydrolysis (aiming at bioremediation) and esterification and alcoholysis (aiming at the production of biodiesel); and the test of the products of these reactions as to their antioxidant, antimicrobial and cellular viability capacities. The fermentations produced 1,3-specific lipases with major specificity by long chain fatty acids (up to 246.5 U/g) and proteins with molecular weights between 14.12 and 37.15 kDa. The lipases were able to catalyze reactions of hydrolysis and alcoholysis and the products of reactions (fatty acids, mono and diglycerides and ethyl esters) presented antioxidant capacity (up to 92.12%), antibacterial activity and influenced the viability of fibroblasts, keratinocytes and oral carcinoma cells.

1. INTRODUÇÃO

O mundo produz 1,3 bilhões de toneladas de resíduos sólidos por ano e espera-se uma produção de 2,2 bi de toneladas até 2025 (HOORNWEG e BHADA-TATA, 2012). Indústrias são responsáveis pelo gerenciamento, transporte, tratamento e destinação final de seus efluentes que, se não tratados, ameaçam ciclos naturais onde são despejados, além do desperdício de substâncias com alto valor biológico e econômico encontradas nesses rejeitos. O impasse da correta manipulação de resíduos é seu alto custo, porém com uma gestão adequada, empresas podem equilibrar benefícios econômicos e diminuição de riscos ambientais (SHAHBAZI *et al.*, 2014).

Uma opção de destino de despejo do setor agroindustrial é seu uso como meio de cultura para Fermentação em Estado Sólido (FES) realizada por fungos, que se mostrou como alternativa à Fermentação Líquida por demandar menos custos e mão-de-obra (KAHIL e HASSAN, 2015), o que permite a obtenção de moléculas de interesse comercial resultantes do metabolismo dos micro-organismos, a implantação de um ciclo sustentável e a redução do valor do bioprocessos (DAS *et al.*, 2014).

Potenciais substratos pouco explorados são os grãos de destilaria secos com solúveis (*distiller's dried grains with solubles* - DDGS), que se referem a co-produtos da produção de etanol a partir de culturas como milho e sorgo (RACHBAUER *et al.*, 2015). Destilarias brasileiras aprimoraram seus processos produtivos graças ao apoio da iniciativa pública nos últimos anos pela busca de fontes de energia diferentes às fósseis (KONISHI *et al.*, 2014), portanto, o valor de seus resíduos tende à diminuição devido à rápida expansão da produção de etanol a partir de cereais, como já demonstram nos últimos anos. Em 2014, DDGS

apresentaram um custo 50% inferior em relação ao farelo de soja por tonelada de produto e 37% superior ao farelo de trigo (CLICMERCADO, 2014), substratos estes amplamente utilizados em FES. Já em 2015, a comparação de seus valores foi 64% inferior em relação ao farelo de soja por tonelada de produto e 16% superior ao farelo de trigo (CLICMERCADO, 2015).

Indústrias que exploram o potencial máximo de biomassas como matéria-prima para produção de biocombustíveis, produtos químicos, biomoléculas, entre outros, contemplando a necessidade de insumos renováveis e sustentáveis, recebem o nome de Biorrefinarias (BIZ *et al.*, 2016), que podem complementar a produção de etanol a partir de cereais de forma lucrativa com o uso de seus resíduos como substrato.

O mercado global de biocatalisadores movimenta ao ano cerca de 5 bi de dólares e apresenta crescimento exponencial, assim como a participação das lipases nesse mercado. Lipases são enzimas catalisadoras de reações de síntese e hidrólise que podem ser aplicadas em inúmeros processos, como produção de biodiesel e biorremediação. O principal problema relacionado à substituição de catalisadores químicos pelos enzimáticos está no alto custo das enzimas (FLEURI *et al.*, 2014 a e b), consequência do pequeno número de empresas dominantes em sua produção, ficando inacessíveis para o uso em larga escala na maioria dos casos (DEVASENA, 2010), sendo necessárias resoluções que diminuam custos.

Em geral, catálises químicas são rápidas e eficientes quando comparadas a catálises enzimáticas, motivo de serem utilizadas prioritariamente pelas indústrias. Porém, na catálise química a separação de produtos e catalisador é complexa; os resíduos podem ser contaminantes e corrosivos, características que aumentam o consumo de água e energia para tratamentos pós-reação; raramente o catalisador é reutilizável, além de inespecífico com o substrato. Processos com biocatalisadores

são extremamente versáteis, requerem menos energia, menos água e apresentam condições mais brandas, permitindo que o processo tenha custo menor e seja sustentável (SUN e CHENG, 2002), ademais, podem também ser escolhidos para que se adequem às condições da reação proposta. Com tantos benefícios ao meio ambiente, a catálise enzimática se mostra promissora por proporcionar um processo mais flexível e com menos gastos, devido à variedade de matéria-prima que pode ser utilizada, à purificação dos resíduos ser mais simples, com menor demanda energética, sem poluição e com a possibilidade de reutilização do catalisador (TAN *et al.*, 2010; FERNANDEZ *et al.*, 2016). Além disso, produtos de reações catalisadas por enzimas são pouco caracterizados; suas possíveis funções biológicas e celulares também representam uma nova vertente de pesquisa a ser investigada.

À luz do que foi discutido, a pesquisa aqui apresentada buscou um "Bioprocesso Ideal": otimização da produção de biomoléculas por FES com a utilização de substratos residuais, aplicação de biocatalisadores em reações voltadas à sustentabilidade como biorremediações e produção de biocombustíveis, além de investigar propriedades de produtos de reações que ofereçam vantagens para setores diversos (farmacêutico, cosmético, de alimentos), reduzindo resíduos, desperdício, uso de água, manutenção, poluição, custos e implementando sustentabilidade.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

- Produção de lipases fúngicas por FES utilizando DDGS de milho e sorgo e otimização das condições de fermentação;
- Caracterização bioquímica das lipases quanto à especificidade sobre cadeias de ácidos graxos diferentes, regioespecificidade e massa molecular;
- Aplicação das lipases selecionadas em reações de hidrólise (visando biorremediação), esterificação e alcoólise (visando produção de biodiesel);
- Estudo dos produtos de reações obtidos quanto ao potencial antioxidante, antimicrobiano, efeito sobre viabilidade celular e correlação de atividades biológicas com perfil químico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Fermentação em Estado Sólido (FES) é o cultivo úmido de micro-organismos em suportes inertes ou insolúveis que podem também servir como fonte de carbono e energia (HOLKER, 2004). Ocorre sem ou com pouca adição de água, tendo características próximas às que micro-organismos, principalmente fungos, estão adaptados (PANDEY, 2003); a fonte de oxigênio é o próprio ar presente no reator. Tradicionalmente, a Fermentação Líquida (FL) é utilizada pelas empresas produtoras de enzimas com o uso de cepas geneticamente modificadas e selecionadas para maior rendimento. Porém, há tempos pesquisas com FES indicam rendimento similar na produção das mesmas enzimas com cepas selvagens (FILER, 2001), o que simplifica e barateia o processo, entre outras vantagens.

Penicillium roquefortii, *P. camemberti* e *P. nalgoviensis*, que têm seus esporos amplamente utilizados pela indústria de alimentos (como para produzir queijos e salames), passaram a ser produzidos por FES, pois apresentaram melhor rendimento, homogeneidade e pureza (LARROCHE *et al.*, 1989).

Já em 1994, LEKHA e LONSANE demonstraram a diferença de tanases produzidas por *Aspergillus niger* em FES e FL. Por meio de FES, se produziu enzimas com taxa de hidrólise 4,8 vezes maior que as produzidas por FL com metade do tempo de fermentação, sendo mais estáveis a valores mais elevados de temperatura e pH, revelando o potencial de FES para a produção econômica de tanase. Em 1996, TENGARDY estimou os custos da produção de celulase por FL em US \$20/Kg, e US \$0,2/Kg em FES.

Fungos, leveduras e bactérias apresentam estratégias metabólicas diferentes frente às condições de FES ou FL. Ao se comparar parâmetros como taxa de crescimento, a FES demonstra superioridade na maioria dos casos (HOLKER, 2004); além disso, a repressão catabólica ou degradação de proteínas por proteases que ocorrem comumente na FL são aspectos facilmente contornados ou ausentes na FES (AGUILAR *et al.*, 2001). Confrontar dados de FES e FL é complexo por serem procedimentos antagônicos, porém micro-organismos (especialmente fungos e actinomicetos) envolvidos em FES apresentam potencial metabólico maior, afinal estão em ambiente similar ao seu habitat.

O uso de resíduos agroindustriais como substrato em FES é um dos elementos que permite o barateamento de seu processo, mas também influencia no progresso biotecnológico da técnica: a extensa gama de possibilidades para a produção de biomoléculas através de diversos substratos, indutores, condições, micro-organismos e suas combinações prejudicam a comparação com outras tecnologias de mesmos parâmetros para a discussão de resultados e determinação

de metodologias padrões e seus impactos (HOLKER, 2004). Essa dificuldade evidencia a necessidade de comunicação entre pesquisadores, empresas e governos. Com estudos aprofundados em um mesmo método, a FES poderá evoluir e ocupar o espaço que deve na produção de biomoléculas.

3.2. "*DISTILLER'S DRIED GRAINS WITH SOLUBLES*" (GRÃOS SECOS DE DESTILARIA COM SOLÚVEIS)

O Brasil foi pioneiro no investimento em biocombustíveis como alternativa aos de origem fóssil, garantindo energia, câmbio internacional e desenvolvimento da agricultura. Hoje, países como EUA, Canadá e China possuem a mesma estratégia, o que significa uma demanda crescente de etanol como aditivo e substituto de combustíveis fósseis (JOHNSON e SILVEIRA, 2014) e aumento na quantidade de resíduo produzido no decorrer da destilação. Exemplos de resíduos brasileiros que podem ser usados como substrato para FES são farelos, cascas, palhas, sementes e bagaços de inúmeros processos. Entre estes, em especial, devido à grande quantidade de geração, estão os resíduos de usinas de açúcar e álcool, como o bagaço de cana-de-açúcar e grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) (SOCCOL *et al.*, 2010).

Após a fermentação e destilação de grãos para a produção de etanol, os componentes não-voláteis são conhecidos como vinhaça, que é centrifugada, produzindo uma fração líquida (*syrup*) e uma fração sólida, os grãos destilados (DG). A fração líquida pode ser reutilizada no processo como fonte de água para a fermentação ou concentrada por evaporação, produzindo os solúveis destilados condensados (DS). Quando se une DG a DS, a mistura é chamada de grãos úmidos de destilaria com solúveis, que podem passar pelo processo de secagem

para facilitar seu transporte e armazenagem, sendo denominados então de *distiller's dried grains with solubles* - DDGS, grãos secos de destilaria com solúveis (LIU e HAN, 2011) (**Figura 1**).

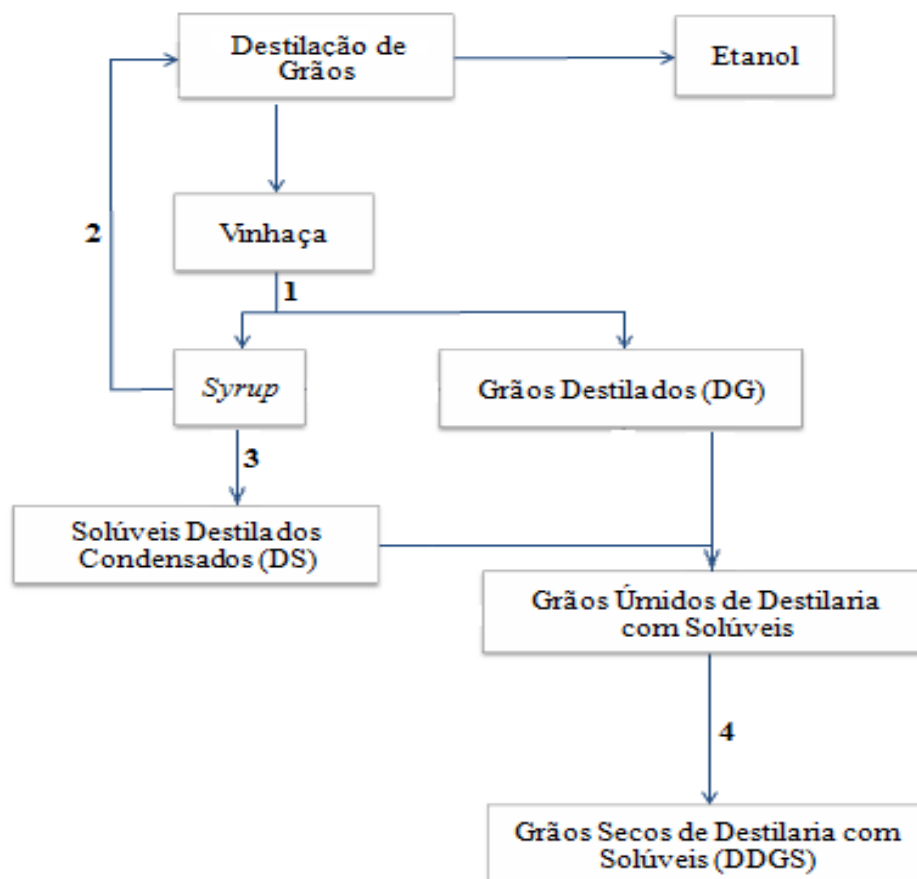


Figura 1. Processo de formação de DDGS, após fermentação de grãos. Os números indicados na figura elucidam as etapas que cada produto pode ser submetido. **1:** Centrifugação. **2:** Reutilização como fonte aquosa. **3:** Evaporação. **4:** Secagem.

DDGS representam aproximadamente um terço do peso da matéria-prima inicial e até 20% da margem de lucro de uma refinaria de etanol (WU *et al.*, 2010). São constituídos de aproximadamente 30% de proteína bruta, além de β -glucana, mananas e fibras (LIM e YILDIRIM-AKSOY, 2008), sendo que atualmente são utilizados como suplemento proteico na alimentação animal (MARTÍNEZ *et al.*, 2012). Em geral, os macrominerais encontrados em DDGS

são Ca, K, P, Mg, S e Na, variando concentrações entre 0,05% (Ca) e 1,15% (K); os microminerais são Cu, Fe, Zn, Mn, Al e Se, com concentrações que variam de 6 ppm (Cu) e 149 ppm (Fe). Os dados de concentração mineral e de proteínas em DDGS são os que mais oscilam entre estudos, pois o tipo de DDGS, seu local de plantio e o processo em que são formados (qualidade da água, temperatura, manutenção de equipamentos e condições do meio controlados por químicos, por exemplo) são diversos (LIU, 2011). Essa variação dificulta a formulação precisa de dietas, por exemplo, deficiência de proteínas pode reduzir a produtividade dos animais e o excesso pode causar problemas fisiológicos (BELYEA *et al.*, 2010), demonstrando que a destinação de DDGS para a alimentação animal não é ideal.

Um dos principais DDGS produzidos mundialmente é o de milho. Nos EUA, é a matéria-prima mais usada para a produção de etanol (YAN e BOIES, 2013), um processo de alto custo e com produtividade menor que as tradicionais (KOHLHEPP, 2010). Uma alternativa para diminuir custos e favorecer essa fonte de etanol é o uso de seus resíduos para finalidades economicamente rentáveis para que a produção excedente da *commodity* agrícola seja absorvida. Na safra 2012/13, o Brasil gerou 81,34 milhões de toneladas do produto, com 29 mi sobressalentes, muito acima do registro de 2011/12 de 5,17 mi (SILVEIRA, 2013). Segundo a Associação Brasileira dos Produtores de Soja e Milho (APROSOJA, 2014), a partir de 1 tonelada de milho, destilarias geram 220 Kg de DDGS, 380 a 400 L de etanol e 18 L de óleo degomado, com faturamento 3,5 vezes superior à venda do mesmo *in natura* (SILVEIRA, 2013). Em média, após a depleção de amido do grão e formação do DDGS, a proteína é concentrada 3,6 vezes; cinzas, 3,3 vezes e carboidratos totais, 2,9 vezes (HAN e LIU, 2010). A concentração lipídica em DDGS não varia muito da encontrada em sua matéria-prima. Em DG, o principal lipídeo encontrado é o triglicerídeo, assim como

fitosteróis, tocoferóis, tocotrienóis e carotenóides. No entanto, ao contrário da matéria-prima original (1-2% em milho), DG contêm quantidades anormalmente elevadas de ácidos graxos livres (6-8%) (LIU, 2011).

Em estudo comparativo, DDGS de milho apresentaram taxas maiores de extrato etéreo (E.E.) e menores de proteínas brutas (P.B.) que os de trigo. Em todos os DDGS testados (milho, trigo e triticale), as amostras continham de 2 a 4 vezes mais nutrientes (P.B., E.E.), menos amido que seus grãos originais e valores energéticos similares (CHRENKOVÁ *et al.*, 2012). No trabalho de ALDAI *et al.* (2010) foi inferido que, durante o processo de destilarias, os níveis de P.B. aumentaram de 7,4 até 32% e os de E.E. de 3,5 a 12% em DDGS de milho.

Além do milho, o sorgo representa uma excelente alternativa como biomassa para fonte energética devido à sua alta produção (LODGE *et al.*, 1997). Seus grãos têm constituição química semelhante à do milho e também são usados na produção de álcool em destilarias de moagem a seco. O aumento da produção de sorgo brasileiro resulta de fatores diversos: a expansão na região Centro-Oeste, por exemplo, se deu pelo sistema de plantio direto com alternância de leguminosas (soja) no verão e de gramíneas no inverno, dentre elas o sorgo para a formação de palhada, com o intuito de proteção do solo e lucro com a venda dos grãos. O sorgo tem sido explorado também como segunda safra, quando por problemas climáticos como a seca, a época recomendada de plantio do milho termina, sendo menos arriscado o plantio do sorgo, que é uma cultura mais resistente, mesmo que economicamente menos rentável (TSUNECHIRO *et al.*, 2002). Seus DDGS apresentam um custo 50% inferior em relação ao farelo de soja por tonelada de produto e 37% superior ao farelo de trigo (CLICMERCADO, 2014), com tendência à diminuição.

WU *et al.* (2010) realizaram experimentos com foco na composição química de 13 diferentes espécies de sorgo e seus DDGS. Valores de amido entre sorgo e milho foram similares (~70%). As taxas de amido nas plantas anterior à destilação (a.d.) variaram entre 62,9% e 73,5%; nos DDGS, o amido residual oscilou entre 0,60% e 2,66%, diminuição esperada pós-fermentação (p.f.). Valores de proteínas brutas a.d. ficaram entre 8,75% e 14,47%; p.f., 30,70% e 42,21%, aumento de concentração comum, encontrado em todos DDGS. Extrato etéreo a.d. foi detectado entre 2,82% e 5,52%; p.f., 4,24% e 12,20%. As fibras brutas (F.B.) a.d. variaram entre 1,91% e 3,69%; p.f., 4,75% e 7,71% e as cinzas a.d., 1,35% e 2,55%; p.f., 4,75% e 7,47%. Para amilose, foram encontrados valores a.d. entre 6,26% e 29,2%.

BOTELHO (2015) determinou a composição dos DDGS utilizados neste projeto, sendo os de sorgo constituídos de 38,7% de proteínas; 7,96% de E.E.; 10,70% de fibras e 2,18% de cinzas, aminoácidos livres, cálcio e fósforo; já os de milho, 32,46% de proteína; 7,71% de E.E.; 11,58% de fibras e 5,01% de cinzas, aminoácidos livres, cálcio e fósforo.

A variedade de resíduos agro-industriais que podem ser utilizados como meio de cultivo para fungos produtores de biomoléculas de interesse industrial é ampla, o que abre muitas possibilidades para a pesquisa experimental. Deve-se continuamente buscar os efluentes mais próximos, mais custosos à indústria, ainda com substâncias de interesse em sua composição, de difícil tratamento e/ou que causem mais danos ao ambiente para serem testados; e que usos alternativos sejam descobertos, beneficiando produção, rendimento e meio ambiente. Ao se elucidar a composição de DDGS, fica evidente que seu potencial de aplicação vai além de alimentação animal.

Os estudos de HAN e LIU (2010), LIU (2011), WU *et al.* (2010), CHRENKOVÁ *et al.* (2012), ALDAI *et al.* (2010) e BOTELHO (2015), citados como referência para a constituição química de DDGS, demonstraram que a composição desses resíduos (taxas de lipídeos, proteínas, carboidratos, fibras) permite o crescimento microbiano com produção de lipases, assim como WU *et al.* (2010), YAN e BOIES (2013), KOHLHEPP (2010), SILVEIRA (2013), LODGE *et al.* (1997) e TSUNECHIRO *et al.* (2002) demonstraram as vantagens econômicas de usá-los como substrato. O uso de DDGS como substratos para o crescimento fúngico e produção de lipases é inovador, principalmente sem que indutores e suplementos sejam utilizados.

3.3. PRODUÇÃO DE LIPASES PARA APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE

A maior parte do mercado industrial de biocatalisadores é ocupada por enzimas hidrolíticas como as proteases, amilases, esterases e lipases (GERBER *et al.*, 2013). Lipases apresentam características bioquímicas peculiares, sendo as etapas de caracterização essenciais para que as melhores condições reacionais sejam estabelecidas de acordo com sua ação (FLEURI, 2016).

Lipases (E.C. 3.1.1.3), denominadas triglicerídeo acil-hidrolases, catalisam a hidrólise da ligação éster de triglicerídeos em meio aquoso, produzindo glicerol e ácidos graxos livres. É uma reação sequencial quanto aos grupos acila do glicerídeo: em dado momento a mistura reacional contém, além do descrito acima, diglicerídeos e monoglicerídeos (LOPES *et al.*, 2011). É uma reação que pode ser extrapolada para a biorremediação de óleos e gorduras residuais de processamentos domésticos, comerciais e industriais (AGEITEC, 2015).

Derramamentos de óleo de refinarias, fábricas e suas águas residuais contaminantes podem ser tratados por lipases de origens diversas (biorremediação). Embora há anos se conheça tecnologias de controle para a poluição causada por vazamentos de petróleo em solos, atualmente as metodologias para acelerar a degradação de hidrocarbonetos no mar não envolvem catalisadores biológicos ou estão pouco caracterizadas (RON e ROSENBERG, 2014). Outra aplicação importante relatada foi na degradação de resíduos de poliéster e de remoção de depósitos de biofilme em equipamentos de resfriamento (PATEL *et al.*, 2016).

MITA *et al.* (2016) estudaram a biorremediação realizada por lipase de *Candida rugosa* de águas poluídas por ftalatos, usados em inúmeros produtos, principalmente plásticos, que podem causar câncer e abortos. O tratamento foi eficaz, com porcentagem de decréscimo de ftalatos de até 100%, além de afetar apenas a molécula alvo, deixando inalteradas as concentrações de outros componentes.

KUMAR *et al.* (2012) objetivaram biorremediar óleo de cozinha usado com lipase produzida por *Penicillium* sp. em FES contendo gordura residual e farelo de trigo. A taxa de ácido pós-tratamento enzimático do óleo aumentou de 50 a 69%, abrindo novas vias para a aplicação desta lipase em diversas aplicações industriais.

A biorremediação enzimática utilizando lipases provenientes de resíduos para a neutralização de óleos residuais se mostra então como alternativa viável econômica e ecologicamente, além de possuir caráter inovador.

3.4. PRODUÇÃO DE LIPASES PARA APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE SÍNTESE

Lipases são também capazes de catalisar reações reversas à hidrólise em condições micro-aquosas, como esterificação e alcoólise (SANTOS *et al.*, 2014).

- Esterificação

A esterificação de ácidos graxos livres ocorre convencionalmente com a utilização de catalisadores químicos como HCl ou H₂SO₄. Após a reação, estes aceleradores são removidos dos produtos durante as etapas de lavagem e purificação, gerando uma quantidade significativa de água residual que deve ser neutralizada antes de seu descarte, além de causar corrosão em encanamentos e equipamentos, com possível formação de resíduos indesejáveis e restrição de uso para indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia por serem agressivos e prejudiciais à saúde (ADAK e BANERJEE, 2016). Este cenário demonstra a importância do desenvolvimento de processos que combinem rendimento satisfatório com purificação simples, sustentando o uso de catalisadores biológicos como alternativa.

Reações de esterificação entre glicerol e os ácidos láurico, mirístico, palmítico e oleico foram realizadas por FREITAS *et al.* (2010) em sistema isento de solvente, tendo como catalisador lipase extraída de fungo *Penicillium* sp. Os valores mais elevados foram obtidos com os ácidos mirístico e palmítico. As conversões (porcentagem de ácido graxo consumido) atingiram 80%, tendo a concentração de 1-monoglicerídeos (importante emulsionante alimentar) duas vezes maior que a de diglicerídeos, sendo a de triglicerídeos baixa. Os resultados obtidos por síntese enzimática sob as condições experimentais foram semelhantes

aos obtidos por glicerólise química das gorduras e óleos, mas sem o inconveniente de produtos secundários como a acroleína, poliéteres, poliésteres ou glicerol (tóxicos para consumo e poluentes).

LIU *et al.* (2016) propuseram um método de dois passos para sintetizar 1,3-oleil-2-palmitoilglicerol (OPO), importante ingrediente de leites sintetizados para crianças, utilizando lipase de *Candida* sp. Primeiro, tripalmitina foi transformada em monopalmitina (2-MP) e, em seguida, o 2-MP foi esterificado com ácido oleico. Em ambas as etapas utilizando a mesma enzima um rendimento de 65% de OPO foi obtido. Este estudo mostrou que o método de dois passos com o uso de lipase pode apresentar rendimento elevado de OPO, até mesmo superior ao método tradicional.

A catálise química é ainda predominante nas indústrias de inúmeros setores. Como exemplo, o biodiesel é produzido tradicionalmente no Brasil a partir da transesterificação ácida ou alcalina de óleos virgem (70% do processo é feito com óleo de soja) por apresentar altos rendimentos em curto tempo. No entanto, é um método que afeta o meio ambiente (TAN, 2010; FERNANDEZ, 2016), pois demanda alto consumo de energia e água, necessita de tratamentos pós-processo; há a formação de sabão e a recuperação do glicerol é dificultada, causando poluição sem reaproveitamento de elementos do processo como subprodutos e o próprio catalisador químico (BANERJEE e CHAKRABORTY, 2009).

Lipase de *Candida* sp. foi utilizada para a produção de biodiesel por esterificação de ácidos graxos de cadeia longa e metanol. O grau de esterificação de 92,8% foi obtido com ácido oleico após 12 h de reação. Os resultados mostraram também que a temperatura, o pH, a concentração do substrato, a

dosagem da enzima e a pureza afetam fortemente a esterificação (WANG *et al.*, 2014).

O biodiesel pode também ser produzido pela reação de hidrólise seguida de esterificação, separadamente, o que permite explorar as características individuais de cada lipase envolvida nesse processo, como o pH, temperatura e especificidade enzimática (FLEURI *et al.*, 2009; FLEURI *et al.*, 2011; FLEURI *et al.*, 2014b), podendo evitar desperdício e maior eficiência no processo.

KABBASHI *et al.* (2015) realizaram a hidrólise de óleo de *Jatropha curcas* para a produção de biodiesel utilizando lipase de *Candida cylindracea*. Com 8% de catalisador, obteve-se até 78% de ácido graxo livre, que podem ser esterificados para a produção de biodiesel.

WANG *et al.* (2014) produziram biodiesel menos suscetível à cristalização a partir de óleo de cozinha usado. Primeiro o óleo foi hidrolisado em ácidos graxos livres, que posteriormente foram convertidos em ésteres de metil e isopropil, ambas as reações realizadas por lipase de *Candida* sp. A utilização de lipase reduziu significativamente a poluição ambiental em comparação aos catalisadores químicos utilizados corriqueiramente, provando a possibilidade de se desenvolver bioprocessos sustentáveis, baratos e simples.

- Alcoólise

A formação de ligações éster a partir de um álcool e ácido carboxílico é chamada de alcoólise (um tipo de transesterificação) (BARROS *et al.*, 2010), reação que também pode ser catalisada por lipases.

A alcoólise pode ser aplicada na produção de biodiesel (ésteres de álcool de cadeia curta e ácidos graxos de cadeia longa), a partir de óleos vegetais. O biodiesel é uma alternativa para a contemporânea dependência de combustíveis

fósseis, grandes causadores de poluição, de fonte não renovável e com grandes questões pela disputa de seu domínio (LIMA, 2007). Entretanto, o custo de produção de biodiesel ainda é elevado; a utilização de resíduos como matéria-prima, como óleo de cozinha usado, e o aumento da eficiência do processo, são estudados para a redução de gastos. O uso de lipase para a produção de biodiesel por alcoólise tem mostrado resultados promissores na melhoria da eficiência. É grande a variedade de fontes e métodos; o equilíbrio entre produção enzimática de biodiesel e produtividade do processo são os focos (NIELSEN *et al.*, 2008).

No estudo de FERNANDEZ (2016), biodiesel foi produzido em larga escala a partir de óleo de soja virgem por catálise alcalina (Caso 1) ou por catálise enzimática (Caso 2). O Caso 3 foi conduzido por catálise enzimática sobre óleo de soja usado. Os resultados revelam que no Caso 3 recursos naturais praticamente não foram necessários e o Caso 2 demonstrou que é possível aumento de escala na produção com o uso de enzimas. Ambos os casos mostraram influência no meio ambiente na produção de biodiesel, pois o uso de energia elétrica e térmica foi mais eficiente, diminuindo impactos e mostrando que produtos químicos e eliminação de resíduos podem ser bem gerenciados e substituídos.

Para contornar a questão do tempo extenso que lipases podem levar para a transesterificação do biodiesel, SIVARAMAKRISHNAN e INCHAROENSAKDI (2017) testaram variações dos aspectos envolvidos na reação com biocatalisadores de *Candida antarctica* sobre óleo extraído da micro-alga *Botryococcus* sp. Alcançou-se um rendimento de 88% de ésteres metílicos em 4 h com aplicação de ultra-som e de 78% após 36 h de reação sem ultra-som.

BHANGU *et al.* (2017) também conduziram a produção de biodiesel a partir de óleo de canola com lipase de *Candida rugosa* e estímulos ultra-sônicos, reduzindo o tempo de reação de 22-24 h para 1,5 h, demonstrando que ultra-som

de baixa intensidade é eficiente para o procedimento e uma ferramenta promissora.

Os estudos mostram que a síntese de biodiesel catalisada por enzimas é possível em larga escala, pois há alternativas para as desvantagens que podem apresentar.

3.5. PRODUTOS DE REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

Os produtos de todas as reações até então descritas podem apresentar atividades biológicas, porém são pouco estudados. Os ácidos graxos livres ou mono e diglicerídeos resultantes de reação de hidrólise, os ésteres etílicos ou metílicos resultantes de reações de esterificação e alcoólise podem apresentar potencial antimicrobiano, antioxidante e antineoplásico e devem ser caracterizados com o intuito de correlacionar atividade biológica com estrutura química, vertentes inovadoras deste setor.

Os produtos podem apresentar atividade antioxidante caso apresentem capacidade de doar elétrons para radicais livres de oxigênio resultantes do metabolismo celular, inibindo ou retardando a oxidação que tais radicais podem desencadear por serem muito reativos, causando estresse oxidativo, com consequentes danos funcionais aos organismos como câncer, enfisema pulmonar, doenças inflamatórias e cardiovasculares (WOLLINGER *et al.*, 2016).

O efeito antimicrobiano de ácidos graxos sobre bactérias, fungos, vírus e protozoários não é recente (ISAACS *et al.*, 1995; OGBOLU *et al.*, 2007), mas a atividade antimicrobiana de ácidos graxos oriundos de reações catalisadas por enzimas obtidas de fermentação de descartes industriais, bem como a ação

sinérgica de várias frações lipídicas obtidas do mesmo modo, é inovadora e apresenta alto potencial.

Já a atividade antitumoral é descrita principalmente em relação aos ácidos graxos, que por diferentes mecanismos de ação, podem ser tóxicos sobre diversas células cancerígenas (JIANG *et al.*, 1998), abrindo espaço para a continuidade do estudo com essas moléculas isoladas e com efeito sinérgico com outros derivados lipídicos obtidos por ação de lipases.

Deve-se considerar também a influência mútua entre as atividades biológicas e os produtos de reação: a ação antimicrobiana pode estar diretamente associada à capacidade antioxidante dos produtos, assim como pode ser uma das causas da interferência exercida em metabolismos de células sadias e cancerígenas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. TRIAGEM DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES

Catorze dos dezoito fungos utilizados para a produção de lipases foram obtidos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ): *Aspergillus brasiliensis* (INCQS 40036), *A. cervinus* (INCQS 40025), *A. flavipes* (INCQS 40024), *A. fumigatus* (INCQS 40014), *A. niger* (INCQS 40015), *A. niger* (INCQS 40065), *A.oryzae* (INCQS 40068), *Chaetomium globosum* (INCQS 40072), *Fusarium moniliforme* (INCQS 40151), *F. solani* (INCQS 40099), *Penicillium thomii* (INCQS 40064), *P. verruculosum* (INCQS 40031), *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (INCQS 40290) e *Trichoderma koningii* (INCQS 40331). Quatro foram isolados

em projetos anteriores e são pertencentes ao Laboratório de Bioprocessos: *Aspergillus niger* 01, *Fusarium* sp. 13, *Penicillium* sp. 02 e 09.

Os fungos foram conservados em tubos inclinados contendo *Potato Dextrose Agar* (PDA) como meio de cultivo, em incubação a 30°C por 96 h e mantidos posteriormente a 5°C, sob camada de vaselina estéril. São repicados a cada três meses de armazenamento para a manutenção das linhagens.

A produção de lipases pelos fungos foi realizada através de Fermentação em Estado Sólido (FES) como descrito por FLEURI *et al.* (2014 a e b), utilizando como substratos DDGS de milho e sorgo, gentilmente doados pela empresa Cereale Brasil Agroindustrial LTDA, localizada na cidade de Dois Córregos (SP/Brasil).

Os meios de cultura foram compostos por 10 g de substrato e 10 mL de água (m/v) em erlenmeyers de 250 mL, sem a adição de indutores ou nutrientes, e esterilizados por 15 min a 121°C, 1 atm de pressão. Posteriormente, foram inoculados com 2 mL de suspensão de esporos (10^7 /mL) e incubados a 30°C por 96 h. Após incubação, 50 mL de água destilada foram adicionados a cada frasco, homogeneizados manualmente com bastão de vidro por 1 h em intervalos regulares e filtrados em gaze, obtendo-se os extratos enzimáticos, que foram considerados então fontes de lipases para a determinação das atividades enzimáticas descritas a seguir.

4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASES

- Atividade de Hidrólise

A atividade lipolítica dos extratos enzimáticos foi medida seguindo o método descrito por MACEDO *et al.* (1997) modificado, utilizando como

substrato 5 mL de emulsão de azeite de oliva extra virgem e solução de goma arábica 7%, 1 mL de tampão fosfato 0,01 M, pH 7 e 1 mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada por 30 min a 40°C em banho-maria com agitação de 130 opm. A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de acetona:etanol (1:1, v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH (0,05 M), utilizando fenolftaleína como indicador e o ensaio branco (mesma reação sem adição de extrato enzimático) como referência. Cada unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 μ mol de ácido graxo por min nas condições de ensaio.

- Atividade de Esterificação

Foi analisada segundo o método descrito por TALUKDER *et al.* (2007) modificado, em que 0,04 g de extrato enzimático liofilizado foi adicionado a frascos com tampa de rosca contendo 0,4 mL de ácido láurico (0,2 M), 0,37 mL de dodecanol (0,2 M), 10 mL de isoctano e 0,01 mL de tampão fosfato 0,01 M, pH 7. Esse sistema foi incubado por 30 min a 37°C com agitação de 130 opm em banho-maria. A reação foi paralisada pela adição de 10 mL de acetona:etanol (1:1, v/v) e os ácidos remanescentes foram titulados com NaOH (0,05M) e fenolftaleína como indicador e o ensaio branco (mesma reação sem adição de extrato enzimático) como referência. Uma unidade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de dodecanollaurato por min nas condições de ensaio.

- Determinação de Proteínas Totais

A quantidade de proteínas existente nas amostras foi analisada como descrito por GORNALL *et al.* (1949) modificado, com 0,9 mL de sulfito de sódio

24%, 4 mL de reativo de biureto e 0,1 mL de extrato enzimático. A combinação repousou por 30 min em temperatura ambiente e foi medida em espectrofotômetro a 535 nm. A curva de referência foi feita com caseína e as atividades específicas de lipases foram determinadas conforme **Equação 1**.

$$\text{Eq. 1. Atividade Específica (U/mg)} = \frac{\text{Atividade de Lipase (U/mL)}}{\text{Concentração de Proteínas Totais (mg/mL)}}$$

4.3. CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Os extratos enzimáticos brutos foram submetidos ao processo de *salting out* (DUONG-LY e GABELLI, 2014), com 40%, 60% e 80% de saturação de sulfato de amônio; para isso, a quantidade de sal a ser adicionada em cada amostra teve como parâmetro 243 g/L. Após a adição do sal, as amostras foram centrifugadas a 5°C, em 6.000 rpm, por 30 min; o sobrenadante foi reservado para que outras concentrações fossem realizadas e o precipitado foi passado para filmes de celulose para diálise em água destilada e gelo, trocada a cada 6 h por 48 h. Nos extratos precipitados, foram realizados os ensaios de atividade de hidrólise e de proteínas totais para que a eficácia da concentração fosse testada.

A concentração dos extratos enzimáticos também foi realizada por liofilização a -90°C, por 60 h.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS LIPASES

As lipases foram caracterizadas quanto à especificidade e regioespecificidade, sendo também determinadas as massas moleculares das proteínas presentes no extrato bruto de lipases.

- Especificidade

A afinidade de lipases por ácidos graxos de cadeia curta, média ou longa foi avaliada com os extratos enzimáticos de maior atividade hidrolítica.

O estudo da especificidade sobre ácidos graxos de cadeia curta foi conduzido como descrito por CALADO *et al.* (2002) e LOPES *et al.* (2011) modificados. O meio reacional foi composto por 3,47 mL de substrato sintético butirato (1,12 mM) em tampão Triton X-100 (0,2%)/tetrahidrofurano (0,43 M) e 0,01 mL de extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho-maria a 40°C sem agitação, por 15 min. As amostras foram então centrifugadas em 6.000 rpm, a 5°C por 5 min e analisadas em espectrofotômetro com 405 nm.

Já a especificidade sobre ácidos graxos de cadeia média foi descrita por GUTARRA *et al.* (2009) modificado, tendo como meio reacional 0,25 mL de laurato (2,5 mM) em tampão fosfato 0,5 M, pH 7 e 0,05 mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 30°C sem agitação por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 5°C por 5 min, em 6.000 rpm, e verificadas as absorbâncias em espectrofotômetro com 412 nm.

Por último, a metodologia para análise da ação das lipases sobre ácidos graxos de cadeia carbônica longa foi descrita por BRASIL (2009). As amostras foram constituídas por 0,99 mL de emulsão (substrato de 3 mg.mL⁻¹ de palmitato em isopropanol + solução emulsionante de Triton X-100, goma arábica e tampão

Tris-HCl 50 mM, pH 8) e 0,01 mL de extrato enzimático, que permaneceram em banho-maria sem agitação por 15 min a 40°C. Posteriormente, foram centrifugadas em 6.000 rpm, a 5°C por 5 min e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com 410 nm.

Os resultados foram submetidos a teste de normalidade, análise de variância e teste de Tukey pelo *software* Assistat 7.7 pt, assim como pelo *software* GraphPad Prism 6, no qual foi aplicado o teste One-way ANOVA (não paramétrico) com posterior teste de Tukey, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e $p < 0,0001$, considerado altamente significativo.

- Regioespecificidade

De acordo com MEGHWANSHI *et al.* (2006) modificado, a regioespecificidade foi realizada por cromatografia em camada delgada. 0,5 mL de trioleína e 2,5 mL de extrato enzimático foram incubados a 40°C, por 24 h em shaker com 100 rpm; a alíquota de 500 µL do produto dessa reação foi adicionado 1,5 mL de éter etílico e essa mistura foi aplicada em placa de sílica gel 60F (Merck, Alemanha), juntamente com os produtos de reação da ação da lipase 1,3-específica de *Rhizomucor miehei* obtida de *Sigma Aldrich*®, St. Louis (EUA) como parâmetro de comparação. Após aplicação, a placa foi incubada em sistema solvente (fase móvel) de éter de petróleo, éter etílico e ácido fórmico, nas proporções 210:90:0,9 (v:v:v), respectivamente, até que quase sua totalidade absorvesse o sistema móvel por capilaridade. A placa foi então passada em solução reveladora composta por ácido sulfúrico 10% em etanol, seguido de incubação em estufa a 100°C.

- *Massa Molecular*

O teste para determinação de massa molecular das proteínas encontradas no extrato enzimático selecionado foi realizado por SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel eletrophoresis*), descrito por WEBER e OSBORN (1969). Alíquota de sobrenadante da centrifugação de 0,1 mL de extrato enzimático em 0,5 mL de tampão fosfato 0,01M, pH 7 foi aquecida por 3 min a 70°C em presença de dodecil sulfato de sódio e mercaptoetanol, para então ser aplicada no gel de poliacrilamida (4% no de concentração e 8% no de separação), juntamente com padrões para comparação de massa molecular (*Precision Plus Protein Dual Color Standarts - BioRad®*), que variaram entre 15 e 250 kDa, na presença de tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8. O sistema correu em cuba vertical de *Mini Protean (BioRad®)* com corrente de 80V seguida de 100V e a coloração do gel foi realizada com nitrato de prata.

Para o cálculo da massa molecular das proteínas foi utilizada a equação da reta obtida da relação entre fator de retenção (Rf), calculado conforme **Equação 2**, e log de massa molecular dos padrões.

$$\text{Eq. 2. } R_f = \frac{\text{Distância Percorrida pelas Proteínas do Extrato Enzimático ou Padrões}}{\text{Distância Percorrida pela Fase Móvel}}$$

4.5. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES

A combinação entre fungo e DDGS que implicou em lipases de maior atividade hidrolítica foi otimizada quanto às condições de produção com ensaios totalmente aleatorizados. Foram avaliadas as variáveis independentes umidade inicial do meio de cultivo (%), tempo de crescimento do inóculo (h) e tamanho da

partícula do substrato (padronizado em mm com o auxílio de peneiras granulométricas) (**Tabela 1**). Para isso, foi utilizado planejamento fatorial englobando 8 ensaios somado a 3 repetições no ponto central (2^n + três pontos centrais, onde n é o número de variáveis independentes), conforme metodologia descrita por BARROS-NETO (2001). O experimento foi conduzido por 96 h de fermentação nos reatores.

Tabela 1. Níveis codificados e valores reais do planejamento fatorial para a produção de lipases fúngicas em DDGS.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	+1
Umidade Inicial (%)	50	100	150
Crescimento Inóculo (h)	72	96	120
Tamanho das Partículas (mm)	<1000	1000	>1000

Esta etapa foi realizada com o auxílio da mestrandia Milene Stefani Pereira e o estudante de iniciação científica João Vitor Inácio da Silva (Laboratório de Bioprocessos).

A otimização foi analisada pelo programa computacional Statistica 6.0, utilizando o Experimental Design (StatSoft Inc., 2013).

4.6. APLICAÇÃO DAS LIPASES

As lipases concentradas dos extratos enzimáticos com maior atividade hidrolítica foram aplicadas na biorremediação (reação de hidrólise) e na produção

de biodiesel (reações de esterificação e alcoólise), como descrito por FLEURI *et al.* (2014), modificado.

- Biorremediação de Óleos Vegetais

Alíquotas de 1,5 mL de óleo de girassol e milho (separadamente) reagiram com 0,5 mL de extrato enzimático e o sistema foi incubado por 24 h em banho-maria a 100 rpm a 40°C. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,05 M, utilizando fenolftaleína como indicador. A hidrólise foi calculada com base nos resultados dos controles, sem adição de extrato enzimático, como demonstrado na **Equação 3**.

$$\text{Eq. 3. Taxa de Hidrólise} = \frac{\text{Volume Titulado da Amostra (mL)}}{\text{Volume Titulado do Controle (mL)}}$$

- Produção de Biodiesel

Na reação de esterificação, o sistema reacional foi composto por 1,4 mL de ácido oleico, 1,45 mL de etanol e 5% de extrato enzimático em relação à massa total de reagentes, incubados a 40°C, 130 rpm durante 48 h e 96 h em banho-maria. Para a determinação da taxa de esterificação, a mistura de reação foi paralisada adicionando solução de acetona:etanol (1:1, v/v) e os ácidos graxos restantes foram titulados com solução de NaOH 0,5 M, utilizando fenolftaleína como indicador. A esterificação foi calculada com base nos resultados dos controles, sem adição de extrato enzimático, indicada na **Equação 4**.

$$\text{Eq. 4. Taxa de Esterificação} = \frac{\text{Volume Titulado da Amostra (mL)}}{\text{Volume Titulado do Controle (mL)}}$$

O teste de aplicação das lipases na produção de biodiesel por alcoólise teve como meio reacional 2,7 mL de óleo de soja e milho (separadamente), 0,6 mL de etanol e 5% de extrato enzimático. O sistema foi incubado em banho-maria a 100 rpm à 40°C por 72 h, sendo que em 24 e 48 h, 0,3 mL de etanol foi adicionado. Os ésteres etílicos produzidos foram detectados por cromatografia em camada delgada nos mesmos parâmetros descritos no item 4.4., no entanto, comparados aos padrões de oleato de etila e palmitato de etila.

4.7. PERFIL DOS PRODUTOS DE REAÇÕES

A análise dos produtos de reação de hidrólise e alcoólise foi realizada em parceria com a Prof^a. Dr^a. Marcia Ortiz Mayo, do Instituto Agronômico de Campinas. As amostras foram preparadas de acordo com O'FALLON *et al.* (2007) modificado. O volume de 100 µL de produtos de hidrólise foi adicionado em tubo falcon, juntamente com 1,5 mL de NaOH 0,5M diluído em metanol. A mistura foi incubada a 100°C por 5 min, sendo então resfriada para a adição de 4 mL de esterificante BF₃ - MeOH 14% (*boron trifluoride-methanol*). Em seguida, a mistura foi novamente aquecida a 100°C por 5 min e resfriada. A extração dos ésteres formados foi realizada por adição de 2 mL de heptano, 5 mL de solução saturada de NaCl e homogeneização em vórtex por 2 min. Após a separação de fases, o sobrenadante foi analisado em cromatografia gasosa de alta eficiência.

Para os produtos de alcoólise, 4 mL de solução saturada de NaCl foram adicionados a 100 µL de amostra e homogeneizados em vórtex por 30 s, seguido de adição de 5 mL de hexano, com 30 s de homogeneização em vórtex

novamente. Após a separação de fases, o sobrenadante foi analisado em cromatografia gasosa de alta eficiência.

Os ésteres etílicos resultantes das preparações de amostras foram injetados em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010/AOC-20i) e cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP- 5000, Kyoto, Japão), operando com 70 eV de impacto de elétrons, ambos dotados de coluna capilar de sílica fundida DB-5 e OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), respectivamente. O gás de arraste foi o hélio, com vazão de 1,7 mL min⁻¹, injetor a 280°C, detector a 300°C, *split* 1/30 e o seguinte programa de temperatura: 180°C (10 min⁻¹), - 280°C (5 min⁻¹), 280°C (10 min⁻¹). A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos e a identificação realizada pela comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os de padrões comerciais de ésteres etílicos de ácidos graxos e análise comparativa dos espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62.lib) (EBRAHIMI *et al.*, 2012).

4.8. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PRODUTOS DE REAÇÕES

Produtos de reação de hidrólise e alcoólise foram aplicados em testes de atividades biológicas. Além das amostras, os testes também foram realizados com o meio de reação sem adição de extrato enzimático ("branco de óleo") e com o meio de reação contendo a enzima desnaturada por 5 min em ebulição ("branco de amostra"). Esses procedimentos foram adotados para que a ação dos produtos de reação fosse comprovada e não confundida com a de outros constituintes do meio reacional.

- Atividade Antioxidante

Determinou-se a atividade antioxidante dos produtos de reação utilizando o método de DPPH segundo ZHU *et al.* (2002) e CHEN *et al.* (2003) modificados. O meio reacional foi composto por 1,5 mL de etanol, 0,15 mL de solução de DPPH 0,02% e 0,25 mL de produto de reação, mantidos em repouso por 60 min no escuro e analisados em espectrofotômetro em 517 nm.

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade, análise de variância e teste de Tukey pelo *software* Assistat 7.7 pt.

- Efeito sobre Viabilidade Celular

Os produtos de reação foram testados quanto à capacidade de influenciar na proliferação ou inibição celular seguindo recomendação da ISO (*International Organization for Standardization*) 10993-5/12, de 2009, através de redução de sal MTT [(brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] por mitocôndrias de células NIH-3T3 (fibroblastos de camundongo normais), HaCaT (queratinócitos humano normais) e SCC-9 (carcinoma epidermóide bucal). As células foram conservadas em *dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 ng/mL de sulfato de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina, acondicionadas em estufa úmida a 37°C, 5% de CO₂. Para SCC-9, o meio de cultura foi suplementado com 400 ng/mL de hidrocortisona.

Para cada linhagem celular, o plaqueamento foi realizado 24 h antes do tratamento na densidade de 1×10^4 células/poço (96). Os produtos de reação foram aplicados em três volumes diferentes, 10, 20 e 40 µL, com três repetições cada (n = 9), na presença de meio de cultura nas mesmas condições usadas para a conservação das células citadas anteriormente, com volume proporcional ao dos

produtos para volume final nos poços de 200 µL; após 24 h de exposição, o meio de cultura foi retirado dos poços e adicionado MTT (1 mg/mL). Todas as linhagens tiveram grupo controle de células tratadas apenas com meio de cultura. A placa foi então incubada em estufa por 3 h a 37°C. Após esse período, o sal foi removido e adicionado 1 mL de solvente DMSO (dimetilsulfóxido), que solubiliza a cor azul formada por células viáveis a partir do sal MTT reduzido. A absorbância do corante foi medida a 570 nm utilizando leitor de microplacas *SYNERGY-HTX multi-mode reader*, Biotek, EUA. Essa etapa foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Willian Zambuzzi, o Dr. Rodrigo Augusto da Silva e o doutorando Célio Júnior da Costa Fernandes (Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular – LaBio).

Para a análise estatística, foi utilizado o *software* Prism 6 e aplicados os testes ANOVA e Tukey.

- Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada de acordo com MOTTA e BRANDELLI (2002) com modificações. Alíquotas de 60 µL de produtos de reação foram inoculadas em disco de difusão nas placas com as estirpes indicadoras. Foram testadas cinco espécies bacterianas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 27853), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Estas foram inoculadas na concentração de 10⁸ UFC/mL em placas de ágar *Müller-Hinton* e incubadas a 35°C por 24 h. Utilizou-se como controle negativo solução salina, discos de gentamicina como controle positivo e foi conferida a presença ou ausência de formação de halos de inibição de crescimento.

- Atividade Antifúngica

O teste de influência dos produtos de reação sobre crescimento fúngico foi realizado com as cepas *Aspergillus fumigatus* (IOC 0081), *Candida albicans* (IOC 2508), *Fusarium oxysporum* (IOC 4065) e *Penicillium expansum* (IOC 4076). Os fungos foram cultivados em tubos inclinados contendo *Potato Dextrose Agar* (PDA), com crescimento de 120 h a 30°C. Após incubação, foram adicionados 6 mL de água destilada esterilizada em cada tubo inclinado, homogeneizados com auxílio de alça e espalhados em placas de PDA. Os parâmetros do teste foram similares aos de antibacteriano, utilizando discos de difusão para retenção das amostras, sendo que as placas com os produtos foram incubadas a 30°C por 72 h. Utilizou-se como controle negativo solução salina, anfotericina B (1 ug/mL) como controle positivo e foi conferida a presença ou ausência de formação de halos de inibição de crescimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TRIAGEM DE MICRO-ORGANISMOS E ATIVIDADES DE LIPASES

Os testes quanto à produção de lipases em DDGS de milho e sorgo (atividades de hidrólise e esterificação) foram realizados em extratos enzimáticos brutos e liofilizados. Apenas a atividade de hidrólise dos extratos brutos foi o parâmetro para selecioná-los a partir da triagem.

Dentre as 18 linhagens fúngicas testadas, observou-se que 17 cresceram em ambos os substratos [com exceção de *Aspergillus flavipes* (INCQS 40024)], com destaque para *Aspergillus brasiliensis* (INCQS 40036) em DDGS de sorgo, com lipases de atividade de 10,03 U/mL; *Aspergillus niger* 01 em DDGS de

milho, com 16,14 U/mL; *Aspergillus niger* (INCQS 40065) em DDGS de milho com 10,19 U/mL e *Penicillium* sp. 09 em DDGS de milho com 11,70 U/mL de atividade hidrolítica (**Tabela 2**). Os fungos e seus respectivos substratos citados foram selecionados para dar continuidade aos estudos.

As atividades de hidrólise de lipases fúngicas obtidas em DDGS de milho como substrato em FES variaram de nulas até em torno de 16 U/mL, enquanto que utilizando DDGS de sorgo como substrato, as atividades de hidrólise de lipases variaram de nulas a 10 U/mL (**Tabela 2**). Em condições similares, *Aspergillus niger* produziu lipases por FES que apresentaram hidrólise sobre os óleos de macaúba e de palma que variaram de nula a 8 U/g (MULINARI *et al.*, 2017).

Tabela 2. Produção de lipases fúngicas em DDGS de milho e sorgo e suas atividades de hidrólise.

Fungos	U/mL de Lipases obtidas em DDGS de Milho	U/mL de Lipases obtidas em DDGS de Sorgo
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (INCQS 40036)	8,97 ± 3,13	10,03 ± 7,16
<i>Aspergillus cervinus</i> (INCQS 40025)	0	0
<i>Aspergillus flavipes</i> (INCQS 40024)	-	3 ± 2,01
<i>Aspergillus fumigatus</i> (INCQS 40014)	0,44 ± 0,28	0,24 ± 0,04
<i>Aspergillus niger</i> 01	16,14 ± 6,88	4,08 ± 0,96
<i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40015)	5,27 ± 1,35	6,73 ± 2,76
<i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065)	10,19 ± 1,15	0,41 ± 0,08
<i>Aspergillus oryzae</i> (INCQS 40068)	4,25 ± 3,10	8,26 ± 0,68
<i>Chaetomium globosum</i> (INCQS 40072)	1,7 ± 1,05	2,98 ± 0,43
<i>Fusarium moniliforme</i> (INCQS 40151)	3,62 ± 1,47	2,12 ± 0,02
<i>Fusarium solani</i> (INCQS 40099)	3,82 ± 1,36	2,12 ± 1,12
<i>Fusarium</i> sp. 13	5,4 ± 2,59	5,37 ± 1,74
<i>Penicillium</i> sp. 02	3,63 ± 0,37	4,70 ± 1,72
<i>Penicillium</i> sp. 09	11,7 ± 1,81	7,24 ± 3,90
<i>Penicillium thomii</i> (INCQS 40064)	0	0,22 ± 0,14
<i>Penicillium verruculosum</i> (INCQS 40031)	1,07 ± 0,16	5,3 ± 2,16
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> (INCQS 40290)	1,28 ± 0,02	1,71 ± 0,04
<i>Trichoderma koningii</i> (INCQS 40331)	1,91 ± 0,18	3,61 ± 0,05

Sendo - : sem crescimento microbiano

As atividades de esterificação foram nulas para todas as combinações fungo/DDGS, provavelmente devido à baixa estabilidade das enzimas frente a solventes orgânicos presentes nos meios reacionais dos experimentos, já que podem ser desnaturadas e/ou o equilíbrio da reação ter sido deslocado para a hidrólise. Além disso, é importante avaliar a quantidade de água no sistema reacional. Autores descrevem uma produção de ésteres de ácidos graxos e/ou atividade enzimática de esterificação em sistemas não aquosos (água endógena abaixo de 0,1%) com a utilização de adsorventes, enquanto outros, como FIRDAUS *et al.* (2016), mencionam que melhores resultados podem ser obtidos com a presença de até 3,5% de água no sistema, que age na preservação do sítio catalítico da enzima sob exposição a alcoóis. Assim, apesar das lipases fúngicas não terem apresentado atividade de esterificação, diferentes conteúdos aquosos e de solventes orgânicos podem ser testados em reações de síntese em estudos futuros.

5.2. CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

O estudo de concentração das lipases fúngicas produzidas em DDGS por fracionamento com sulfato de amônio apresentou adversidades. O processo, de maneira geral, consiste na adição de sal que aumenta a força iônica do meio, fazendo com que proteínas se agrupem e precipitem (MENONCIN, 2007), necessitando de etapas intermediárias como a diálise.

Durante a diálise, as membranas de celulose que continham os extratos fracionados com sal lisaram, provavelmente devido à presença de celulasas. Essa perda ocorreu com extrato de lipases obtidos a partir de *Aspergillus niger* 01 em DDGS de milho, fracionado com 60% de sal; extrato de lipases obtidos a partir de

Penicillium sp. 09 em DDGS de milho, também fracionado com 60% de sal e com os extratos enzimáticos obtidos a partir de *Aspergillus brasiliensis* (INCQS 40036) em DDGS de sorgo, fracionados com 60% e 80% de sal. Além disso, o rendimento do processo para as outras frações foi baixo, o que demonstra desnaturação das lipases (**Tabela 3**).

Tabela 3. Atividade lipolítica de extratos de lipases fracionados por sulfato de amônio.

Substrato + Micro-organismo	% Salinidade	Volume (mL)	Atividade de Hidrólise (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
DDGS Milho + <i>Aspergillus niger</i> 01	Extrato Bruto	30	10,8	0,3
	40	340	5,9	0,1
	60	-	-	-
	80	370	5,9	3,2
DDGS Milho + <i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065)	Extrato Bruto	30	5,8	7,2
	40	400	4,9	0,8
	60	420	-	-
	80	430	2,2	0
DDGS Milho + <i>Penicillium</i> sp.09	Extrato Bruto	30	4,1	0,2
	40	385	2	0,05
	60	420	0,3	0
	80	415	2,3	0
DDGS Sorgo + <i>Aspergillus brasiliensis</i> (INCQS 40036)	Extrato Bruto	30	14,7	0,3
	40	415	2,9	0,01
	60	-	-	-
	80	-	-	-

Nota-se que a lipase fúngica com maior atividade específica de hidrólise após o processo foi a obtida a partir de *Aspergillus niger* 01 em DDGS de milho, com concentração de 80% de sal, apresentando o valor de 3,2 U/mg. A média de atividade lipolítica de todos os extratos concentrados por sulfato de amônio foi de 3,3 U/mg, demonstrando que o procedimento não foi adequado ao propósito, pois

as enzimas tornaram-se instáveis perante o sal, ocorrendo uma provável desnaturação das lipases.

A concentração dos extratos enzimáticos do projeto foi então realizada por liofilização, método que retira água do sistema, concentrando-o, sem que as atividades enzimáticas sejam afetadas.

FERNANDES (2007) comparou a eficiência de métodos de concentração para lipases sobre a síntese do oleato de etila, testando diálise, precipitação por sulfato de amônio e liofilização. A perda de atividade por diálise foi de 40% e de 6% por precipitação com sulfato de amônio, já o extrato bruto liofilizado teve perda de atividade quase irrelevante, sendo de apenas 2%. Assim como no trabalho acima citado, a liofilização foi eficiente para a concentração de lipases fúngicas e foi utilizada como procedimento padrão para os experimentos seguintes.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS LIPASES

- *Especificidade*

A caracterização bioquímica quanto à especificidade sobre ácidos graxos (AG) de diferentes tamanhos de cadeia está demonstrada na **Tabela 4**.

Tabela 4. Especificidade das lipases produzidas por fungos em DDGS de milho e sorgo em relação a ácidos graxos de cadeia curta, média e longa.

Substrato + Micro-organismo	p-NP Butirato (U/g)	p-NP Laurato (U/g)	p-NP Palmitato (U/g)
DDGS Milho + <i>Aspergillus niger</i> 01	250,7a	6,4b	227,6a
DDGS Milho + <i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065)	20,7b	1,7b	246,5a
DDGS Milho + <i>Penicillium</i> sp. 09	30,6b	2,4b	240,6a
DDGS Sorgo + <i>Aspergillus brasiliensis</i> (INCQS 40036)	144,7ab	17,7a	232,3a

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente entre si (dentro da mesma coluna), comparadas por Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As lipases produzidas por *Aspergillus niger* 01, *Aspergillus niger* (INCQS 40065) e *Penicillium* sp. 09 em DDGS de milho, bem como as produzidas por *A. brasiliensis* (INCQS 40036) em DDGS de sorgo apresentaram, em maior ou menor grau, especificidades sobre ácidos graxos de cadeia de diferentes tamanhos, com destaque de atuação sobre p-NP butirato e p-NP palmitato (**Tabela 4**). Nos gráficos a seguir, pode-se observar a comparação do comportamento de cada extrato enzimático frente aos diferentes substratos (**Figura 2**).

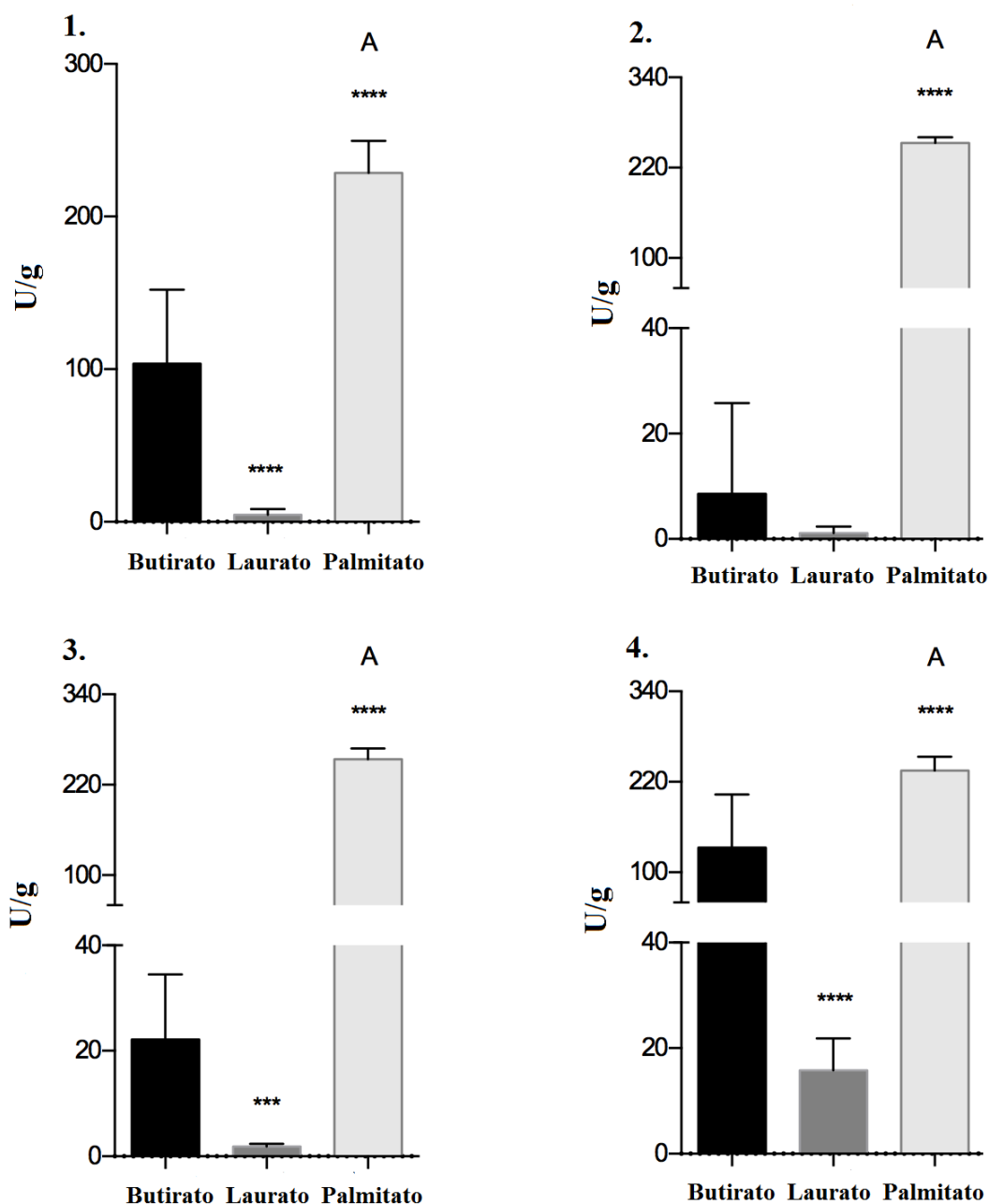


Figura 2. Análise comparativa das atividades enzimáticas (U/g) de cada extrato enzimático em diferentes substratos. **1:** Lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho; **2:** Lipases de *Aspergillus niger* (INCQS 40065) cultivado em DDGS de milho; **3:** Lipases de *Penicillium* sp. 09 cultivado em DDGS de milho; **4:** Lipases de *Aspergillus brasiliensis* (INCQS 40036) cultivado em DDGS de sorgo, sendo **A:** diferença estatística significativa quando comparado Laurato a palmitato ($p < 0,0001$); **** ($p < 0,0007$) e ***** ($p < 0,0001$): diferença estatística significativa quando comparado a butirato.

Destacam-se as atividades de lipase sobre os extratos de cadeia curta e, principalmente, os de cadeia longa, característica importante em inúmeros setores industriais. Os resultados obtidos com p-NP butirato (**Tabela 4**) podem levantar

dúvidas sobre a atuação de lipases ou de esterases. Geralmente, a ação sobre substratos insolúveis em água como os triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa [representados por p-NP palmitato (16C)] é creditada a lipases verdadeiras; já uma hidrólise preferencial por ésteres de ácidos graxos menores que seis carbonos [p-NP butirato (4C)] é esperada para esterases. Embora haja a possibilidade de os extratos enzimáticos testados apresentarem ambas hidrolases, há também a possibilidade da presença de lipases com múltiplas ações sobre substratos diversos, uma vez que apenas sua atuação sobre substratos sintéticos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica não deve ser determinante (FLEURI, 2016).

KAPOOR e GUPTA (2012) descreveram que a maior parte das lipases agem sobre ésteres de ácidos graxos saturados de cadeia média e longa, porém as lipases de *Penicillium roqueforti* e *Candida rugosa* apresentaram comportamento contrário ao esperado, atuando sobre cadeias curtas.

Essa variedade de atuação das lipases microbianas sobre ácidos graxos de diferentes tamanho de cadeia carbônica foi observado também no presente estudo.

- Regioespecificidade

A regioespecificidade de lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho pôde ser avaliada através da degradação de trioleína. Observou-se que essas apresentam comportamento esperado de lipases 1,3-específicas (**Figura 3A**), como a lipase comercial de *Rhizomucor miehei*, que apresentou monoleína, dioleína, trioleína, glicerol e ácido oleico como produtos de reação (**Figura 3B**). Os resultados obtidos pelo trabalho de MEGHWANSHI *et al.* (2006), usado como referência para o experimento, corroboram com essa análise. A cromatografia delgada indicou também a presença de ácido esteárico (**Figura**

3A), tendo como base o trabalho de LANSER *et al.* (2002). Esse ácido possui a mesma quantidade de carbonos em sua cadeia (18C) que o ácido oleico e também foi detectado por cromatografia gasosa (item 5.6., **Tabelas 7 e 8**)

As lipases produzidas por *Aspergillus niger* 01 podem então ser classificadas como 1,3-específicas, com base nos produtos de reação produzidos e acima citados. Lipases com essa característica podem ser aplicadas na concentração de monoglicerídeos (*monoacylglycerols* - MAGs) a partir de óleos com ácidos graxos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids* - PUFAs) por alcoólise, pois apresentam maior biodisponibilidade e estabilidade oxidativa que os ácidos graxos livres ou ésteres etílicos, podendo ser aplicados em produtos de higiene pessoal, alimentos e fármacos. MAGs ricos em PUFAs n-3 demonstraram ser eficazes para tratar ou prevenir doenças cardiovasculares, inflamatórias e câncer, além de estimular o crescimento e desenvolvimento de células e tecidos (HE *et al.*, 2017).

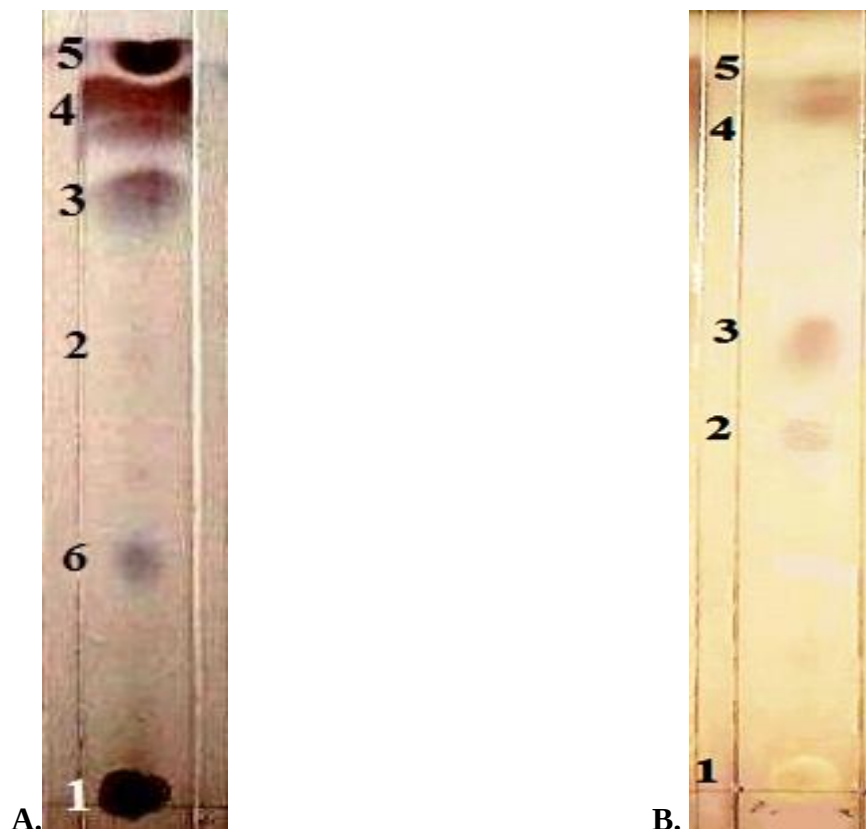


Figura 3. Análise dos produtos de degradação de trioleína para a determinação de regioespecificidade de lipases, sendo **A:** regioespecificidade de lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho; **B:** padrão de lipase 1,3-específica de *Rhizomucor miehei*. ***1:** monoleína; **2:** dioleína; **3:** ácido oleico; **4:** trioleína; **5:** glicerol; **6:** ácido esteárico.

É relevante frisar que o extrato enzimático empregado não foi purificado, havendo a possibilidade de isoformas de lipases influenciarem na resposta ao método descrito.

- Massa Molecular

As proteínas obtidas do extrato de lipase obtido a partir de *Aspergillus niger* 01 sobre DDGS de milho apresentaram 7 bandas, com massas moleculares de 14,12, 18,62, 23,44, 25,70, 28,84, 33,88 e 37,15 kDa (**Figura 4**).

Os cálculos para se obter as massas moleculares das proteínas presentes no extrato enzimático testado tiveram como base a altura das bandas apresentadas no gel de corrida (**Figura 4**).

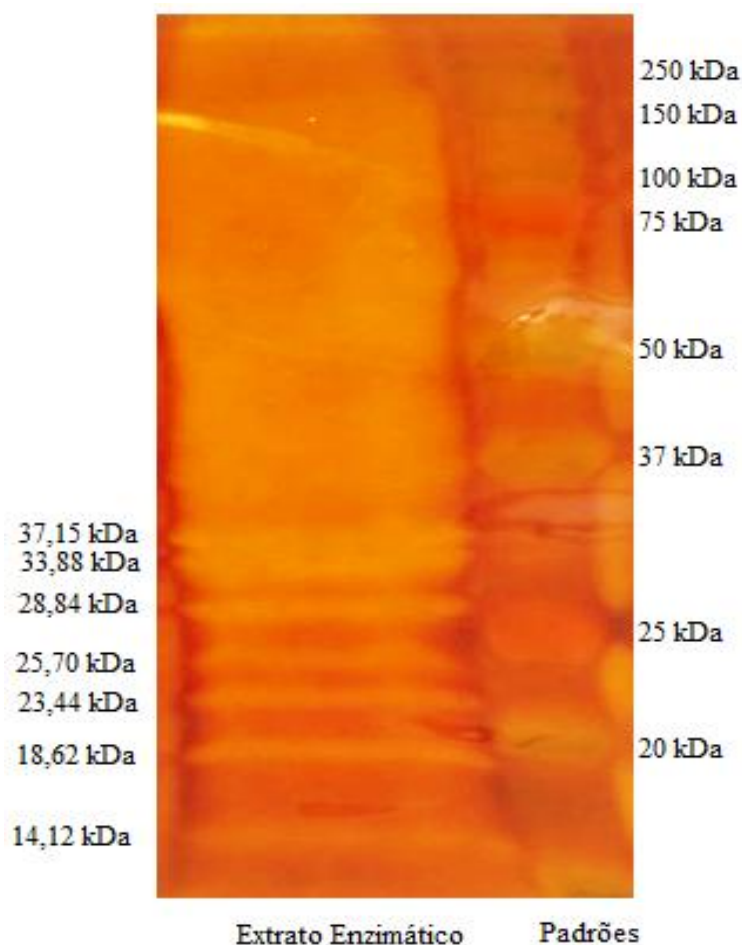


Figura 4. Eletroforese de extrato enzimático de lipase obtido a partir de *Aspergillus niger* 01 sobre DDGS de milho e padrões de massa molecular.

Dependendo da origem, lipases podem apresentar massa molecular entre 20 e 75 kDa; sendo que as fúngicas podem variar de 20 a 64 kDa (RÚA *et al.*, 1993; YADAV *et al.*, 2011).

Importante ressaltar que o extrato enzimático empregado não foi purificado, havendo a possibilidade da existência de isoformas de lipases e de outras proteínas. Para uma maior precisão de resultados, procedimentos de purificação e zimogramas podem ser aplicados.

5.4. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES

O fungo *Aspergillus niger* 01 foi utilizado no planejamento experimental visando à otimização da produção de lipases em DDGS de milho através da determinação da atividade hidrolítica nos extratos enzimáticos. Observa-se de maneira geral que, dependendo das interações das variáveis independentes, há diferenças marcantes na resposta, com atividade de lipase variando de 7,64 a 25,26 U/mL, respectivamente para os ensaios 8 e 4 (**Tabela 5**).

Tabela 5. Níveis codificados para o planejamento experimental e atividades de lipases de *Aspergillus niger* 01 em DDGS de milho.

Ensaios	Umidade (%)	Tempo de Crescim. do Inóculo (h)	Tamanho da Partícula (mm)	U/mL de lipases de <i>A. niger</i> 01 em DDGS de milho
1	-1	-1	-1	15,92
2	+1	-1	-1	16,56
3	-1	+1	-1	12,95
4	+1	+1	-1	25,26
5	-1	-1	+1	10,19
6	+1	-1	+1	7,85
7	-1	+1	+1	14,22
8	+1	+1	+1	7,64
9	0	0	0	21,65
10	0	0	0	19,1
11	0	0	0	20,2

Ao proceder a análise através do *software* Statistica a 95% de confiança e erro puro, observou-se um $R^2 = 0,61$ dos efeitos dos parâmetros, sendo o tamanho

da partícula e a umidade x tamanho da partícula, os parâmetros estatisticamente significativos (**Tabela 6**). Os parâmetros não significativos foram excluídos do modelo para a obtenção dos coeficientes de regressão, no entanto, obteve-se $R^2=0,54$ (**Tabela 6**). Desta forma, somente 54% das respostas podem ser explicadas pelo modelo representado pela **Equação 4** a seguir:

Eq. 4. Atividade de Lipase = 15,60 - 3,84 . Tamanho da Partícula - 2,73 . Umidade x Tamanho da Partícula.

Tabela 6: Análise dos efeitos e coeficientes de regressão na produção de lipases por *Aspergillus niger* 01 em DDGS de milho por fermentação em estado sólido.

Parâmetros	Efeito $R^2= 0,61$	Coefficientes de Regressão $R^2= 0,54$
Média*	15,60	15,60
1- Umidade (%)	1,00	#
2- Tempo de Cresc. do Inóculo (h)	2,38	#
3- Tamanho da Partícula (mm)*	-7,70	-3,84
1x2	1,85	#
1x3*	-5,46	-2,73
2x3	-0,47	#

*Parâmetros estatisticamente significativos a 95% de confiança.

#Parâmetros eliminados para a análise do coeficiente de regressão.

A **Figura 5** demonstra que os valores observados nos ensaios estão distantes dos valores preditos pelo modelo (linha vermelha). Esse comportamento pode ser atribuído à grande variabilidade metabólica do micro-organismo frente aos diferentes parâmetros, bem como à falta de ajuste, comum em ensaios biológicos.

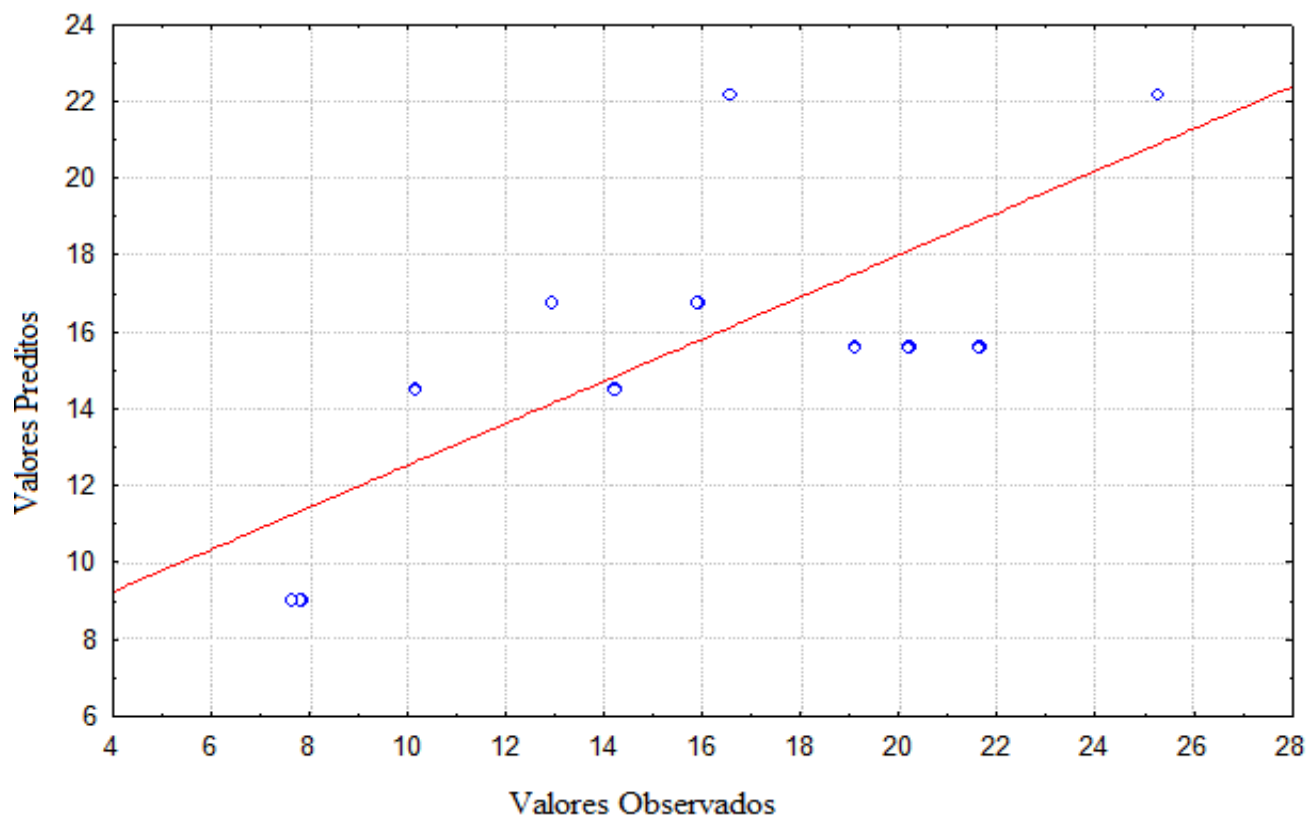


Figura 5. Atividades de lipases (U/mL) observadas nos ensaios e preditos pelo modelo estatístico.

Conclui-se que o modelo proposto estatisticamente não foi preditivo, no entanto adequa-se como padrão inicial sobre a influência do tamanho da partícula e da interação do tamanho da partícula com a umidade.

5.5. APLICAÇÃO DAS LIPASES

Com os extratos enzimáticos de *Aspergillus niger* 01 e *Aspergillus niger* (INCQS 40065) crescidos em DDGS de milho foram realizadas reações de hidrólise e esterificação em óleos de girassol e milho, escolhidos por prévia caracterização de suas composições e por serem amplamente usados em domicílios e indústrias.

- Biorremediação de Óleos Vegetais

Nas reações de hidrólise, as lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol resultaram em taxa 2,92 vezes maior que o branco reacional, e 4,44 vezes sobre óleo de milho. Já a lipase de *Aspergillus niger* (INCQS 40065) apresentou taxa de 4,28 vezes maior que o branco reacional sobre óleo de girassol e 7,37 sobre óleo de milho.

- Produção de Biodiesel

Nas reações de esterificação, as lipases demonstraram taxa 1,04 vez maior que os brancos reacionais para ambos os micro-organismos, sobre os dois óleos testados, não sendo levados adiante seus estudos de atividades biológicas.

Com as lipases de *Aspergillus niger* 01 também se realizou a reação de alcoólise sobre óleo de milho e soja, que tiveram a produção de ésteres etílicos testada por cromatografia em camada delgada (**Figura 6**).

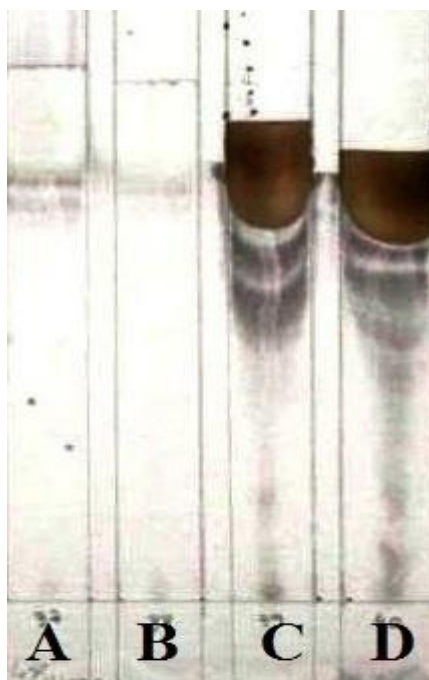


Figura 6. Análise dos produtos de alcoólise catalisada por lipases de *Aspergillus niger* 01 cultivado em DDGS de milho, sendo **A:** padrão oleato de etila; **B:** padrão palmitato de etila; **C:** Alcoólise sobre óleo de milho; **D:** Alcoólise sobre óleo de soja.

Nessa análise qualitativa verifica-se a provável presença de ésteres etílicos (colunas **C** e **D**, **Figura 6**) pela alcoólise dos óleos de milho e soja, comparados aos padrões (colunas **A** e **B**, **Figura 6**), que são ésteres etílicos que compõem o biodiesel.

5.6. PERFIL DE PRODUTOS DE REAÇÕES

Os óleos de girassol, milho e soja foram utilizados como fonte de triglicerídeos para as reações com lipases, e seus produtos, ácidos graxos livres oriundos de hidrólise e ésteres etílicos originados de alcoólise, foram mapeados por cromatografia gasosa.

A porcentagem relativa de área de ácido graxo indica a proporção de sua presença nas amostras (**Anexos, Figuras 1 a 6**). Os produtos resultantes da hidrólise do óleo de girassol pelas lipases de *Aspergillus niger* 01 foram identificados como sendo 46,69% de ácido linoleico, 39,70% de ácido oleico e 5,84% de ácido palmítico, totalizando 92,23% dos ácidos graxos encontrados (**Tabela 7**).

Tabela 7. Perfil de ácidos graxos resultantes de hidrólise de óleo de girassol realizada por lipases produzidas por *Aspergillus niger* 01.

Esqueleto Carbônico	Ácido Graxo Identificado	% de Ácidos Graxos (Média % Relativa de Área)
C12:0	Láurico	0,06
C14:1	Miristoleico	0,06
C14:0	Mirístico	0,19
C16:1	Palmitoléico	0,18
C16:0	Palmitico	5,84
C17:1	Heptadecanóico (cis-10)	0,06
C17:0	Margárico	0,05
C18:2n6c	Linoleico	46,68
C18:1n9c	Oleico	39,70
C18:1n9t	Eláidico	0,05
C18:0	Esteárico	3,64
C20:3n3	Eicosatrienóico (cis-11,14,17)	0,20
C20:0	Araquídico	0,25
C22:0	Behênico	0,64
C24:0	Lignoceróico	0,21
Total Identificado		97,81
Substâncias Não Identificadas		2,19

*tr = traço do ácido graxo ($tr \leq 0,02$)

A **Tabela 8** apresenta os ácidos graxos resultantes da hidrólise do óleo de milho por lipases de *Aspergillus niger* 01, os quais foram majoritariamente identificados como ácido linoleico (46,10%), ácido oleico (37,05%) e ácido palmítico (12,05%).

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos resultantes de hidrólise de óleo de milho realizada por lipases produzidas por *Aspergillus niger* 01.

Esqueleto Carbônico	Ácido Graxo Identificado	% de Ácidos Graxos (Média % Relativa de Área)
C12:0	Láurico	0,02
C14:1	Miristoleico	0,02
C14:0	Mirístico	0,06
C16:1	Palmitoleico	0,15
C16:0	Palmítico	12,05
C17:1	Heptadecanóico (cis-10)	0,05
C17:0	Margárico	0,07
C18:2n6c	Linoleico	46,10
C18:1n9c	Oleico	37,05
C18:1n9t	Elaídico	0,02
C18:0	Estearico	2,16
C20:3n3	Eicosatrienóico (cis-11,14,17)	0,34
C20:0	Araquídico	0,47
C22:0	Behênico	0,17
C24:0	Lignoceróico	0,18
Total Identificado		98,91
Substâncias Não Identificadas		1,09

*tr = traço do ácido graxo (tr ≤ 0,02)

As lipases fúngicas produzidas neste trabalho demonstraram alta afinidade na hidrólise de ácidos graxos insaturados de cadeia carbônica longa presentes nos triglicerídeos dos óleos de girassol e milho. Esta característica está em consonância com o experimento de especificidade (item 5.3., **Tabela 4**), onde as mesmas lipases de *Aspergillus niger* 01 sintetizadas em DDGS de milho apresentaram afinidade pelo substrato sintético de palmitato (16C).

Ácidos graxos insaturados como o linoleico e oleico são essenciais para o metabolismo basal humano. A falta de AG essenciais na dieta ou seu metabolismo ineficiente estão associados a doenças cardiovasculares (ÖZTÜRK, 2011). O ácido linoleico (ômega-6) e seus isômeros (ácido linoleico conjugado - CLA) possuem ações de combate ao câncer, à obesidade, ao diabetes, à hipertensão, à

aterosclerose e de aumento da resposta imunológica, além de ser o principal precursor do ácido araquidônico (PUFAs) (FERNANDEZ-AVILA, 2017). O ácido oleico pode ser utilizado na produção de lipossomas carregadores de drogas anticâncer (SUK e MISRAN, 2017) e de biofilmes, estar presente em embalagens para a indústria de alimentos e compor nanopartículas para emulsões na área farmacêutica e cosmética (VLACHA *et al.*, 2016), por ser o principal AG insaturado do estrato córneo (a camada mais externa da pele humana) (MISRA *et al.*, 2006).

Os ésteres etílicos produzidos por alcoólise pela ação das enzimas de *Aspergillus niger* 01 sobre os óleos de milho e soja não apresentaram picos correspondentes aos padrões (**Anexos, Figuras 7 e 8**), não sendo possível caracterizá-los.

O indício da presença de produtos de alcoólise na cromatografia de camada delgada (CCD) (item 5.5., **Figura 6**), mas a ausência de picos de ésteres etílicos na cromatografia gasosa (CG) podem indicar que o que foi detectado por CCD não eram ésteres etílicos de ácidos graxos, podendo ser glicerol resultante da ação das lipases. A partir da correlação destes dados, algumas possibilidades são levantadas:

- As lipases podem ser capazes de agir sobre triglicerídeos, mas não apresentam a capacidade de esterificar ácidos graxos livres, comportamento apresentado também nas esterificações, que não se mostraram efetivas. A adição de agentes esterificantes sobre as amostras de alcoólise e de esterificação para consecutiva análise em CG poderia indicar resultados promissores;

- Enzimas são susceptíveis à desativação por álcool de cadeia curta (KABBASHI *et al.*, 2015), como o etanol utilizado nas reações, e que pode ter

causado a desnaturação das lipases. Outros agentes alcoolizantes podem ser testados;

- O equilíbrio químico da reação pode ter sido afetado pela formação de água endógena, induzindo a ação das lipases no sentido da hidrólise e não de síntese, que poderia ser contornado com o uso de adsorventes;

- O meio reacional pode não ter sido adequado em termos de proporções de reagentes. Proporções diferenciadas poderiam ser uma alternativa para que a reação de alcoólise seja catalisada pelas lipases fúngicas deste trabalho.

5.7. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PRODUTOS DE REAÇÕES

- Atividade Antioxidante

Os testes de ação antioxidante dos produtos de reação de hidrólise entre lipases de *Aspergillus niger* 01 ou *Aspergillus niger* (INCQS 40065) e os óleos de girassol ou milho podem ser observados na **Tabela 9**.

Os produtos de reação entre as lipases de *Aspergillus niger* 01 e óleo de milho apresentaram a maior taxa de redução do radical DPPH (32,20%) (**Tabela 9**), entre os produtos de hidrólise testados.

Tabela 9. Capacidade antioxidante de produtos de reação de hidrólise de óleos de girassol e milho por lipases de *Aspergillus niger* 01 ou *Aspergillus niger* (INCQS 40065).

Extrato Enzimático e Óleo	DPPH Reduzido (%)	TEAC (μmol/mL)
<i>Aspergillus niger</i> 01 + Girassol	6,96a	0,07a
<i>Aspergillus niger</i> 01 + Milho	32,20a	0,31a
<i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065) + Girassol	16,51a	0,16a
<i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065) + Milho	3,20a	0,03a

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente entre si (referente às colunas), comparadas por Teste de Tukey.

A capacidade antioxidante dos produtos de reação de alcoólise está apresentada na **Tabela 10**.

Tabela 10. Capacidade antioxidante de produtos de reação de alcoólise de óleos de soja e milho por lipases de *Aspergillus niger* 01.

Extrato Enzimático e Óleo	DPPH Reduzido (%)	TEAC (μmol/mL)
<i>Aspergillus niger</i> 01 + Soja	85,04a	0,82a
<i>Aspergillus niger</i> 01 + Milho	92,12a	0,88a

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente entre si (referente às colunas), comparadas por Teste de Tukey.

Já os produtos resultantes da alcoólise entre lipases de *Aspergillus niger* 01 e óleo de milho apresentaram capacidade de reduzir o DPPH em até 92,12% (**Tabela 10**).

Os produtos de reação obtidos por hidrólise e alcoólise nas condições propostas pela pesquisa demonstraram eliminação de radicais livres próxima ou superior à de antioxidantes amplamente conhecidos e utilizados. Segundo LOO *et al.* (2007) o BHA, BHT, ácido ascórbico e α -tocoferol apresentaram, respectivamente, as atividades de 37,63%, 18,95%, 39,04% e 21,01% de redução do radical DPPH. Os produtos obtidos de alcoólise por lipases de *Aspergillus niger* 01 e óleo de milho apresentaram maior atividade antioxidante em relação aos compostos estudados por LOO *et al.* (2007) e próxima a atividade antioxidante da vitamina C, com cerca de 95% de redução de radicais livres, pesquisada por TONG *et al.* (2014).

ISMAIL *et al.* (2004) revelaram a atividade antioxidante média de chalotas, couve, espinafre, repolho e repolho do pântano como sendo 69,1%, 50,2%, 66,4%, 59,3% e 60,3%, respectivamente, considerando-as altas e promissoras.

O ácido palmítico é mais estável e de fácil manuseio em comparação a ácidos graxos insaturados, que são suscetíveis à oxidação (YANG *et al.*, 2017). Nas hidrólises dos óleos de girassol e milho, sua presença foi de, em média, 5,84% e 12,05% (item 5.6., **Tabelas 7 e 8**), respectivamente, resultados que podem ser extrapolados para a ação antioxidante de seus ácidos graxos (AG) observados na **Tabela 9**.

Os resultados da presente proposta indicam que os produtos de reação possuem atividade antioxidante, podendo ser em parte atribuída ao ácido linoleico que foi um dos principais compostos detectados como produto reacional (item 5.6., **Tabelas 7 e 8**). A rancidez oxidativa de gorduras (triglicerídeos, AG livres ou fosfolipídeos) ocorre na presença de oxigênio e produz odores que tornam alimentos inaceitáveis ao consumidor. Uma vez que os radicais livres são produzidos, a presença de oxigênio provoca a formação de peróxidos instáveis que se quebram facilmente, produzindo mais radicais livres, iniciando assim uma reação em cadeia (HAMAM e SHAHIDI, 2006). BASIRICÒ *et al.* (2017) demonstraram que a suplementação com ácido linoleico apresentou resposta antioxidante melhor contra o dano oxidativo induzido por H₂O₂ em comparação a outros AG.

A ação antioxidante dos produtos de hidrólise e alcoólise pode indicá-los como alternativa aos antioxidantes artificiais (BHA e BHT) usados para prolongar o tempo de prateleira de alimentos que contenham lipídeos oxidáveis, que também são potenciais causadores de câncer (ITO, 2008). Antioxidantes são também necessários em indústrias farmacêuticas e cosméticas na formulação de inúmeras drogas e produtos, ampliando o campo de utilização dos produtos reacionais obtidos.

- Efeito sobre Viabilidade Celular

Os resultados da ação dos produtos de reação sobre fibroblastos (NIH-3T3), queratinócitos (HaCaT) e células de carcinoma (SCC-9) estão apresentados nas **Figuras 7 a 12**. A ação pode ser entendida como positiva (aumento da redução de MTT pelo aumento da atividade mitocondrial das células ou por divisão celular, em ambos casos implicando no aumento do metabolismo) ou ação negativa (MTT pouco ou não reduzido, implicando em diminuição metabólica resultante da morte celular).

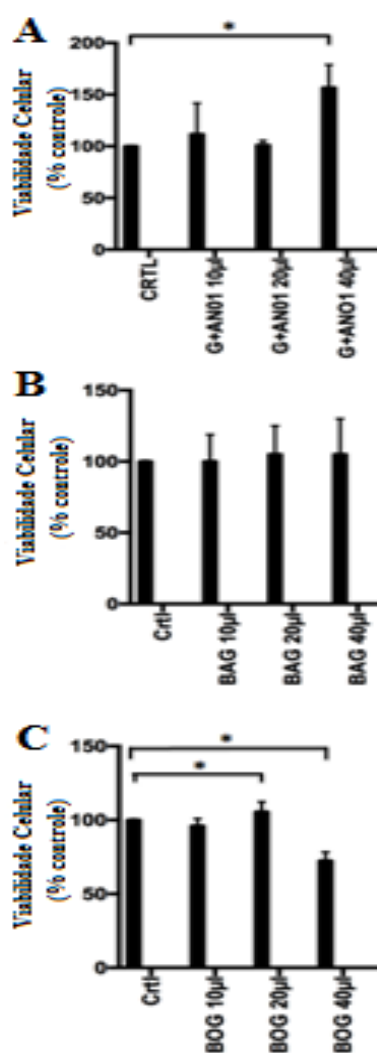


Figura 7. Viabilidade de fibroblastos (NIH-3T3), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (G + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAG); **C:** Tratamento com produtos de reação de

hidrólise de óleo de girassol sem adição de extrato enzimático (BOG); e **Crtl**: Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).

Os ácidos graxos resultantes da reação de hidrólise de óleo de girassol por lipases de *Aspergillus niger* 01 não apenas não foram tóxicos aos fibroblastos (**Figura 7A**) como apresentaram ação positiva sobre as células com o volume de 40µL, indicando uma substância que eliminou a toxicidade do óleo ou com potencial regenerativo quando comparado ao tratamento sem adição de enzima (**Figura 7C**).

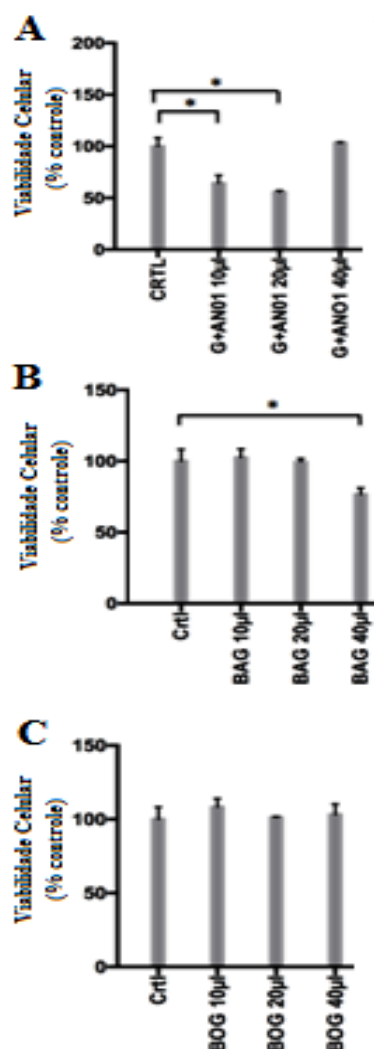


Figura 8. Viabilidade de queratinócitos (HaCaT), sendo **A**: Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de

Aspergillus niger 01 (G + AN01); **B**: Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAG); **C**: Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol sem adição de extrato enzimático (BOG); e **Crtl**: Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).

Sobre queratinócitos, os produtos de reação de óleo de girassol hidrolisado por lipases de *Aspergillus niger* 01 nos volumes 10 e 20 µL apresentaram ação negativa sobre as células (**Figura 8A**). A probabilidade da toxicidade desses produtos estar associada aos ácidos oleicos, de forma isolada, presentes na amostra (39,70% - item 5.6., **Tabela 7**) é baixa, pois esses são os ácidos graxos benéficos mais abundantes do estrato córneo da pele humana, onde também se encontram queratinócitos. No entanto, deve-se atentar ao efeito sinérgico de todos os produtos reacionais, bem como à presença de outros compostos não identificados.

Os produtos reacionais mantiveram a viabilidade celular próxima ao controle (**Figura 8A**) utilizando um volume de 40 µL, porém, ao se comparar ao seu respectivo BAG (**Figura 8B**), que apresentou ação negativa sobre queratinócitos, pode-se sugerir que os produtos de reação de enzimas ativas protejam as células de efeitos nocivos de algum elemento encontrado no meio reacional quando as enzimas são desnaturadas.

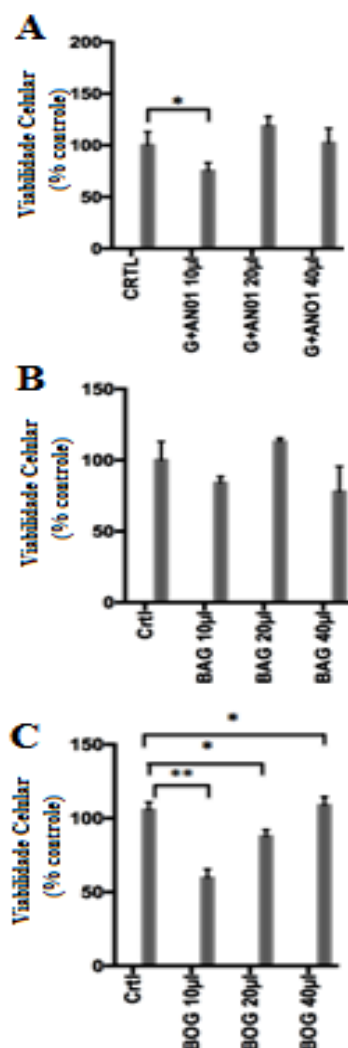


Figura 9. Viabilidade de carcinoma bucal (SCC-9), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (G + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAG); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol sem adição de extrato enzimático (BOG); e **Crtl:** Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).

Pode-se destacar os produtos de hidrólise de óleo de girassol por lipases de *Aspergillus niger* 01 no volume de 10 µL (**Figura 9A**), que apresentaram ação negativa na viabilidade de células carcinogênicas. Esse comportamento também pode ser observado em seu correspondente BOG (**Figura 9C**). Os compostos que desempenham essa ação são diferentes, nesse sentido podem estar influenciando a viabilidade de carcinomas por mecanismos também

diferenciados, não anulando o possível potencial anticarcinogênico dos produtos de reação (**Figura 9B**).

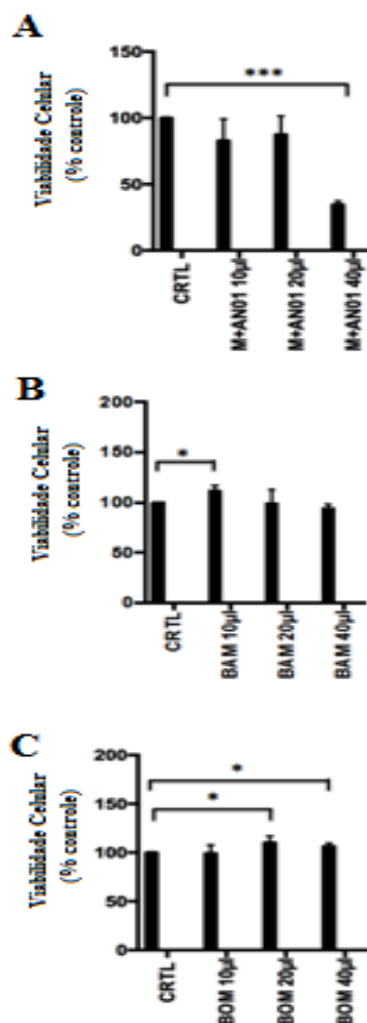


Figura 10. Viabilidade de fibroblastos (NIH-3T3), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (M + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAM); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho sem adição de extrato enzimático (BOM); e **Ctrl:** Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).

Podemos perceber ação negativa de produtos obtidos da hidrólise de óleo de milho por lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre fibroblastos, principalmente no volume 40 µL (**Figura 10A**).

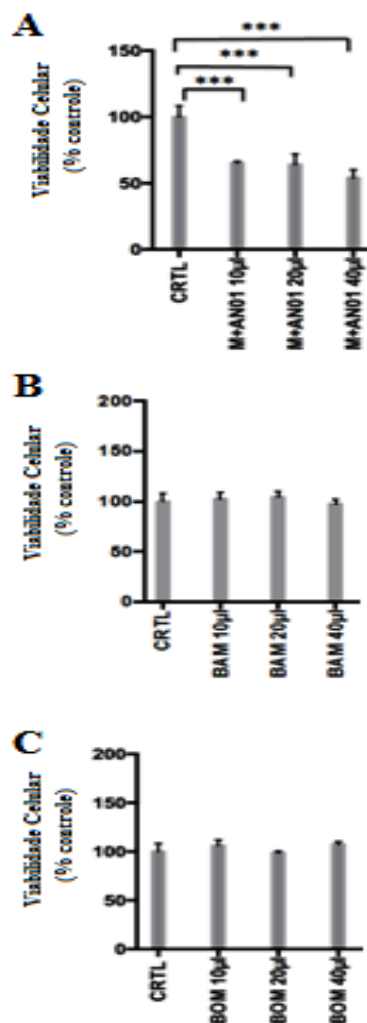


Figura 11. Viabilidade de queratinócitos (HaCaT), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (M + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAM); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho sem adição de extrato enzimático (BOM); e **Crtl:** Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).

Para queratinócitos, os produtos da hidrólise de óleo de milho por lipases de *Aspergillus niger* 01 apresentaram ação negativa (**Figura 11A**), sendo pouco provável estar correlacionada à presença de ácido oleico.

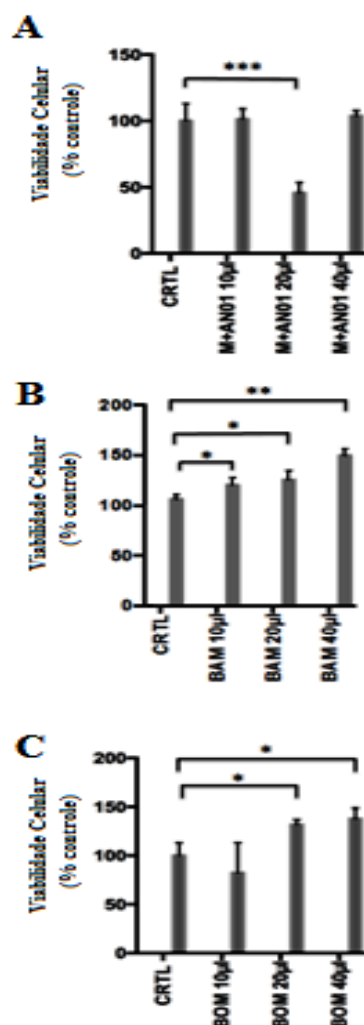


Figura 12. Viabilidade de carcinoma (SCC-9), sendo **A:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 (M + AN01); **B:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 previamente desnaturado (BAM); **C:** Tratamento com produtos de reação de hidrólise de óleo de milho sem adição de extrato enzimático (BOM); e **Ctrl:** Controle de células sem tratamento. *: Diferença significativa do tratamento em relação ao Controle (proporcional a quantas vezes é indicado).

Na **Figura 12A** os produtos de hidrólise de óleo de milho pelo extrato de lipases de *Aspergillus niger* 01 nos volumes de 10 e 40 µL, não influenciaram na viabilidade de células de carcinoma; porém, ao se comparar com os volumes respectivos de BAM e BOM (**Figura 12B e C**), que exerceram ação positiva sobre as células, conclui-se que as lipases do extrato selecionado produziram produtos que podem apresentar ação negativa sobre carcinomas. Destacam-se

esses produtos reacionais no volume de 20 µL, os quais foram extremamente tóxicos a essas células causadoras de câncer. Essa característica pode estar associada à alta presença de ácido linoleico nas amostras (média de 46,10% - item 5.6., **Tabela 8**).

Mesmo que os produtos obtidos da hidrólise de óleo de milho pelas lipases de *Aspergillus niger* 01 sejam relativamente tóxicos a fibroblastos e queratinócitos, foram ainda mais prejudiciais às células de carcinoma, demonstrando que um tratamento anticâncer baseado nesses produtos poderia trazer mais bônus do que ônus à saúde dos pacientes.

Ácido linoleico e seus isômeros apresentam propriedades antitumorais; pesquisas indicam a inibição *in vitro* da proliferação de células de câncer de mama, cólon e pulmão, com a sugestão de que a atividade citotóxica de AG envolve a peroxidação lipídica e a alteração na composição dos AG dos fosfolipídeos de membrana e sua fluidez (IGARASHI e MIYAZAWA, 2000), dados que poderiam explicar a ação negativa sobre carcinoma dos produtos de hidrólise de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de milho (**Figura 12A**), que apresentaram 46,10% de ácido linoleico (item 5.6., **Tabela 8**) e a ação antioxidante mais alta dentre os produtos de hidrólises, 32,20% (item 5.7., **Tabela 9**).

Os efeitos das concentrações fisiológicas de ácido linoleico conjugado (CLA) foram avaliados em células de câncer humanas (melanoma maligno, colorretal e mama). A incubação de células cancerosas com CLA mostrou reduções significativas nas proliferações (18-100%) em comparação às culturas controle. CLA foi mais potente na inibição de desenvolvimento tumoral do que qualquer outro AG, no entanto, o mecanismo envolvido não está completamente elucidado (SHULTZ *et al.*, 1992). Esses estudos evidenciam que a dose que pode

apresentar atividade biológica preponderante também é importante na triagem de possíveis moléculas anticarcinogênicas, como também foi demonstrado em nosso estudo.

- *Atividade Antibacteriana*

Os produtos de reação de hidrólise e alcoólise apresentaram comportamentos distintos [ausência (-) e presença (+) de halo] frente às diferentes bactérias (**Tabelas 11 e 12**).

Tabela 11. Atividade antibacteriana dos produtos de reação de hidrólise obtidos por lipases do projeto.

Bactérias	Produtos de Reação de Hidrólise			
	<i>Aspergillus niger</i> 01		<i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065)	
	Óleo de Girassol	Óleo de Milho	Óleo de Girassol	Óleo de Milho
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
<i>Salmonella Enteritidis</i>	-	-	-	-

A **Figura 13** apresenta as placas inoculadas com bactérias e os halos de inibição das atividades indicadas na **Tabela 11**.

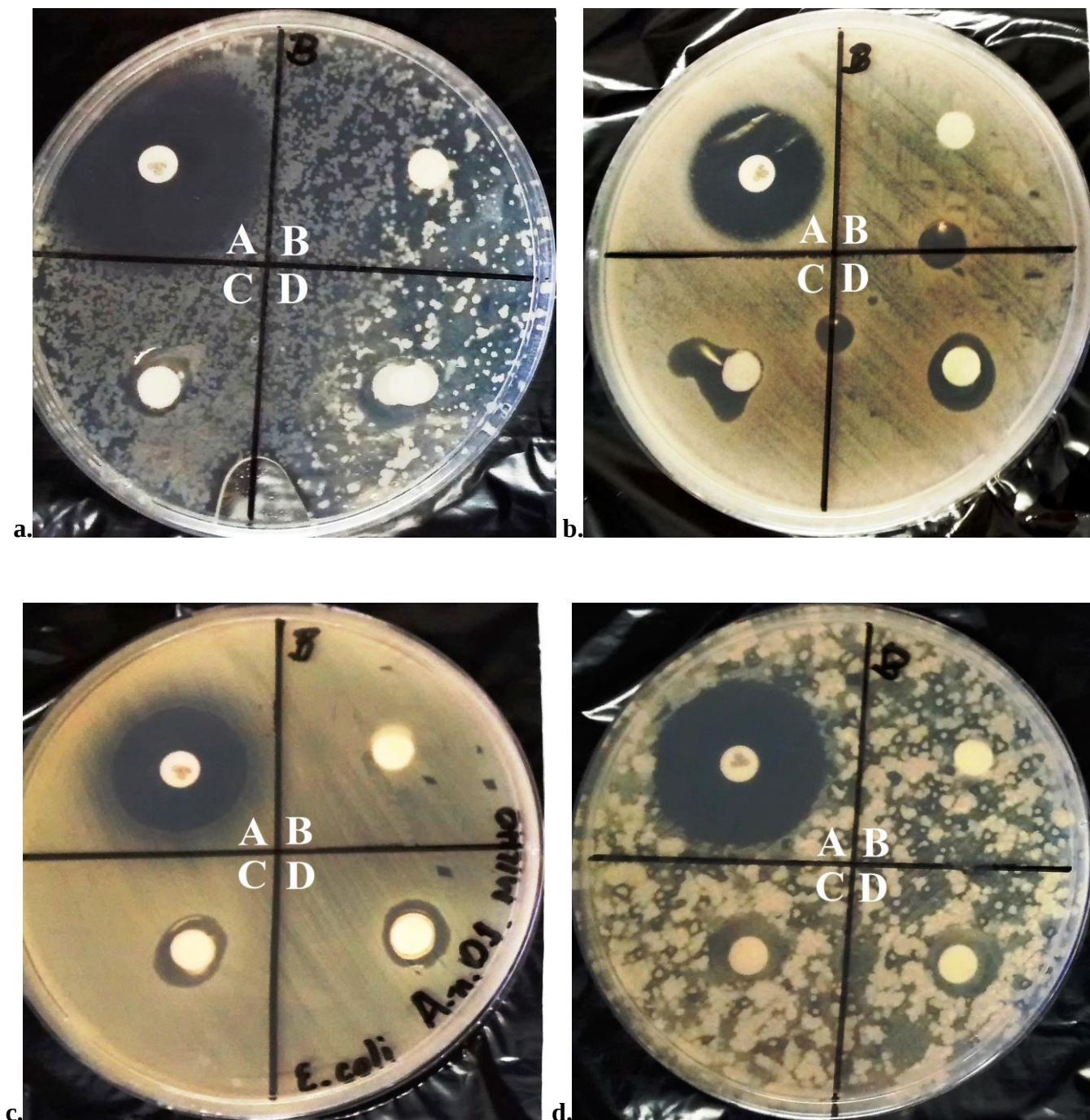


Figura 13. Placas com inibição de crescimento bacteriano representada pela formação de halos. Sendo **a:** Placa de *Staphylococcus aureus* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol por lipases de *Aspergillus niger* 01; **b:** Placa de *Pseudomonas aeruginosa* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de girassol por lipases de *Aspergillus niger* 01; **c:** Placa de *Escherichia coli* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de milho por lipases de *Aspergillus niger* 01; e **d:** Placa de *Staphylococcus aureus* e halos de inibição dos produtos de reação de hidrólise de óleo de milho por lipases de *Aspergillus niger* (INCQS 40065). *Quadrante A: disco de antibiótico anfotericina B. Quadrante B: controle salino. Quadrantes C e D: produtos de reação de lipases em duplicata.

A ação antibacteriana dos produtos de hidrólise de óleo de girassol e milho pelas lipases de *Aspergillus niger* 01 podem estar associados aos ácidos graxos linoleico e oleico, mais abundantes na composição das amostras (item 5.6., **Tabelas 7 e 8**). São ácidos graxos (AG) de cadeia longa e insaturada, com ligações duplas em orientação cis, que tendem a ter maior atividade antibacteriana que AG com ligações duplas em orientação trans, provavelmente porque estruturas trans-insaturadas assemelham-se a AG saturados, que são menos eficientes contra bactérias (DESBOIS e SMITH, 2010). Houve inibição de crescimento tanto de bactérias gram-positivas (*S. aureus*) quanto de gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) (**Figura 13**).

Não está completamente elucidada a ação antibacteriana de ácidos graxos, que pode ser bactericida ou bacteriostático. No entanto, o principal alvo indica ser a membrana celular, visto que AG apresentam propriedades detergentes devido à sua estrutura anfipática que permite que interajam com a membrana, criando poros. Em concentrações mais elevadas, podem solubilizar a membrana até que proteínas e frações de bicamadas lipídicas sejam liberadas, afetando a cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. Outros processos que podem contribuir para a inibição ou morte do crescimento bacteriano incluem lise celular, inibição de atividades enzimáticas, diminuição da absorção de nutrientes e geração de produtos de peroxidação tóxica (DESBOIS, 2010).

Algumas espécies bacterianas são naturalmente resistentes à ação antibacteriana de AG; a susceptibilidade diferencial é provavelmente devida à capacidade de AG de permear a membrana externa (gram-negativas) ou a parede celular (gram-positivas). *S. aureus* indica aumentar a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na parede celular quando exposto a AG

insaturados, estratégia de proteção para uma parede celular mais espessa (DESBOIS, 2010). Ainda assim, os produtos de reação de hidrólise entre lipases de *Aspergillus niger* 01 e óleo de girassol e de *Aspergillus niger* (INCQS 40065) e óleo de milho foram capazes de inibir crescimento desta cepa (**Tabela 11** e **Figuras 13A e 13D**, respectivamente).

Tabela 12. Atividade antibacteriana dos produtos de reação de alcoólise obtidos por lipases do projeto.

Bactérias	Produtos de Reação de Alcoólise	
	<i>Aspergillus niger</i> 01	
	Óleo de Soja	Óleo de Milho
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-
<i>Salmonella Enteritidis</i>	-	-

Os produtos de alcoólise de óleo de soja transformado por lipases de *Aspergillus niger* 01 apresentaram ação antibacteriana apenas sobre *Escherichia coli* (**Figura 14**).

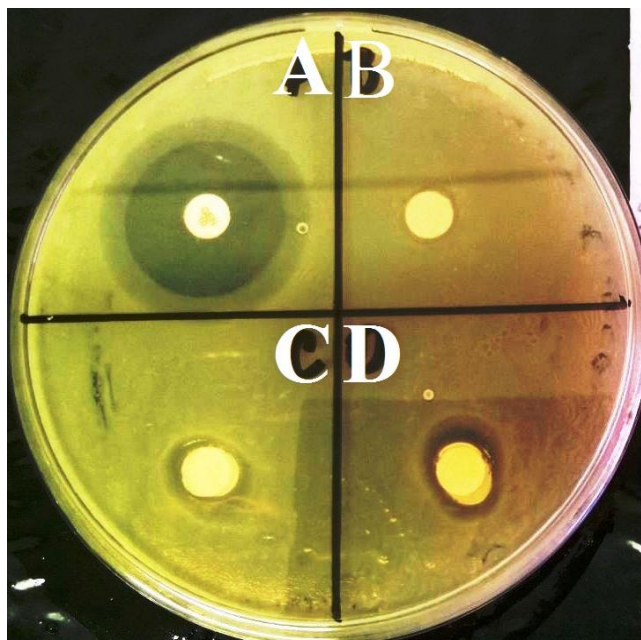


Figura 14. Placa com inibição de crescimento de *Escherichia coli* representada pela formação de halos por produtos de reação de alcoólise de óleo de soja por lipases de *Aspergillus niger* 01. *Quadrante A: disco de antibiótico anfotericina B. Quadrante B: controle salino. Quadrantes C e D: produtos de reação de lipases em duplicata.

PARFENE *et al.* (2013) estudaram a hidrólise da gordura de coco pelo fungo *Yarrowia lipolytica*, assim como caracterizaram quimicamente os produtos de reação e sua atividade antibacteriana sobre *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli* e *Salmonella Enteritidis*. Os AG obtidos apresentaram elevado potencial antibacteriano contra as quatro bactérias testadas. A concentração de ácidos graxos saturados de cadeia média (*medium chain saturated fatty acids* - MCSFA) no hidrolisado, especialmente ácido láurico, foi significativamente maior do que os AG de cadeias curta e longa (70%), o que permite atribuir atividade antibacteriana a altas concentrações de ácido láurico. O MCSFA encontrado nas amostras da pesquisa aqui apresentada foi o ácido palmítico que, mesmo em menor concentração, pode ter ações antibacterianas (**Tabelas 7 e 8**).

Ação antibacteriana pode ser aplicada na extensão da vida de prateleira de alimentos garantindo segurança alimentar; na indústria farmacêutica contra a ação de bactérias causadoras de doenças; em produtos de limpeza para uso industrial, doméstico ou por unidades de saúde, para descontaminação.

- *Atividade Antifúngica*

Nenhum dos produtos de reação, hidrólise e alcoólise, apresentou formação de halo nas placas inoculadas com os diferentes fungos testados.

As atividades antioxidante e antibacteriana dos produtos de alcoólise (**Tabelas 10 e 12**) podem ser explicadas pela ação de ácidos graxos não esterificados ou por ação de biomoléculas presentes no próprio extrato enzimático aplicado, expandindo as possibilidades de atividades biológicas oriundas de FES fúngica em DDGS.

Apesar dos estudos de atividades biológicas dos produtos de reações necessitarem de aprofundamento, podemos associar atividades antioxidantes, efeito sobre viabilidade celular e ação antimicrobiana. Os produtos de hidrólise de óleo de girassol por *Aspergillus niger* 01, que manifestaram 6,96% ação antioxidante (item 5.7., **Tabela 9**), diminuíram metabolismo ou causaram morte de carcinoma (item 5.7., **Figura 9**) e inibiram o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (item 5.7., **Tabela 11**); assim como os produtos de hidrólise de óleo de milho pelas lipases de *Aspergillus niger* 01, que demonstraram a maior taxa de redução de radicais livres (32,20%) (item 5.7., **Tabela 9**), com significativa ação negativa sobre carcinoma (item 5.7., **Figura 12**) e inibiram o crescimento de *E. coli* (item 5.7., **Tabela 11**). Pode-se destacar ainda os produtos de alcoólise de óleo de soja por lipases de *Aspergillus niger* 01, com atividade antioxidante de

85,04% (item 5.7., **Tabela 10**) que inibição do crescimento de *E. coli* (item 5.7., **Tabela 12**). Esses dados encontram-se resumidas na **Tabela 13**.

Todas as atividades biológicas aqui discutidas podem estar associadas não somente a ácidos graxos e ésteres etílicos resultantes da ação das lipases produzidas, mas também a mono e diglicerídeos que não foram completamente hidrolisados, além da ação das próprias lipases e outras enzimas que podem ser encontradas no meio reacional restante.

Tabela 13. Associação de composição de produtos de reações e suas atividades biológicas.

	Produtos de Reações	Composição Majoritária	Atividade Antioxidante (%)	Efeito sobre Viabilidade Celular	Atividade Antibacteriana
Hidrólise	<i>Aspergillus niger</i> 01 + Óleo de Girassol	Ácido Linoleico Ácido Oleico Ácido Palmítico	6,96	Proteção de fibroblastos contra toxicidade do óleo. Diminuição de viabilidade de carcinomas.	Sim
	<i>Aspergillus niger</i> 01 + Óleo de Milho	Ácido Linoleico Ácido Oleico Ácido Palmítico	32,2	Diminuição de viabilidade de carcinomas.	Sim
	<i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065) + Óleo de Girassol	-	16,51	-	Não
	<i>Aspergillus niger</i> (INCQS 40065) + Óleo de Milho	-	3,2	-	Sim
Alcoólise	<i>Aspergillus niger</i> 01 + Óleo de Soja	Oleato de Etila Palmitato de Etila	85,04	-	Sim
	<i>Aspergillus niger</i> 01 + Óleo de Milho	Oleato de Etila Palmitato de Etila	92,12	-	Não

Sendo - : dados não disponíveis

6. CONCLUSÃO

Os DDGS de milho e sorgo demonstraram potencial para serem aplicados como substratos para FES na produção de lipases fúngicas, o que pode ampliar a utilização desses resíduos, bem como viabilizar a produção de lipases fúngicas a baixo custo. As lipases produzidas apresentaram eficiência frente às condições distintas de reações, dando origem a ácidos graxos e ésteres etílicos com promissoras atividades biológicas.

Os testes de atividades biológicas, apesar de iniciais, demonstraram todo o potencial de produtos de reação de hidrólise e alcoólise, além de abrirem precedentes para o aprofundamento da pesquisa nas mesmas e novas reações catalisadas por lipases do projeto.

Nenhuma pesquisa deveria ter o intuito de fechar a discussão de um assunto; deve-se sempre alcançar resultados que instiguem a busca por novas respostas e aprimoramentos, como foi o caso deste, uma vez que há várias correlações levantadas que devem ser complementadas e elucidadas.

7. PROSSEGUIMENTO DA PESQUISA

A pesquisa científica aqui apresentada, inovadora em diversos pontos, precede muitas possibilidades:

- DDGS diversos como milho, sorgo e trigo podem ser utilizados como meio de cultivo para incontáveis micro-organismos para a produção de enzimas, principalmente fungos, assim como as condições de fermentação podem ser aprimoradas e estabelecidas;

- A aplicação de proteases em extratos enzimáticos obtidos por FES pode ser de grande valia para a preservação das enzimas obtidas;
- A purificação de extratos enzimáticos pode ajudar na garantia de ação das enzimas estudadas sem que haja interferência da ação de outras biomoléculas;
- Óleos de origens distintas podem influenciar tanto na ação das lipases como nos produtos de reações, suas características químicas e atividades biológicas;
- Maior caracterização das lipases do projeto permitirá estender o entendimento de suas ações, adequá-las às reações aqui estudadas e em outras, como a interesterificação, e continuar a produção de moléculas de atividades biológicas únicas e promissoras;
- Testes com os produtos de hidrólise de *Aspergillus niger* (INCQS 40065) e com os produtos de alcoólise promovida por *Aspergillus niger* (INCQS 40065) e *Aspergillus niger* 01 sobre a influência em viabilidade celular podem apresentar resultados com grande potencial;
- Aprofundar os estudos das lipases produzidas em reações de esterificação e alcoólise, com agentes alcoolizantes em proporções diferenciadas e utilização de adsorventes, assim como o uso de lipases com ações complementares de hidrólise e síntese;
- Aprofundar os estudos dos produtos de reações com testes biológicos, de fotossensibilidade e de suas reais aplicações para a população;
- Imobilização das lipases produzidas pode agregar atividade e estabilidade e pode permitir que sejam recuperadas de maneira simples, com maior possibilidade de reutilização.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia. Acessado em Maio de 2015.

AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 565–570, 2001.

ALDAI, N.; AALHUS, J. L.; DUGAN, M. E. R.; ROBERTSON, W. M.; MCALLISTER, T. A.; WALTER, L. J.; MCKINNON, J. J. Comparison of wheat-versus corn-based dried distillers grains with solubles on meat quality of feedlot cattle. **Meat Science**, v. 84, p. 569–577, 2010.

APROSOJA. Disponível em www.aprosoja.com.br. Acessado em Dezembro de 2014.

ADAK, S. e BANERJEE, R. A green approach for starch modification: Esterification by lipase and novel imidazolium surfactant. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 359-368, 2016.

BARNERJEE, A. e CHAKRABORTY, R. Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production - A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 53, p. 490-497, 2009.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed Lipases: Sources, Applications and Properties - A Review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, 2010.

BARROS-NETO, B. Planejamento e otimização de experimentos, ed. 2, p. 300, 2001.

BASIRICÒ, L.; MORERA, P.; DIPASQUALE, D.; TRÖSCHER, A.; BERNABUCCI, U. Comparison between conjugated linoleic acid and essential fatty acids in preventing oxidative stress in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11729>, 2017.

BELYEA, R. L.; RAUSCH, K. D.; CLEVINGER, T. E.; SINGH, V.; JOHNSTON, D. B.; TUMBLESON, M. E. Sources of variation in composition of DDGS. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, p. 122-130, 2010.

BHANGU, S. K.; GUPTA, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic enhancement of lipase-catalysed transesterification for biodiesel synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 305-309, 2017.

BIZ, A.; FINKLER, A. T. J.; PITOL, L. O.; MEDINA, B. S.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 54-62, 2016.

BOTELHO, R. M. Grãos secos de destilaria com solúveis em dietas para tilápia-do-Nilo. Tese Doutorado em Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - Campus Botucatu, UNESP, Brasil, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27 de 22 de maio de 2009. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Produtos Detergentes Enzimáticos de Uso Restrito em Estabelecimentos de Assistência à Saúde e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

CALADO, C. R. C.; MONTEIRO, S. M. S.; CABRALI, J. M. S.; FONSECA, L. P. Effect of prefermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, 2002.

CHEN, J.; LINDMARK-MANSSON, H.; GORTON, L.; AKESSON, B. Antioxidante capacity of bovine milk assayed by spectrophotometric and amperometric methods. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 927-935, 2003.

CHRENKOVÁ, M.; ČEREŠŇÁKOVÁ, Z.; FORMELOVÁ, Z.; POLÁČIKOVÁ, M.; MLYNEKOVÁ, Z.; FLÁK, P. Chemical and nutritional characteristics of different types of DDGS for ruminants. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 21, p. 425–435, 2012.

CLICMERCADO. Disponível em www.ceres.net. Acessado em Dezembro de 2014 e Agosto de 2015.

DAS, S.; GANGLY, A.; DEY, A.; TING, Y. P.; CHATTERJEE, P. K. Characterization of water hyacinth biomass and microbial degradation of the biomass under solid state fermentation using a lignocellulolytic fungus (*Alternaria spp* NITDS1). **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 4, p. 2279-2293, 2014.

DESBOIS, A. P. e SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1629-1642, 2010.

DEVASENA, T. Enzymology. 1ª edição, Oxford, Inglaterra, 2010.

DUONG-LY, K. C. e GABELLI, S. B. Chapter Seven – Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. **Methods in Enzymology**. v. 541, p. 85–94, 2014.

EBRAHIMI, M.; RAJION, M. A.; GOH, Y. M.; SAZILI, A. Q. Impact of different inclusion levels of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fronds on fatty acid profiles of goat muscles. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 6, p. 962-969, 2012.

FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. Tese de doutorado - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 131, 2007.

FERNANDEZ, I. A. P.; LIU, D.; ZHAO, J. LCA studies comparing alkaline and immobilized enzyme catalyst processes for biodiesel production under Brazilian conditions. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 3270, p. 11, 2016.

FERNANDEZ-AVILA, C.; GUTIERREZ-MERIDA, C.; TRUJILLO, A. J. Physicochemical and sensory characteristics of a UHT milk-based product enriched with conjugated linoleic acid emulsified by Ultra-high Pressure Homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 39, p. 275-283, 2017.

FILER, K. The newest old way to make enzymes. **Feed Mix**, v. 9, p. 27–29, 2001.

FIRDAUS, M. Y.; GUO, Z.; FEDOSOV, S. N. Development of kinetic model for biodiesel production using liquid lipase as a biocatalyst, esterification step. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 52–61, 2016.

FLEURI, L. F.; CASSANI, M.; ARCURI, M.; CAPOVILLE, B. L.; PEREIRA, M. S.; DELGADO, C. O.; NOVELLI, P. K. Production of fungal lipases in wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 1, p. 1-15, 2014a.

FLEURI, L. F.; FREIRE, D. M. G.; MACEDO, G. A. Hydrolysis of *Jatropha curcas* oil by a combined lipase system. **14th European Congress on Biotechnology**, Barcelona, Espanha, 2009.

FLEURI, L. F.; FREIRE, D. M. G.; MACEDO, G. A. Studying synergic effects of the combined lipase systems in vegetable oil hydrolysis. **IX Brazil-Japan International Workshop: Society, Energy and Environment**. Campinas, Brasil, 2011

FLEURI, L. F.; NOVELLI, P. K.; DELGADO, C. O.; PIVETTA, M. R.; PEREIRA, M. S.; ARCURI, M.; CAPOVILLE, B. L. Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 1, p. 1-18, 2014b.

FLEURI, L. F. Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas. Tese de Livre Docência, 2016.

FREITAS, L.; PAULA, A. V.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 87-90, 2010.

GERBER, C. B.; KAUFMANN, F.; NICOLETTI, G.; COSTA, M. D.; KEMPKA, A. P. Production of Lipase Using Cassava Peel and Sunflower Oil in Solid-State Fermentation: Preliminary Study. **Journal of Agricultural Science and Technology**. p. 948-954, 2013.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009.

HAMAM, F. e SHAHIDI, F. Acidolysis Reactions Lead to Esterification of Endogenous Tocopherols and Compromised Oxidative Stability of Modified Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7319-7323, 2006.

HAN, J. e LIU, K. Changes in Composition and Amino Acid Profile during Dry Grind Ethanol Processing from Corn and Estimation of Yeast

Contribution toward DDGS Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3430-3437, 2010.

HE, Y.; LI, J.; KODALI, S.; BALLE, T.; CHEN, B.; GUO, Z. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: Catalytic specificity and parameterization. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 445-456, 2017.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175–186, 2004.

HOORNWEG, D. e BHADA-TATA, P. What a Waste: A Global Review of Solid Waste Management. **Urban Development Series Knowledge Papers**, nº15, 2012.

IGARASHI, M. e MIYAZAWA, T. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. **Cancer Letters**, v. 148, p. 173-179, 2000,

ISAACS, C. E.; LITOV, R. E.; THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 6, p. 362–366, 1995.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z. M.; FOONG, C. W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v. 87, p. 581-586, 2004.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H. Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by bha, Bht, and Other Antioxidants. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 15, p. 109-150, 1985.

JIANG, W. G.; BRYCE, R. P.; HORROBIN, D. F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 27, n. 3, p. 179-209, 1998.

JOHNSON, F. X. e SILVEIRA, S. Pioneer countries in the transition to alternative transport fuels: Comparison of ethanol Programmes and policies in Brazil, Malawi and Sweden. **Environmental Innovation and Societal Transitions**, v. 11, p. 1-24, 2014.

KABBASHI, N. A.; MOHAMMED, N. I.; ALAM, M. Z.; MIRGHANI, M. E. S. Hydrolysis os *Jatropha curcas* oil for biodiesel synthesis using

- immobilized *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 95-100, 2015.
- KAHIL, T. e HASSAN, H. M. Economic Co-Production of Cellulase and α -Amylase by Fungi Grown on AgroIndustrial Wastes Using Solid-State Fermentation Conditions. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 05, p. 184-195, 2015.
- KAPOOR, M. e GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.
- KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 3, p. 223, 2010.
- KONISHI, F.; SOARES, P. M.; GALVÃO, R. A.; SILVA, M. S.; ROCHA, A. M. Uma Década da Tecnologia Biocombustível: Análise do Segmento Automobilístico e a sua Correlação com o Setor Sucroalcooleiro. **Energia na Agricultura**, v. 29, p. 272-276, 2014.
- KUMAR S.; MATHUR A.; SINGH V.; NANDY S.; KUMAR K.; NEGI S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 300–304, 2012.
- LANSER, A. C.; MANTHEY, L. K.; HOU, C. T. Regioselectivity of New Bacterial Lipases Determined by Hydrolysis of Triolein. **Current Microbiology**, v. 44, p. 336-340, 2002.
- LARROCHE, C.; ARPAH, M.; GROS, J. B. Methyl-ketone production by Ca-alginate/Eudragit RL entrapped spores of *Penicillium roquefort*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 106-112, 1989.
- LEKHA, P. K. e LONSANE, B. K. Comparative Titres, Location and Properties of Tannin Acyl Hydrolase Produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in Solid-State, Liquid Surface and Submerged Fermentations, **Process Biochemistry**, v. 29, p. 497-503, 1994.
- LIM, C. e YILDIRIM-AKSOY, M. Distillers dried grains with solubles as an alternative protein source in fish feeds. **8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture**, 2008.
- LIMA, J. R. O. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova**, São Paulo, Brasil, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007 .

LIU, C.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. The Two-Step Synthesis of 1,3-Oleoyle-2-Palmitoylglycerol by *Candida* sp. 99-125 lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016.

LIU, K. Chemical Composition of Distillers Grains, a Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1508-1526, 2011.

LIU, K. e HAN, J. Changes in mineral concentrations and phosphorus profile during dry-grind processing of corn into ethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3110-3118, 2011.

LODGE, S. L.; STOCK, R. A.; KLOPFENSTEIN, T. J.; SHAIN, D. H.; HEROLD, D. W. Evaluation of corn and sorghum distillers byproducts. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 3743, 1997.

LOO, A. Y.; JAIN, K.; DARAH, I. Antioxidant and radical scavenging activities of the pyroligneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 300-307, 2007.

LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? **Food Science and Technology**, v. 31, 2011.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 28, p. 90-95, 1997.

MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M. A.; FIGUEROA, J. G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1520–1526, 2012.

MEGHWANSHI, G. K.; AGARWAL, L.; DUTT, K.; SAXENA, R. K. Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 127–131, 2006.

MENONCIN, S. Concentração, Imobilização e Caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido. Erechim, Brasil, URI, 2007.

MITA, L.; SICA, V.; GUIDA, M.; NICOLUCCI, C.; GRIMALDI, T.; CAPUTO, L.; BIANCO, M.; ROSSI, S.; BENCIVENGA, U.; ELDIN, M. S. M.; TUFANO, M. A.; MITA, D. G.; DIANO, N. Employment of immobilised lipase

from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 133-141, 2010.

MISRA, R. M.; JAIN, A.; TANDON, P.; WARTEWIG, S.; GUPTA, V. D. Normal mode analysis of γ form of oleic acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 142, p. 70-83, 2006.

MOTTA, A. S. e BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 63-70, 2002.

MULINARI, J.; VENTURIN, B.; SBARDELOTTO, M.; AGNOL, A. D.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; BALDISSARELLI, D. P.; MODKOVSKI, T. A.; ROSSETTO, V.; DALLA ROSA, C.; REICHERT Jr, F. W.; GOLUNSKI, S. M.; VIEITEZ, I.; VARGAS, G. D. L. P.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by homemade lipases. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 313-318, 2017.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic Biodiesel Production: Technical and Economical Considerations. **European Journal Science Technology**, v. 110, n. 8, 2008.

O'FALLON, J. V.; BUSBOOM, J. R.; NELSON, M. L.; GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1511-1521, 2007.

OGBOLU, D. O.; ONI, A. A.; DAINI, O. A.; OLOKO, A. P. In vitro antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 384-387, 2007.

ÖZTÜRK, M.; DURU, M. E.; KIVRAK, S.; MERCAN-DOGAN, N.; TÜRKÖGLÜ, A.; ÖZLER, M. A. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1353-1360, 2011.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PARFENE, G.; HORINCAR, V.; TYAGI, A. K.; MALIK, A.; BAHRIM, G. Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial

activity from crude coconut fat by solid state cultivation of *Yarrowia lipolytica*.

Food Chemistry, v. 136, p. 1345–1349, 2013.

PATEL, M.; MISTRY, J.; DESAI, S.; PATEL, S. Isolation and Characterization of Lipase producing Bacteria from Vegetable Oil Spillage Site. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, p. 214-232, 2016.

RACHBAUER, L.; GABAUER, W.; SCHEIDL, S.; ORTNER, M.; FUCHS, W.; BOCHMANN, G. Closing the Nutrient Cycle in Two-Stage Anaerobic Digestion of Industrial Waste Streams. **Energy & Fuels**, DOI: 10.1021/ef502809e, 2015.

RON, E. Z. e ROSENBERG, E. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 191–194, 2014.

RÚA, M. L.; DÍAZ-MAURIÑO, T.; FERNÁNDEZ, V. M.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1156, p. 181-189, 1993.

SANTOS, R. R.; MURUCI, L. N. M.; SANTOS, L. O.; ANTONIASSI, R.; SILVA, J. P. L.; DAMASO, M. C. T. Characterization of Different Oil Soapstocks and Their Application in the Lipase Production by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, p. 561-566, 2014.

SHAHBAZI, S.; BJELKEMYR, M.; JÖNSSON, C.; WIKTORSSON, M. The Effect of Environmental and Economic Perception on Industrial Waste Management. **1st International EurOMA Sustainable Operations and Supply Chains Forum**, p. 24-25, 2014.

SHULTZ, T. D.; CHEW, B. P.; SEAMAN, W. R.; LUEDECKE, L. O. Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and P-carotene on the in vitro growth of human cancer cells. **Cancer Letters**. v. 63, p. 125- 133, 1992.

SILVEIRA, G. I Fórum Brasileiro de Etanol de Milho e Sorgo. **Agroanalysis**, 2013.

SIVARAMAKRISHNAN, R. e INCHAROENSAKDI, A. Direct transesterification of *Botryococcus* sp. catalysed by immobilized lipase: Ultrasound treatment can reduce reaction time with high yield of methyl ester. **Fuel**, v. 191, p. 363-370, 2017.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820– 4825, 2010.

SUN, Y. e CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002.

SUK, V. R. E. e MISRAN, M. Preparation, characterization and physicochemical properties of DOPE-PEG2000 stabilized oleic acid-soy lecithin liposomes (POLL). **Colloids and Surfaces A**, v. 513, p. 267-273, 2017.

TALUKDER, M. M. R.; TAMALAMPUDY, S.; LI, C. J.; LE, Y. L.; WU, J. C.; KONDO, A. An improved method of lipase preparation incorporating both solvent treatment and immobilization onto matrix. **Biochemical Engineering**, v. 33, p. 60–65, 2007.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A Review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TONG, L. T.; LIU, L. Y.; ZHONG, K.; WANG, Y.; GUO, L. N.; ZHOU, S. M. Effects of Cultivar on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Naked Oat in China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, p. 1809-1816, 2014.

TSUNECIRO, A.; MARIANO, R. M.; MARTINS, V. A. Produção e preços de sorgo no estado de São Paulo, 1991-2001. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.1, p. 15-24, 2002.

VLACHA, M.; GIANNAKAS, A.; KATAPODIS, P.; STAMATIS, H.; LADAVOS, A.; BARKOULA, N. M. On the efficiency of oleic acid as plasticizer of chitosan/clay nanocomposites and its role on thermo-mechanical, barrier and antimicrobial properties - Comparison with glycerol. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 10-19, 2016.

ZHU, Q. Y.; HACKMAN, R. M.; ENSUNSA, J. L.; HOLT, R. R.; KEEN, C. L. Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 692-9, 2002.

WANG, M.; NIE, K.; CAO, H.; DENG, L.; WANG, F.; TAN, T. Biodiesel production by combined fatty acids separation and subsequently enzymatic esterification to improve the low temperature properties. **Bioresource Technology**, v. 174, p. 302-305, 2014.

WEBER, K. e OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, 1969.

WOLLINGER, A.; PERRIN, É.; CHAHBOUN, J.; JEANNOT, V.; TOURAUD, D.; KUNZ, W. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, p. 754-765, 2016.

WU, X.; JAMPALA, B.; ROBBINS, A.; HAYS, D.; YAN, S.; XU, F.; ROONEY, W.; PETERSON, G.; SHI, O.; WANG, D. Ethanol Fermentation Performance of Grain Sorghums (*Sorghum bicolor*) with Modified Endosperm Matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9556-9562, 2010.

YADAV, K. N.S.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V.; GOKHALE, D. V. Differential induction, purification and characteization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10663-10670, 2011.

YAN, X. e BOIES, A. M. Quantifying the uncertainties in life cycle greenhouse gas emissions for UK wheat ethanol. **Environmental Research Letters**, v. 8, 2013.

YANG, H. J.; LEE, P. S.; CHOE, J.; SUH, S.; KO, S. Improving the encapsulation efficiency and sustained release behaviour of chitosan/b-lactoglobulin double-coates microparticles by palmitic acid grafting. **Food Chemistry**, v. 220, p. 123-128, 2017.

ANEXOS

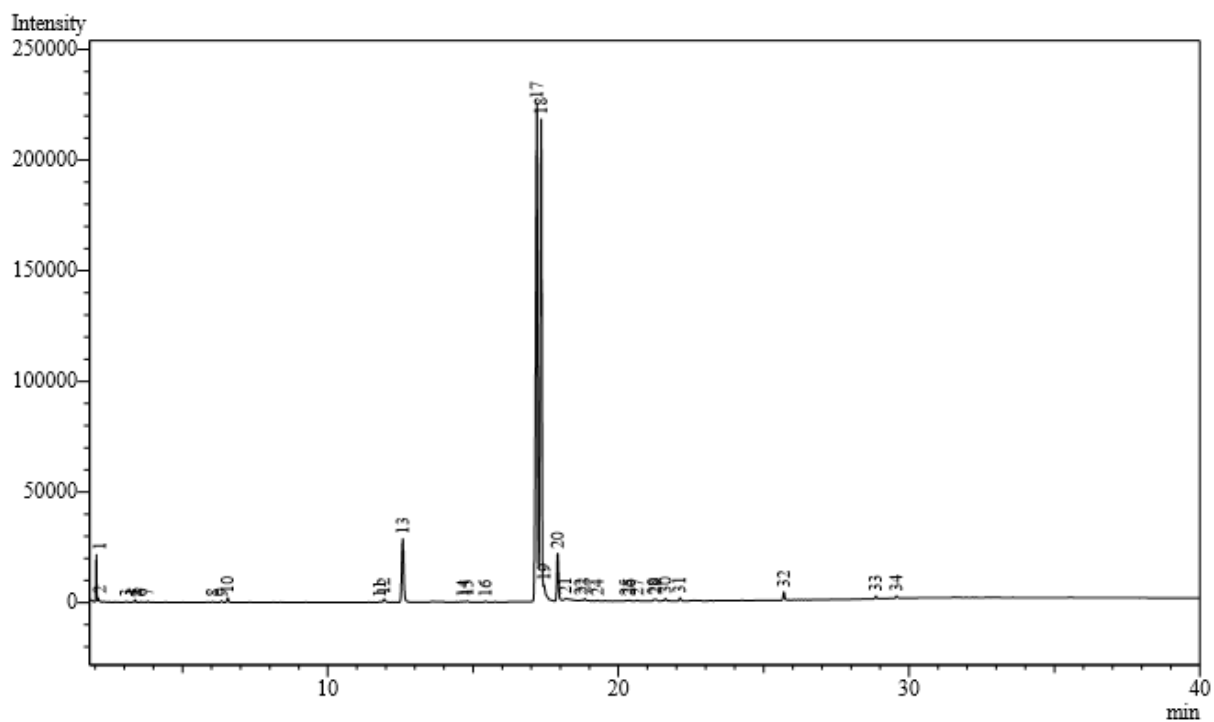


Figura 1: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol em reação de hidrólise (Teste 1).

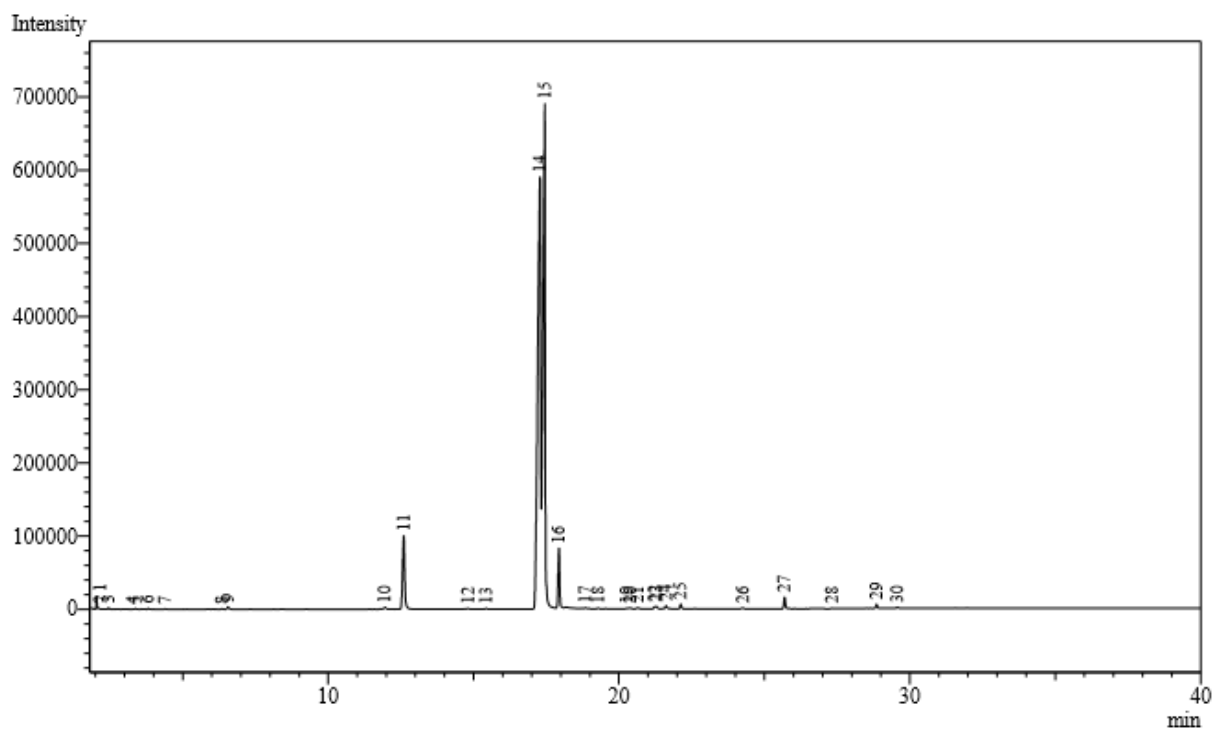


Figura 2: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol em reação de hidrólise (Teste 2).

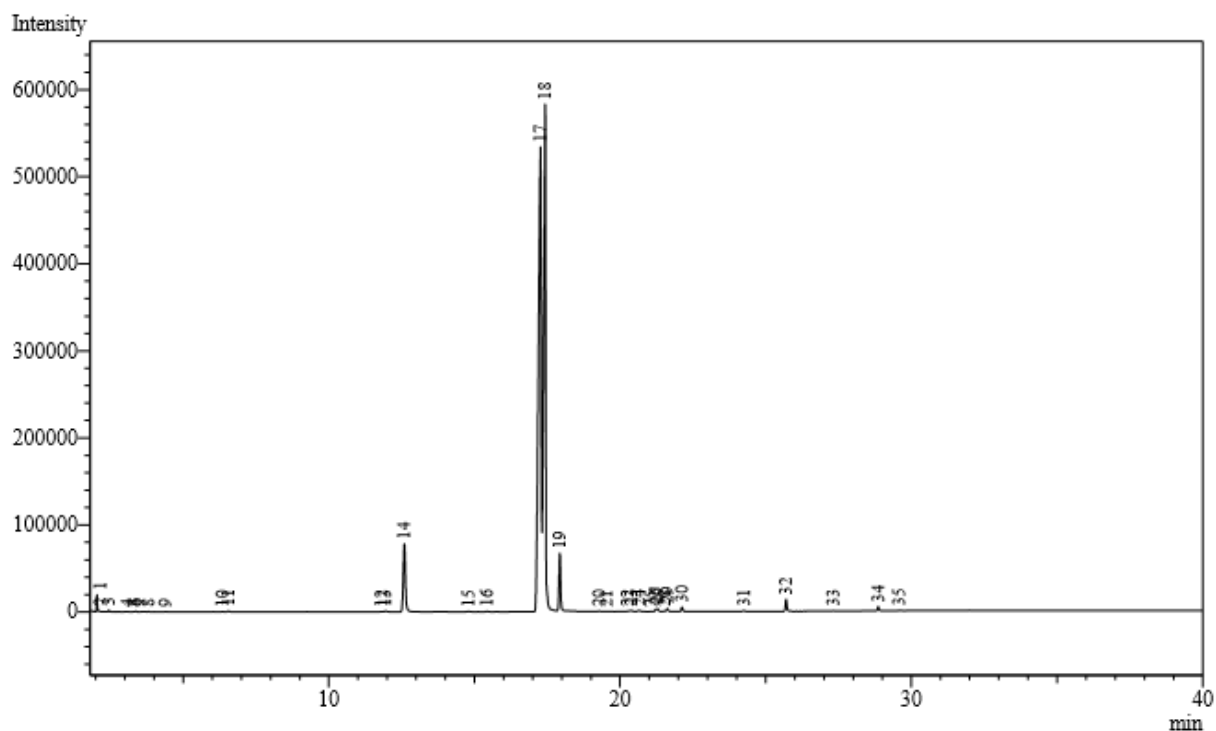


Figura 3: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de girassol em reação de hidrólise (Teste 3).

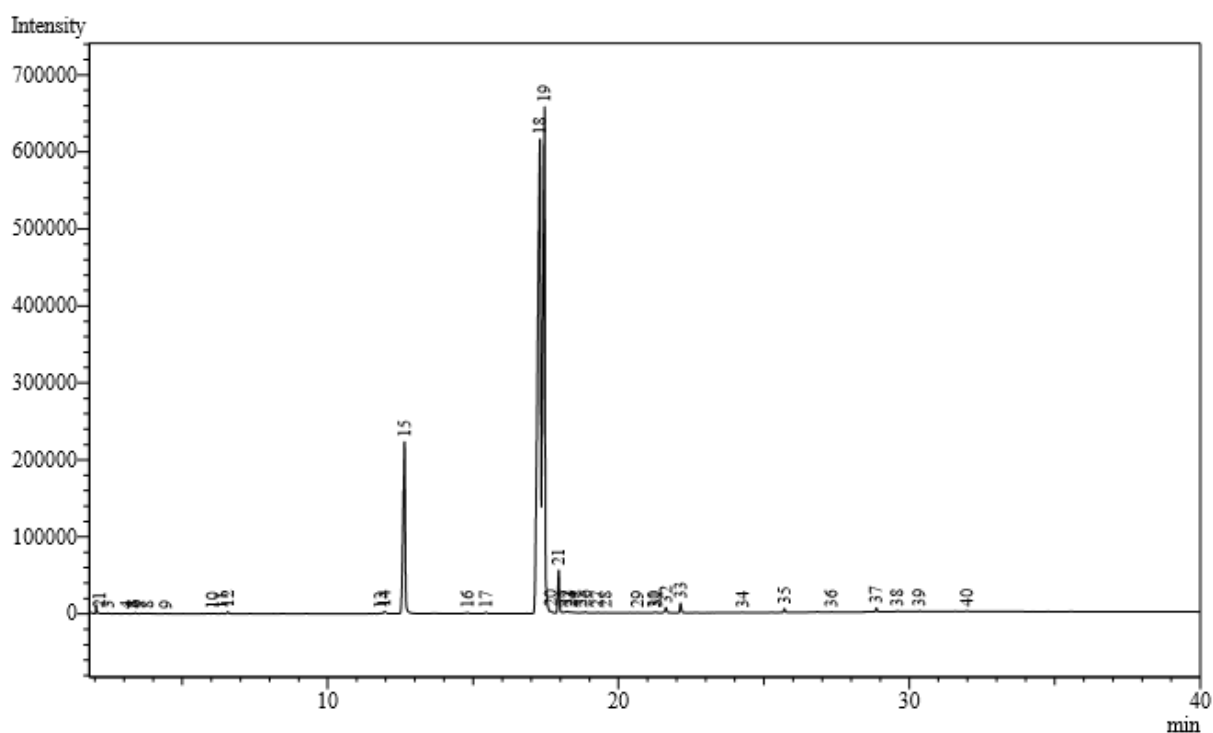


Figura 4: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de milho em reação de hidrólise (Teste 1).

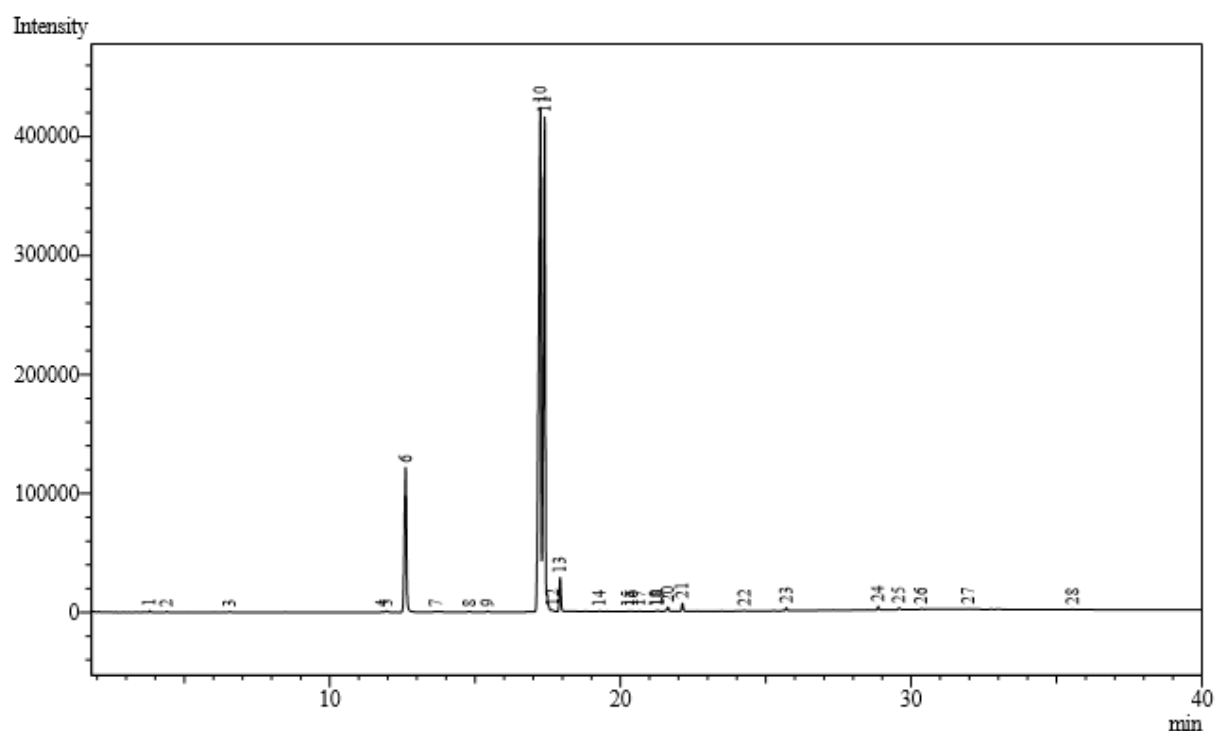


Figura 5: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de milho em reação de hidrólise (Teste 2).

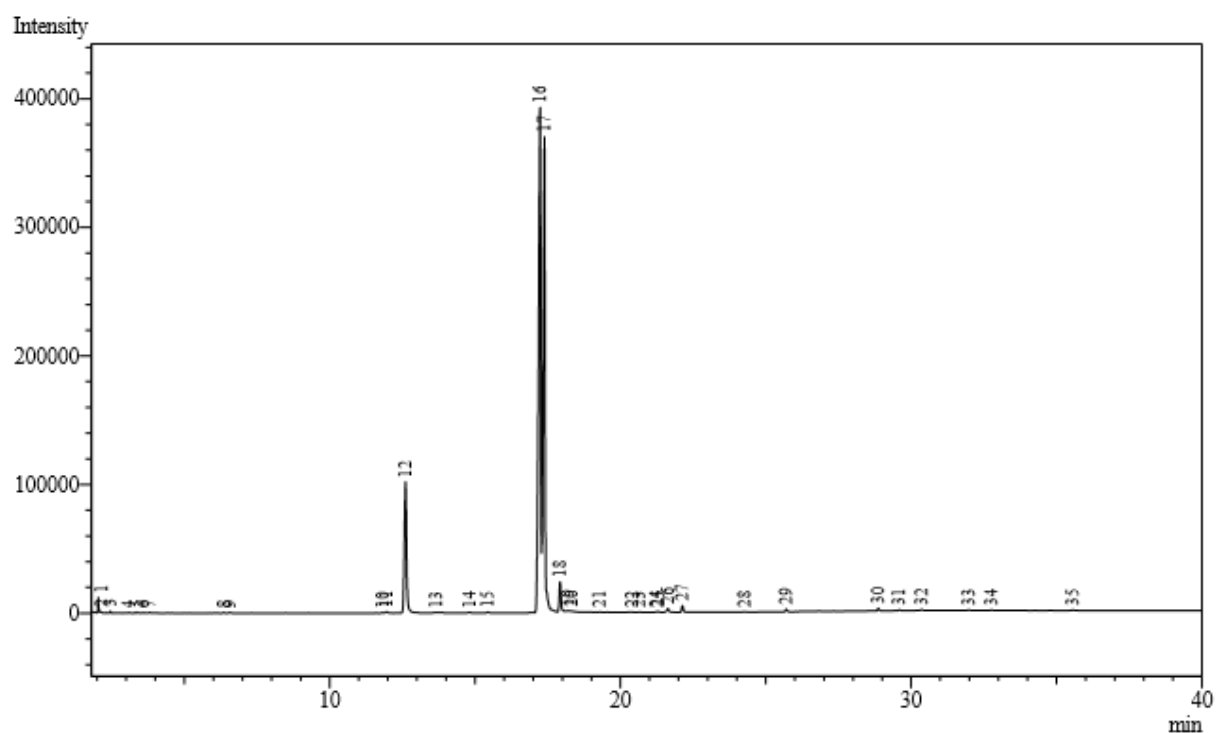


Figura 6: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de milho em reação de hidrólise (Teste 3).

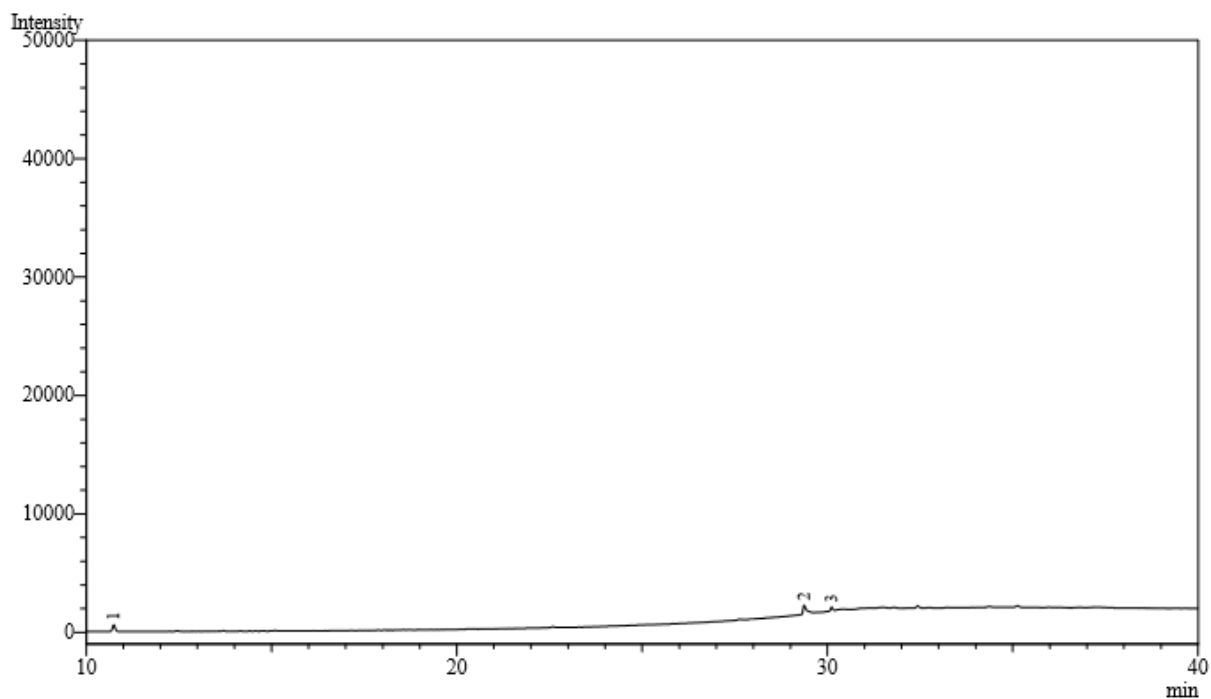


Figura 7: Perfil de ésteres etílicos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de milho em reação de alcoólise.

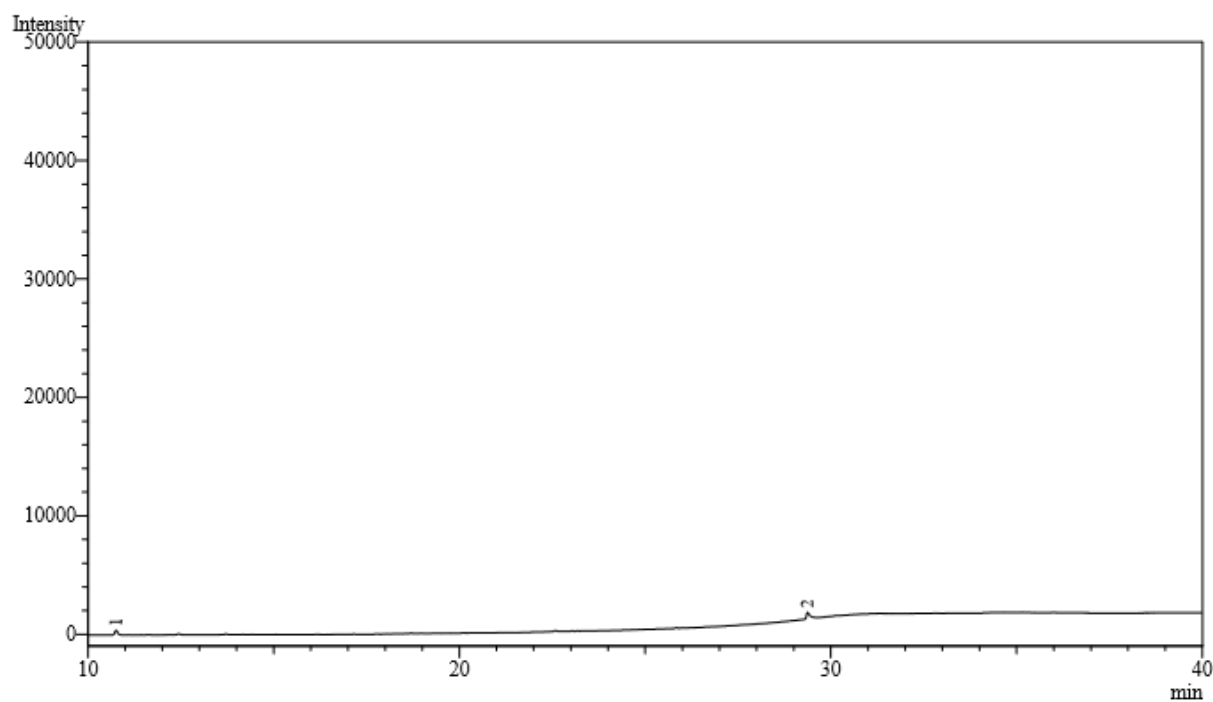


Figura 8: Perfil de ésteres etílicos resultantes da atuação de lipases de *Aspergillus niger* 01 sobre óleo de soja em reação de alcoólise.