



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ALANNA CRISTINNE MARTINS LIMA ZAMBALDI

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS  
AUTÓCTONES DE FRUTOS AMAZÔNICOS E APLICAÇÃO  
NA OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS**

PALMAS - TO

2022

ALANNA CRISTINNE MARTINS LIMA ZAMBALDI

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS  
AUTÓCTONES DE FRUTOS AMAZÔNICOS E APLICAÇÃO  
NA OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

**Coorientador:** Prof. Dr. Fabrício Coutinho de Paula-Elias

**Linha de pesquisa:** Biotecnologia aplicada à indústria de alimentos

PALMAS-TO

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

Z23b      Zambaldi, Alanna Cristinne Martins Lima.

    Bioprospecção de bactérias lipolíticas autóctones de frutos amazônicos e aplicação na obtenção de ésteres de ácidos graxos. / Alanna Cristinne Martins Lima Zambaldi. – Palmas, TO, 2022.

    78 f.

    Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2022.

    Orientador: Alex Fernando de Almeida

    Coorientador: Fabrício Coutinho de Paula-Elias

    1. Lipase. 2. Microrganismos autóctones. 3. Biotecnologia. 4. Frutos Amazônicos. I. Título

**CDD 664**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ALANNA CRISTINNE MARTINS LIMA ZAMBALDI

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS  
AUTÓCTONES DE FRUTOS AMAZÔNICOS E APLICAÇÃO  
NA OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 09 de fevereiro de 2022, pela Banca  
Examinadora constituída pelos membros:

---

Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano

IPT

---

Prof. Dra. Claudia Cristina Auler do Amaral Santos

UFT

---

Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

Orientador- UFT

Dedico este trabalho ao meu esposo Eduardo Zambaldi e a minha filha Marina, meus motivos de viver e querer buscar sempre o melhor para nossa família, amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir concluir mais um objetivo de vida, por me dá saúde e força para vencer cada obstáculo encontrado pelo caminho.

Agradeço ao meu esposo Eduardo, meu exemplo de vida e dedicação. Obrigada por cada cuidado, carinho, e por entender os momentos que precisei estar ausente.

Agradeço a minha mãe Maria Cleide, por sempre me incentivar a estudar e entender que o estudo é a base de tudo.

Ao meu orientador, professor Dr. Alex Fernando de Almeida, por todo conhecimento passado, pela paciência e compreensão, pelas horas dedicadas a execução desse trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Fabrício Coutinho por toda ajuda na execução dos experimentos, pela motivação e dedicação.

Agradeço as minhas amigas Lunara e Iara. Sou imensamente grata por ter tido vocês ao meu lado, compartilhando momentos ruins, mas desfrutando dos bons momentos também, por sempre me apoiarem e me fazer acreditar que sou capaz.

Agradeço aos alunos da iniciação científica Jonatas e Iarley e a Dra. Fernanda Leal pelo auxílio e contribuição na realização dos experimentos.

Agradeço ao Robson, Débora, Annanda e Dheyson que me proporcionaram estrutura das mais diversas formas possíveis, fornecendo desde reagentes a apoio e conhecimento.

Aos meus colegas de turma, que compartilharam dos momentos sérios, tensos e divertidos, mas sempre apoiando uns aos outros.

À Dra. Solange por ter aberto as portas do seu laboratório, fornecendo toda estrutura para a execução dessa pesquisa.

À CAPES pela concessão de recursos de custeio para o desenvolvimento do Projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

À Universidade Federal do Tocantins pela infraestrutura disponibilizada para a execução dos experimentos

## RESUMO

As lipases são enzimas que catalisam reações de hidrólise de triacilgliceróis. As lipases são amplamente utilizadas nas indústrias por ser um excelente biocatalizador. Os frutos da Amazônia possuem um grande potencial para a biotecnologia a partir da exploração de microrganismos autóctones que podem produzir enzimas. O objetivo desse estudo foi caracterizar microrganismos lipolíticos presentes nos frutos amazônicos pupunha e tucumã-do-Brasil. Os microrganismos foram isolados de frutos submetidos a fermentação espontânea nos intervalos de 0, 72, 144, 216, 288 e 360 horas. Os microrganismos selecionados foram avaliados quanto a atividade da lipase e após essa análise foram caracterizados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas. A atividade de esterificação da enzima foi quantificada através da reação de esterificação do ácido mirístico e álcool isobutílico (razão molar 1:1). Foram isolados 481 microrganismos dos dois frutos e a partir da triagem inicial em placas, 41 microrganismos foram selecionados. Entre os 20 isolados selecionados, 16 são pertencentes a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, antes referidos como: PP 107; TCMK 24; TCMK 47; TCMK 61; TCMK 64; TCMK 66; TCMK 71; TCMK 72; TCMK 77; TCMK 85; TCMK 86; TCMK119; TCLB 73; TCLB 74; TCLB 75 e TCLB 76. O isolado TCMK 62, TCMK 78 e TCMK 100 mostraram similaridade com *Stenotrophomonas pavanii*. O isolado TCLB 48 apresentou similaridade para *Pseudomonas boreopolis*. Todas as linhagens selecionadas apresentaram potencial para reações de esterificação, sendo que *P. aeruginosa* TCMK 72 apresentou o maior valor (17,83%), seguido por *P. aeruginosa* TCMK 71 e *P. aeruginosa* TCMK 77, com 13,41 % e 13,28%, respectivamente. A atividade hidrolítica dos diferentes microrganismos produtores de lipase foi avaliada em substratos de p-nitrofenila (C4; C8; C10; C12; C14; C16; C18). Dentre os 7 substratos testados, o C12 foi o que mais se destacou, sendo a maior atividade relativa para 12 linhagens, seguido por C8, C16 e C18 com 2 isolados, e C10, e C14 com 1 isolado. A partir do perfil de hidrólise enzimática de cada isolado, pode-se sugerir a formulação de um coquetel enzimático com diferentes isolados e para aplicações na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** Lipase; Microrganismos autóctones; Biotecnologia; Frutos Amazônicos.

## ABSTRACT

Lipases are enzymes that catalyze the hydrolysis of triacylglycerols. Lipases are widely used in industries for being excellent biocatalysts. The fruits of the Amazon have great potential for biotechnology from the exploitation of autochthonous microorganisms that can produce enzymes. The objective of this study was to characterize lipolytic microorganisms present in the Amazonian peach palm and tucumã-do-Brasil fruits. The microorganisms were isolated from fruits submitted to spontaneous fermentation in the intervals of 0, 72, 144, 216, 288, and 360 hours. The selected microorganisms were evaluated for lipase activity and after this analysis, they were characterized according to their morphological and biochemical characteristics. The esterification activity of the enzyme was quantified through the esterification reaction of myristic acid and isobutyl alcohol (1:1 molar ratio). 481 microorganisms were isolated from the two fruits and from the initial sorting on plates, 41 microorganisms were selected. Among the 20 selected isolates, 16 belong to the *Pseudomonas aeruginosa* species, previously referred to as: PP 107; TCMK 24; TCMK 47; TCMK 61; TCMK 64; TCMK 66; TCMK 71; TCMK 72; TCMK 77; TCMK 85; TCMK 86; TCMK119; TCLB 73; TCLB 74; TCLB 75 and TCLB 76. The isolate TCMK 62, TCMK 78, and TCMK 100 showed similarity to *Stenotrophomonas pavanii*. The isolate TCLB 48 showed similarity to *Pseudomonas boreopolis*. All selected strains showed potential for esterification reactions, with *P. aeruginosa* TCMK 72 showing the highest value (17.83%), followed by *P. aeruginosa* TCMK 71 and *P. aeruginosa* TCMK 77, with 13.41 % and 13, 28%, respectively. The hydrolytic activity of different lipase-producing microorganisms was evaluated on p-nitrophenyl substrates (C4; C8; C10; C12; C14; C16; C18). Among the 7 substrates tested, C12 stood out the most, with the highest relative activity for 12 strains, followed by C8, C16, and C18 for, and C10, C14 for. From the enzymatic hydrolysis profile of each isolate, it is possible to suggest the formulation of an enzymatic cocktail with different isolates and for applications in the food industry.

**Keywords:** Lipase; Autochthonous microorganisms; Biotechnology; Amazonian Fruits.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Representação esquemática da dobra da $\alpha/\beta$ -hidrolase. Folhas $\beta$ (1–8) são mostradas como setas azuis, hélices $\alpha$ (A – F) como colunas vermelhas. As posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica são indicadas como círculos laranja. <b>Fonte:</b> Bornscheuer (2002) .....	19
<b>Figura 2-</b> Ativação interfacial de lipases versus gotas de substrato insolúvel. <b>Fonte:</b> Rodrigues et al. (2019) .....	21
<b>Figura 3.</b> Resumo esquemático do isolamento e manutenção dos microrganismos isolados. <b>Fonte:</b> autor (2022) .....	28
<b>Figura 4.</b> Área de formação de halo pela precipitação dos cristais de cálcio. <b>Fonte:</b> autor (2022) .....	29
<b>Figura 5.</b> Resumo esquemático determinação da atividade enzimática de lipase. <b>Fonte:</b> autor (2022) .....	31
<b>Figura 6.</b> Atividade enzimática de lipase em ésteres <i>p</i> -nitrofenílicos. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 7 a 40° C. <b>Fonte:</b> autor (2022) .....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Quantidade de enzimas utilizadas para reação de esterificação .....	35
<b>Tabela 2.</b> Triagem de linhagens microbianas com potencial para a produção de enzimas lipolíticas .....	39
<b>Tabela 3.</b> Triagem de linhagens microbianas produtoras de lipase isoladas de frutos amazônicos .....	42
<b>Tabela 4.</b> Caracterização macroscópicas dos microrganismos produtores de lipase	46
<b>Tabela 5.</b> Morfologia Celular e Testes Bioquímicos .....	48
<b>Tabela 6.</b> Análise de Extração de DNA .....	49
<b>Tabela 7.</b> Identificação de bactérias amplificadas pelo gene rRNA 16S .....	50
<b>Tabela 8.</b> Atividade de esterificação e rendimento da esterificação de lipases produzidas por linhagens isoladas de frutos amazônicos .....	54
<b>Tabela 9.</b> Aplicação de lipases microbianas para síntese de ésteres .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

FES: Fermentação submersa

FSM: Fermentação em estado sólido

LB: Caldo lisogênico

h: Hora

min: minuto

MM: meio mineral

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Fosfato dipotássico

Mg: Magnésio

HCL: Ácido clorídrico

NaOH: Hidróxido de sódio

pNP : para nitrofenol

p-NPP: para nitrofenil palmitato

rpm: rotação por minuto

EPA: Ácido Eicosapentaenóico

DHA: Ácido Docosahexaenoico

DMSO: Dimetilsulfóxido

PCR: Cadeias de polimerase

RNA: Ácido ribonucleico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.</b>	<b>Frutos Amazônicos .....</b>	<b>15</b>
2.1.1.	Pupunha ( <i>Bactris gasipaes Kunth</i> ) .....	15
2.1.2.	Tucumã ( <i>Astrocaryum vulgare Mart</i> ) .....	16
<b>2.2.</b>	<b>Enzimas .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.</b>	<b>Lipases .....</b>	<b>18</b>
2.3.1.	Mecanismos de ação .....	19
2.3.2.	Fontes produtoras de lipase .....	21
2.3.3.	Produção de lipases microbianas .....	22
2.3.4.	Caracterização e propriedades bioquímicas de lipase microbiana .....	23
2.3.5.	Aplicações .....	23
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>26</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.</b>	<b>Coleta dos frutos e fermentação .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.</b>	<b>Isolamento e manutenção dos microrganismos .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.</b>	<b>Seleção dos microrganismos produtores de lipase .....</b>	<b>29</b>
4.3.1.	Triagem de microrganismos lipolíticos em placa contendo meio seletivo e diferencial .....	29
4.3.2.	Triagem de microrganismos lipolíticos em cultivos submersos .....	30
<b>4.4.</b>	<b>Determinação da atividade de lipase .....</b>	<b>30</b>
<b>4.5.</b>	<b>Caracterização dos microrganismos produtores de lipase .....</b>	<b>32</b>
4.5.1.	Caracterização morfológica e bioquímica .....	32

4.5.2.	Coloração de Gram .....	32
4.5.3.	Morfologia celular .....	32
4.5.4.	Teste de Catalase .....	32
4.5.5.	Teste de Oxidase .....	33
<b>4.6.</b>	<b>Caracterização molecular .....</b>	<b>33</b>
4.6.1.	Análises das sequências obtidas .....	34
<b>4.7.</b>	<b>Aplicação das enzimas em reação de esterificação enzimática .....</b>	<b>34</b>
3.7.1	Teor de ácido carboxílico .....	35
3.7.2.	Atividade de esterificação .....	36
3.7.3.	Percentual de esterificação .....	36
<b>4.8.</b>	<b>Especificidade por substratos .....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1.</b>	<b>Isolamento e triagem de microrganismos lipolíticos em meio sólido</b>	<b>37</b>
<b>5.2.</b>	<b>Triagem de microrganismos lipolíticos em cultivos submersos .....</b>	<b>40</b>
<b>5.3.</b>	<b>Caracterização morfológicas e bioquímicas das linhagens isoladas produtoras de lipase .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4.</b>	<b>Análise molecular .....</b>	<b>49</b>
<b>5.5.</b>	<b>Aplicação das enzimas em reação de esterificação enzimática .....</b>	<b>54</b>
<b>5.6.</b>	<b>Especificidade do substrato .....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O mercado de enzimas industriais foi avaliado em mais de US\$ 6,0 bilhões em 2021 e está projetado para um aumento de 6% entre 2022 e 2027 (Mordor Intelligence, 2021). As lipases são responsáveis por 10% das enzimas industriais no mundo todo, com demanda estimada em 6,2% ao ano, desta forma, representa uma porcentagem importante atraindo cada vez mais interesse de produção a partir de novas fontes (TACIN et al., 2019; SEDDIGI et al., 2017).

Lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases que possuem como papel principal catalisar a hidrólise de triacilgliceróis fornecendo diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres e glicerol (CAO et al., 2019; BANSODE et al., 2017; CAI, et al. 2018; RIOS et al. 2018). Além de sua função principal de hidrólise, na ausência de água as lipases podem catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos (KANMANI et al., 2015; SALIHU; ALAM, 2015; SEDDIGI et al., 2017; JAVED et al., 2018; ROBIC et al, 2017).

As lipases são produzidas principalmente a partir de fungos filamentosos e bactérias. No entanto, as lipases podem ser oriundas de qualquer organismo vivo, sendo suas fontes organismos microbianos, vegetais e animais. As lipases microbianas são as mais utilizadas em aplicações biotecnológicas (TISMA et al. 2019; CAO et a., 2019; JAVED et al., 2018; MAK; SIMOM, 2019; BANSODE et al., 2017; RASHID et al., 2018; SEDDIGI et al., 2017). Pelo fato de as lipases serem provenientes de várias fontes, a padronização se torna inviável, pois suas propriedades variam de acordo com o organismo que a produziu. Portanto tem-se a variação de 20 a 75 kDa para o peso molecular; valores de pH ótimo de atividade variando de 4 a 9; e temperaturas ótimas de 25 a 70°C (RIOS et al. 2018).

As lipases microbianas são excelentes biocatalisadores, sendo a alta atividade, especificidade e seletividade, propriedades importantes nas reações catalizadas em condições favoráveis (ALMEIDA et al., 2018). Do ponto de vista industrial, as lipases representam grandes vantagens como, maior atividade catalítica, facilidade de manipulação genética do microrganismo produtor, ampla disponibilidade, produção em grande quantidade, uso de meios de cultura de crescimento mais baratos, alta eficiência e estabilidade, não exige cofatores e

coenzimas, condições operacionais amenas e são biodegradáveis, o que as tornam atraentes do ponto de vista ambiental (CAO et al., 2019; JAVED et al., 2018; BRÍGIDA et al., 2014; SEDDIGI et al. 2018; SALIHU; ALAM, 2015; ARBIGE et al., 2019)

Devido à sua versatilidade e extensa propriedade catalítica, as lipases são amplamente utilizadas como biocatalisadores com aplicações na medicina, produtos detergentes, produção e processamento de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, fabricação de papel, síntese química e no tratamento de águas residuais (PASCOAL et al., 2018; NAVVABI et al., 2018 ; MAK; SIMOM, 2019; BHARATHI et al, 2019; SEDDIGI et al. 2018; ZAITSEV et al, 2019). Na indústria de alimentos e bebidas, a lipase é usada principalmente na maturação de queijos como intensificador de sabor, e na produção de ésteres na panificação, além da fabricação de cerveja, laticínios e processamento de proteínas (RASHID et. al, 2018; ARBIGE et al., 2019)

Os frutos da Amazônia possuem um grande potencial para exploração na agroindústria e para a comunidade científica. Isso se deve ao fato desses frutos serem considerados fontes de micronutrientes, como vitaminas, minerais, compostos fenólicos, fibras alimentares, o que agrega valor na saúde de quem os consomem (ANUNCIACÃO et al., 2019). Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) e pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*) são muito populares na região norte do Brasil e seus frutos estão disponíveis nos comércios locais e consumidos *in natura* ou usados para preparar pratos da região. O tucumã e a pupunha são palmeiras pertencentes à família *Arecaceae*, e os frutos de formato oval e cor que varia do amarelo a laranja (MATOS et al., 2019).

Por possuir um extenso território, o Brasil concentra uma grande biodiversidade, que representa um potencial para vários estudos, visto que sua ecologia é pouco conhecida e pode constituir fontes importantes para novos processos biotecnológicos (TEIXEIRA et al., 2019 TISMA et al. 2019; NEVES et al., 2015). Os benefícios dos frutos amazônicos vão além de seu uso local e sua aplicação na biotecnologia é capaz de gerar rentabilidade a partir da exploração e identificação de microrganismos autóctones que durante a fermentação espontânea podem produzir enzimas de novas linhagens microbianas, que por sua vez, serão utilizadas no enriquecimento de produtos alimentícios, agregando valor aos frutos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Frutos amazônicos

A floresta amazônica é o bioma biologicamente mais rico do mundo e abriga cerca de 25% de toda a biodiversidade existente, com uma vasta coleção de espécies vegetais, muitas delas ainda não exploradas e possivelmente, não catalogadas (PAZ et al., 2018; CARDOSO et al., 2017; FARIA et al., 2021).

Estima-se que na Amazônia há em torno de 50.000 espécies de plantas, sendo várias delas frutíferas (CARDOSO et al., 2017). Muitos dos frutos são conhecidos pela população local e são utilizados como fonte de alimentos, artesanato e extração de compostos medicinais. Esses frutos ainda são subexplorados pelas indústrias devido à falta de estudos e dados relacionados a composição físico-química, valor nutricional propriedades sensoriais e medicinal. No entanto, diante do potencial econômico, tecnológico e nutricional, alguns frutos estão sendo explorados pela área científica e tecnológica, tornando possível dessa forma, a exploração também por parte das indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (CÂNDIDO et al., 2015; CUNHA et al., 2020; COSTA et al., 2017; ASSMANN et al., 2021; ANUNCIACÃO et al., 2019; NEVES et al., 2015).

#### 2.1.1 Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth)

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmácea da família das Aracáceas que ocorre naturalmente em áreas tropicais na América do Sul e Central (FARIAS NETO, 2005; CLEMENT et al., 2009; KALIL et al., 2010; KERR et al., 2012). No Brasil, a pupunha é encontrada principalmente nos estados que compõe a Amazônia, com destaque ao Pará e Amazonas (CARVALHO et al., 2013).

A pupunheira na região amazônica tem duas finalidades comerciais: o palmito (estipe) e o fruto (pupunha). O palmito decorre da grande aceitação pelas diversas formas de consumo,



bem como valor nutritivo e alta capacidade de produção (FARIAS NETO, 2005; CARVALHO et al., 2009; SANTOS et al., 2020). O fruto é uma drupa de variadas formas (cônica, ovóide e elipsoide), com cerca de 4 a 6 cm de comprimento e 3 a 5 cm de largura, e pesos que vão entre 20 a 205 g. O fruto apresenta um fino exocarpo de coloração que varia entre vermelho, laranja e amarelo, a depender do estágio de maturação e mesocarpo incolor, de sabor levemente agri-doce (ARAUJO et al., 2021; BASTO et al., 2016; SANTOS et al., 2017; SILVA et al., 2021).

A pupunha é comercializada de forma predominante, em feiras livres e comércios locais (BRANDÃO, 2020). O palmito pode ser encontrado tanto in natura, quanto em conserva. Os frutos são tradicionalmente consumidos após cozimento em água com sal para eliminar os cristais de oxalato de cálcio da casca, mas podem se apresentar também em farinhas, geleias, bebidas fermentadas (ARAUJO et al., 2021; ORDONEZ-SANTOS et al., 2019), e ainda como ingrediente culinário para extração de óleo vegetal e ração animal (SANTOS et al., 2017).

As características da pupunheira a torna um grande potencial para exploração. A produção de palmito pode ser aumentada com plantios ordenados (CORDEIRO; SILVA, 2010) e o fruto por apresentar elevado valor nutritivo e propriedades nutricionais interessantes, com composição química rica carotenoides, fibra alimentar, aminoácidos essenciais, vitamina A, minerais, proteínas e ácidos graxos insaturado (BORGES et al., 2017). A propriedade amilácea e a ausência de glúten da pupunha a torna bastante significativa e com apelo funcional, podendo ser empregada em bebidas alcoólicas fermentadas e produtos para celíacos, por exemplo (ARAUJO et al., 2021).

### **2.1.2 Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.)**

O tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart) é uma das espécies de palmeira pertencente à família Arecaceae (MATOS et al., 2019; BALDISSERA et al., 2017). Popularmente conhecido como tucumã-do-Pará, tucumã comum, tucumã pitanga e ainda, tucum bravo, é encontrado em parte da América Central e no norte da América do Sul. No Brasil, esta palmeira concentra-se principalmente na parte leste da Amazônia, nas regiões Norte (Amapá, Pará e Tocantins), Nordeste (Maranhão e Piauí) e Centro-Oeste (Goiás) (OLIVEIRA et al., 2018; FONSECA et al., 2021; ELIAS, 2017).

As palmeiras do tucumã crescem próximas a rios, em campo limpo ou vegetação baixa (desenvolvem-se bem também em áreas degradadas, de solos podres) e, podem alcançar até 15 metros de altura, com 15 a 20 cm de diâmetro, sendo os entrenós e as folhas cobertos por espinhos pretos, com folhas medindo até 2 metros de comprimento. Essa espécie floresce entre os meses de março a julho e frutifica na época das chuvas, de janeiro a abril. O tucumã pode produzir até 5 cachos de frutos por ano, e cada cacho contém entre 200 a 400 frutos em média. Os frutos são normalmente elipsoides de 3,5 a 5 cm de comprimento e 2,5 a 4 cm de diâmetro. O epicarpo verde adquire cor amarela, alaranjada ou vermelha quando maduro. O mesocarpo é laranja, carnosos, de consistência pastosa/oleosa e gosto adocicado (ELIAS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018; MATOS et al., 2019; CRAVEIRO et al., 2014; FONSECA et al., 2021).

O tucumã tem aproveitamento quase total, sendo utilizado desde a planta até os frutos, apresentando uso variado. Da palmeira se utiliza o estipe para palmito e construção civil, as folhas são usadas para artesanato, como fabricação de chapéus, cestas, redes e do fruto são extraídos o mesocarpo, que pode ser consumido *in natura* ou em sanduíches, tapioca, na forma de suco, sorvete, creme, licor, sendo o endocarpo utilizado na produção de biojóias e a semente na extração de óleo para insumo nas indústrias de cosméticos e alimentícia (DIDONET, 2012; CRAVEIRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018). O tucumã raramente é vendido em supermercados, os frutos inteiros ou a polpa são comercializados em feiras livres e no comércio local. (FERREIRA et al., 2019; DIDONET; FERRAZ, 2014; ZANINETTI, 2009).

Por serem ricos em compostos bioativos, vitamina E, carotenoides, ácidos graxos, fibras e polifenóis, os frutos do tucumã têm potencial medicinal, podendo ser explorados também nas indústrias cosméticas, farmacológicas, agrícola e química (FREITAS et al., 2021a; FERREIRA et al., 2009; MENEZES et al., 2022; FREITAS et al., 2021b; FERREIRA et al., 2021). No entanto, ainda há poucos estudos relacionados ao seu aproveitamento e domesticação, sendo os escassos estudos sobre caracterização de frutos amazônicos voltados a espécies de expressão econômica (SANTOS et al., 2017; FERREIRA et al., 2009).

## 2.2 Enzimas

Enzimas são biomoléculas que têm a capacidade de acelerar reações com redução na energia de ativação. Em escala industrial elas possuem grande potencial principalmente devido às condições operacionais, pois processos intermediados por enzimas geralmente acontecem em condições amenas de temperaturas e pH, reduzindo dessa forma, o consumo de energia (KUMAR et al., 2020).

Outras vantagens das enzimas incluem os altos índices de conversão, alta sensibilidade, além de apresentar maior seletividade quando comparada com catalisadores de rotas convencionais. Ressalta-se a sua importância para substituição de substâncias químicas obtidas por vias convencionais, contribuindo com a otimização de processos de produção e a preservação do meio ambiente, tendo em vista que, geram pouco ou nenhum resíduo, sendo considerada uma tecnologia limpa (WANDERLEY et al, 2011).

Embora por muito tempo os estudos e aplicação das enzimas tenham sido limitados devido ao seu alto custo, esse fator tem sido contraposto com certas vantagens, como por exemplo, a sua aplicação para produtos que tenham maior valor agregado (GOUJARD et al., 2016), possibilidade de aplicação no aproveitamento de resíduos (TSEGAYE, JAISWAL & JAISWAL, 2021) e reutilização da enzima no processo (PIAZZA et al., 2021). Baseado nisso, o uso industrial de enzima, em especial, as microbianas, aumentou significativamente durante o século XXI, incluindo os estudos e a aplicação em larga escala de enzimas lipolíticas (SAVICKAITE et al., 2021).

## 2.3 Lipases

Dentre as enzimas lipolíticas, as lipases merecem destaque, sendo conhecidas como triacilglicerol acilidrolase (EC 3.1.1.3). Elas atuam nas ligações de éster carboxílico e hidrolisam completamente os triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol (LIU et al, 2017).

A crescente demanda de estudos e aplicação industrial destas enzimas é devido a sua importância econômica e ambiental. O método fornece condições sustentáveis para catalisar vários tipos de reações que são úteis para obtenção de produtos verdes e sua aplicação pode ser

realizada na indústria de alimentos, indústria farmacêutica, de cosméticos e na obtenção de biodiesel (CHOONG et al., 2016; SAVICKAITE et al., 2021).

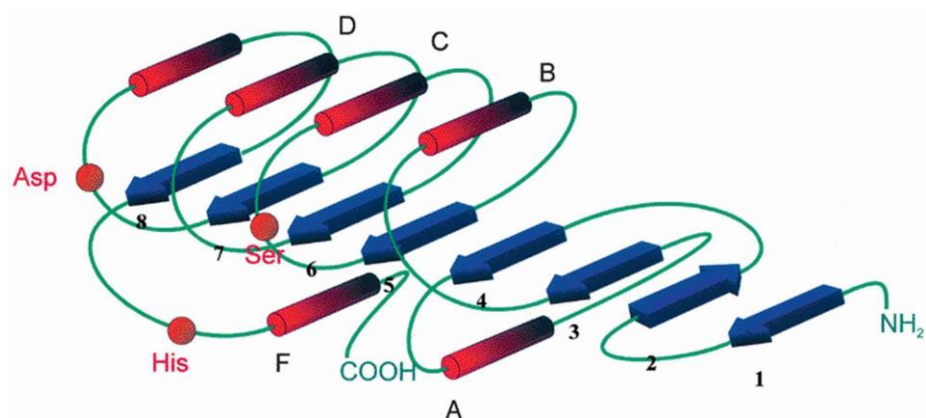
As enzimas lipolíticas encontram amplas possibilidades de aplicação em decorrência da sua especificidade, disponibilidade e estabilidade em meios orgânicos e aquosos (ARIS et al., 2016; MOHTASHAMI et al., 2019; SAVVIDOU et al., 2018).

### 2.3.1. Mecanismo de ação

As enzimas lipolíticas são enzimas que podem ser encontradas facilmente em animais, plantas e microrganismos. Tais enzimas são classificadas em dois principais grupos: as lipases, conhecidas como “verdadeiras” enzimas lipolíticas (EC 3.1.1.3) e carboxilesterases (EC 3.1.1.1) (CHOI et al., 2016; KANMANI et al., 2015).

As estruturas tridimensionais dessas enzimas apontam uma dobra conhecida como  $\alpha/\beta$ -hidrolase, composta por estruturas  $\beta$ -pregueadas paralelas e antiparalelas, com separação por trechos de  $\alpha$ -hélice (KOBBLITZ, 2019). Por serem serina hidrolases, apresentam uma serina como resíduo catalítico chave (FISCHER e PLEISS 2003), conforme pode ser observado na Figura 1.

**Figura 1-** Representação esquemática da dobra da  $\alpha/\beta$ -hidrolase.



Folhas  $\beta$  (1–8) são mostradas como setas azuis, hélices  $\alpha$  (A – F) como colunas vermelhas. As posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica são indicadas como círculos laranja. **Fonte:** Bornscheuer (2002).

As enzimas lipolíticas são conhecidas por catalisar a hidrólise e a síntese de compostos de éster (RAMNATH, SITHOLE; GOVINDEN, 2016a).

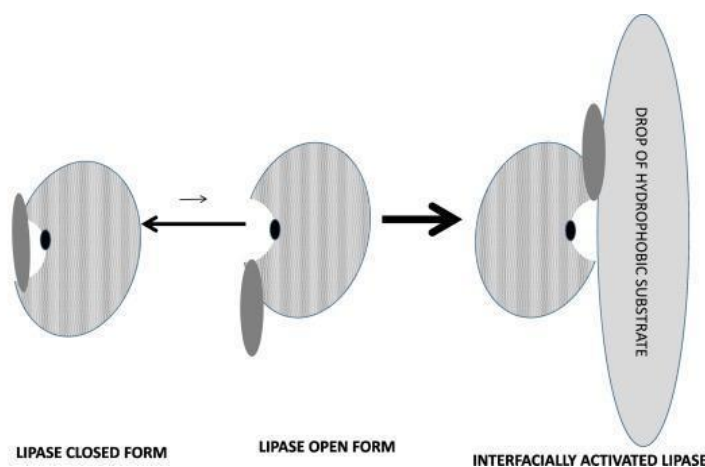
O mecanismo de catálise é basicamente o mesmo para lipases e esterases, contemplando quatro etapas fundamentais: inicialmente, o substrato liga-se à serina ativa, onde resulta na produção de um intermediário tetraédrico que é estabilizado pelos resíduos catalíticos Histidina e Ácido aspártico (também mostrado na Figura 1). Posteriormente, o álcool é liberado e um complexo acil-enzima é formado. Em seguida, ocorre o ataque de um nucleófilo (podendo ser água na hidrólise, álcool ou éster) onde novamente é formado um intermediário tetraédrico, que após resolução irá produzir o produto, este pode ser um ácido ou um éster, juntamente com uma enzima livre (BORNSCHEUER, 2002; BORNSCHEUER & KAZLAUSKAS, 1999).

As lipases atuam nas ligações de éster carboxílico que estão presentes nos triacilgliceróis para liberar ácidos graxos e glicerol em um meio líquido (VILLENEUVE et al., 2000; GUPTA & RATHI, 2004).

É interessante ressaltar que as lipases são enzimas que apresentam um mecanismo conhecido como ativação interfacial (RODRIGUES et al., 2019). Essa ativação interfacial é decorrente de uma estrutura polipeptídica que recobre o sítio-ativo (denominada de tampa), cuja constituição é de uma face hidrofílica e outra hidrofóbica, onde altos níveis de atividade são observados na presença de uma concentração mínima de substrato (ARAÚJO et al., 2008).

Essa tampa permite a existência de duas formas conformacionais das lipases que permanecem em equilíbrio em meio homogêneo, são elas: a forma fechada e aberta (KHAN et al., 2017). Essas formas podem ser observadas na Figura 2, onde nos mostra também a ativação interfacial das lipases em relação a presença de um substrato insolúvel. Em meio aquoso salino homogêneo a lipase tende a permanecer fechada pela tampa, porém ao aplicar um substrato hidrofóbico, como é o caso do óleo, a lipase segue a cinética de saturação padrão sendo adsorvida na gota de substrato, onde tem-se a abertura do seu centro ativo, passando para a forma aberta, como a lipase fica adsorvida ela torna-se capaz de atacar os substratos insolúveis, com isso ocorre o aumento da atividade enzimática, denominando essa adsorção de atividade interfacial (KHAN et al., 2017; HERNANDEZ & FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; TACIAS-PASCACIO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019; YAACOB et al., 2017).

**Figura 2-** Ativação interfacial de lipases versus gotas de substrato insolúvel.



**Fonte:** Rodrigues et al. (2019).

Ademais, destaca-se a preferência das lipases pelos ácidos graxos de cadeia longa, com mais de dez átomos de carbono. O que foi confirmado no estudo de KANMANI et al. (2015), onde os autores usaram uma nova cepa lipolítica para clonagem e caracterização. Nesse estudo, foi observado que a lipase teve preferência por ésteres p-nitrofenílicos de cadeia longa, mostrando sua atuação na interface óleo-água.

### 2.3.2. Fontes produtoras de lipase

As lipases podem ser obtidas de diversas fontes, pois ocorrem amplamente na natureza e todos os organismos são produtores. No entanto, as lipases de origem microbiana são mais atrativas do ponto de vista comercial devido ao baixo custo de produção e alto rendimento, maior disponibilidade e diversidade, requerimento nutricional simples e alta estabilidade. As lipases microbianas são produzidas por bactérias, fungos e leveduras. Dentre os microrganismos produtores, as espécies que se destacam são: as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Burkholderia*; leveduras dos gêneros *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomycopsis* e; fungos dos gêneros *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Rhizomucor* (LIU e KOKARE, 2017; JESUS et al., 2016; KUMAR et al., 2020; RAVEENDRAN et al., 2018; GUERRAND, 2017; GAUR et al., 2017).

### 2.3.3. Produção de lipases microbianas

A produção de lipase microbiana é fortemente influenciada por fatores nutricionais (concentração das fontes de carbono e nitrogênio, presença ou ausência de indutores) e fatores físicos (pH de cultivo, temperatura, agitação, aeração do meio). Portanto, o processo de produção enzimática requer avaliação quanto aos parâmetros a serem empregados e microrganismo selecionado (ARAVINDAN et al., 2007; COLLA et al., 2016; MORAIS-JUNIOR et al., 2016).

As lipases microbianas são enzimas exclusivamente extracelulares e a composição química do meio é de grande importância. Para uma secreção satisfatória, são necessárias fontes de nitrogênio e carbono adequadas, devendo as mesmas, serem de fácil metabolização, para que ocorra o crescimento microbiano apropriado. Além disso, sendo a maioria das lipases de caráter indutivo, é essencial um indutor apropriado (OLIVEIRA, 2015; CORTEZ et al., 2016; MORAIS-JUNIOR et al., 2016). As fontes de carbono comumente utilizadas para produção de lipase de origem microbiana são: azeite de oliva e palma, óleos de girassol, algodão e milho, trioleína, tributirina, Tween 20 e Tween 80. Outro componente que também apresentam efeitos na produção de lipase são nitrogênio orgânico (peptona, triptona, extrato de levedura, caseína e ureia) e inorgânico (sulfato, fosfatos, cloretos, nitratos e nitritos) (FERREIRA, 2015; COLLA et al., 2012).

A produção de lipase pode ser desenvolvida de duas formas: fermentação submersa (FSM) e fermentação em estado sólido (FES). Independentemente das vantagens e desvantagens, a fermentação submersa é a mais utilizada para produção enzimática e é caracterizada pela suspensão dos microrganismos em meio fermentativo líquido, rico em nutrientes dissolvidos. As vantagens desse método estão relacionadas à homogeneização do meio de cultura, facilitando o acesso dos microrganismos aos nutrientes disponíveis, bem como controle de temperatura, pH, agitação, concentração de indutores e aeração. A preferência por esse método em escala industrial se dá pela facilidade das etapas posteriores para purificação dos produtos finais, que pode ser realizada por um simples processo de filtração ou centrifugação, sendo possível ainda, a utilização da massa celular para cultivos futuros (OLIVEIRA, 2015; TEIXEIRA, 2017; MESSIAS et al., 2011).

A fermentação em estado sólido é o processo no qual os microrganismos se desenvolvem utilizando o substrato insolúvel como fonte de carbono e energia na ausência de

água livre. A vantagem em utilizar esse método se dá por meios de cultivos mais baratos, visto que podem ser utilizados resíduos agroindústrias, possui baixo risco de contaminação, e se aproxima das condições de vida natural dos microrganismos (SOCCOL et al., 2017; RIGO et al., 2021; BHARATHI et al., 2018).

#### **2.3.4. Caracterização e Propriedades bioquímicas de lipase microbiana**

Conhecer as características e as propriedades bioquímicas das lipases microbianas é de grande importância, principalmente quando o objetivo é as aplicações industriais. As lipases possuem variações em sua molécula de acordo com o microrganismo que a produz. A massa molar da proteína varia entre 19 a 75 kDa, possuem uma ampla faixa de pH de 4 a 9, sendo que para boa parte dos microrganismos, valores próximos a neutralidade são melhores. Em relação a temperatura ótima de atuação, tem-se a faixa de 25 a 70 °C (RIOS et al, 2018; ANGAJALA et al., 2016; JAVED et al., 2018).

#### **2.3.5. Aplicações**

Devido à sua versatilidade, as lipases são bastante requeridas para aplicação em diversos segmentos industriais, tais como: alimentos, cosméticos, farmacêutica, químicas, têxtil (KUMAR et al., 2020; MESSIAS et al., 2011).

Na indústria de alimentos, as lipases têm se tornado importantes pela capacidade de catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. No setor de laticínios, as lipases são aplicadas em reações de hidrólise do leite, atuando na intensificação, maturação e produção de aromas em queijos e, modificando a composição de ácidos graxos na manteiga. No setor de bebidas e panificação, também podem ser usadas para melhorar o sabor através da produção de aromas, além de prolongar a validade desses produtos. Em carnes, utilizam o processo de transesterificação para torná-las mais saudáveis, auxiliar no sabor e aroma, além de reduzir taxas de gordura (PEREIRA et al, 2019; GUERRAND et al, 2017; BAYOUT et al., 2020; CAI et al., 2017).

O uso dessas enzimas, tanto para indústria de alimentos, quanto para a indústria farmacêutica visando a aplicação de polióis obtidos por via mais sustentável também é alvo de estudos. Sabe-se que a produção desses produtos a partir de óleos não fósseis está concentrada



na via convencional, ou seja, sua obtenção é por meio de síntese química. Nesse sentido, verificou-se no estudo de Šulcienė et al. (2018), o potencial de enzimas lipolíticas para formulação de biocatalisadores para uma via fácil de produção verde de polióis a partir do óleo de colza epoxidado.

Na indústria de alimentos e farmacêutica, também se observa a aplicação ampla de cinamato de benzila, por exemplo, na formulação de aromatizantes. A forma de obtenção desse composto é a catálise ácida, contudo é um processo que gera impactos ambientais e por esse motivo alternativas para obtenção de aromas ligada à química verde estão sendo estudadas (SÁ et al., 2017; PIAZZA et al., 2021).

No estudo de Piazza et al. (2021), os autores otimizaram a produção de cinamato de benzila por catálise enzimática, com aplicação da lipase NS88011 imobilizada e constataram que em temperatura de 59 °C e concentração de 4,4 mg.mL<sup>-1</sup> são condições ideais e com redução significativa do biocatalizador, a lipase estudada apresentou bons resultados para rendimento, os autores fizeram a reutilização da enzima e após 13 ciclos, o rendimento ficou acima de 60%. Esses resultados sugerem que esse processo pode ser aplicado na produção enzimática do cinamato de benzila em escala industrial.

Essa percepção do uso de biocatalisadores na produção de compostos por uma via mais sustentável gerando produtos verdes, também foi pontuada no estudo de Cipolatti et al. (2020). Os autores sugerem que enzimas lipolíticas como a lipase podem ser empregadas na produção de compostos que são amplamente aplicados na indústria de alimentos, tais como: ésteres etílicos de EPA e DHA), assim como, na indústria farmacêutica na obtenção de ácido mandélico. O ácido mandélico é usado como intermediário na formulação de produtos farmacêuticos, sua obtenção é de forma sintética.

As enzimas lipolíticas também têm mostrado seu potencial devido sua capacidade de catalisar reações de biotransformação de vários compostos contendo ligações ésteres, os quais, podem ser convertidos em produtos de alta energia, como é o caso dos biocombustíveis, levando uma alternativa promissora para obtenção de energia de forma sustentável (KUMAR et al., 2020). Nessa mesma linha de pesquisa, essas enzimas são apontadas na literatura como importante componente para a degomagem de óleos de cozinha destinados à produção de produtos químicos verdes. Embora essa aplicação tenha sido considerada por muito tempo,

inviável do ponto de vista industrial, com os avanços tecnológicos, novos interesses surgiram nos últimos anos objetivando aperfeiçoar o método, o que é interessante, tendo em vista que, o uso das enzimas lipolíticas permite um processo de degomagem em condições mais amenas (CÁRDENAS et al., 2021; VAISALI et al., 2014).

Outros estudos também trazem o apelo para um ambiente mais sustentável e a necessidade da busca por produtos químicos verdes, onde usam como objeto de estudo a rota enzimática, sendo esta, uma estratégia promissora (CEA et al., 2019; LEE et al., 2019; QUAYSON et al., 2020; REGNER et al., 2019). Sem dúvidas o uso de enzimas lipolíticas voltados para a biorrefinaria é o seu maior âmbito de aplicação, não somente pelo meio ambiente, mas também pelo alto preço do combustível.

Em outra vertente, os achados mostram o potencial das enzimas lipolíticas para síntese de poliéster. Essa alternativa baseia-se no fato dos polímeros sintetizados por catálise enzimática serem biodegradáveis. Devido algumas limitações desse processo como alto custo, sugere-se o seu emprego para produtos com alto valor agregado e que não necessitem de processamento em altas temperaturas (GOUJARD et al., 2016).

O uso de enzimas também tem sua importância na indústria de celulose e papel, nessa produção existe uma etapa chamada polpação, a qual converte a madeira em um material fibroso (SILVA, RODRIGUES E OLIVEIRA, 2017). Nesse processo os extrativos que não foram removidos tendem a aglomerar formando depósitos denominados pitch, que acumulam nos maquinários e na polpa ocasionando um efeito negativo (NIGAN, 2013).

Objetivando sua substituição por alternativas menos agressivas, as enzimas lipolíticas como lipases mostra-se interessante (RAMANTH, SITHOLE e GOVINDEN, 2017b). Ainda segundo o estudo citado, foi observado boa estabilidade das enzimas estudadas tanto em pH ácido quanto em temperatura moderada, tornando as enzimas excelentes candidatas para aplicação no controle de piches (material resinosos que se acumulam nos maquinários de fabricação de papel) e conseqüentemente possibilidade que irá beneficiar a indústria processadora de papel.

Em todos os estudos mencionados nota-se que as enzimas lipolíticas são aplicadas com o intuito de substituir rotas sintéticas por vias sustentáveis, obtendo dessa forma produtos químicos verdes, ou simplesmente produtos sustentáveis. Tudo isso em condições de

temperaturas amenas, com menor gasto de energia e menor aplicação de produtos agressivos ao ambiente nos processamentos, sejam eles, da indústria de alimentos, farmacêutica ou as biorrefinarias.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

O projeto teve como objetivo caracterizar microrganismos lipolíticos oriundos dos frutos amazônicos pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*) e tucumã-do-Brasil (*Astrocaryum vulgare Mart*), bem como analisar o potencial dessas enzimas para a aplicação na obtenção de ésteres de ácidos graxos e produção de aromas.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Isolar e selecionar os microrganismos que produzem lipases dos frutos amazônicos pupunha e tucumã-do-Brasil;
- Caracterizar os microrganismos produtores de enzimas lipolíticas isolados dos frutos através das características morfológicas, bioquímicas e molecular;
- Determinar a atividade enzimática das lipases produzidas em condições de cultivo submersos;
- Analisar o potencial de produção de ácidos graxos livres por meio das lipases produzidas;
- Analisar o potencial de produção de ésteres de aromas por meio das lipases produzidas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido como parte do Projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01).

### 4.1. Coleta dos frutos e fermentação

*Coleta dos frutos:* a pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) foi obtida em feira local no município de Conceição do Araguaia, Pará, enquanto o tucumã-do-Brasil (*Astrocaryum vulgare* Mart) foi obtido de atividades extrativistas, em feira local, no município de Manaus, Amazonas. Os frutos foram armazenados em caixas térmicas sanitizadas e transportados ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, UFT, campus Universitário de Palmas/TO. Os frutos foram armazenados em temperatura ambiente, com o objetivo de manter a microbiota presente inalterada.

*Limpeza e sanitização dos frutos:* A remoção de sujidades dos frutos foi realizada por meio da sanitização dos frutos utilizando-se solução de hipoclorito 50 ppm, por 15 minutos, sendo em seguida lavados duas vezes com água destilada.

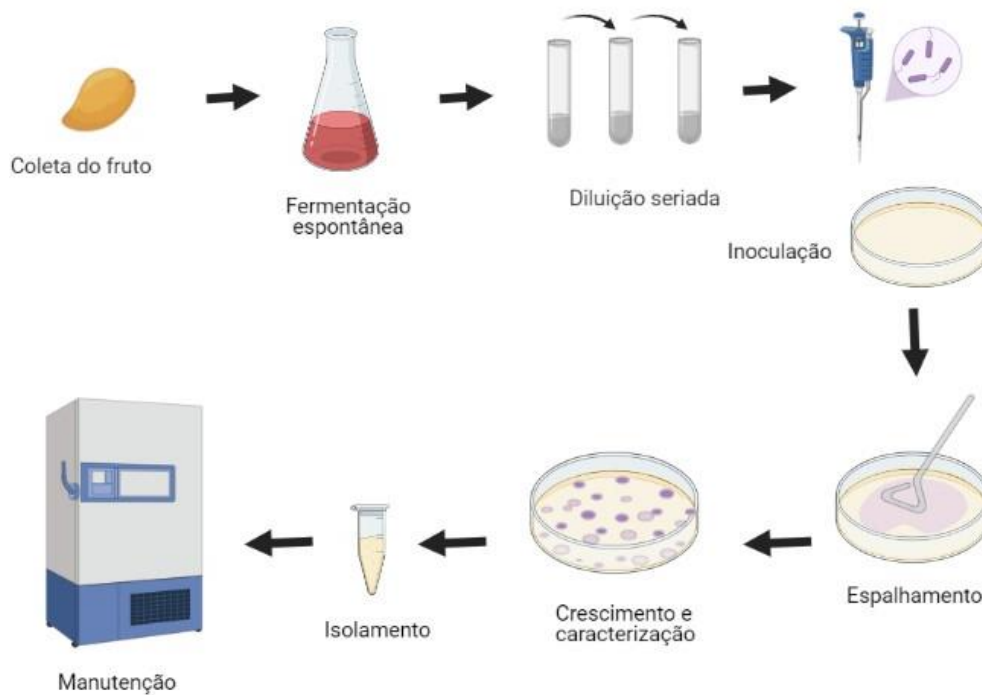
*Fermentação espontânea dos frutos:* Após a lavagem, os frutos foram colocados em sacos plásticos autoclavados (150 x 200 mm) e, em seguida, macerados e levados para fermentarem espontaneamente. A fermentação espontânea dos frutos foi conduzida durante um período de 15 dias a 30 °C em estufa bacteriológica por meio de coletas de amostras para análises microbiológicas. Para cada fruto (pupunha e tucumã), foram utilizados seis sacos plásticos (polietileno) esterilizados contendo cerca de 100 gramas dos frutos integrais (casca, polpa e sementes) macerados.

### 4.2. Isolamento e manutenção dos microrganismos

A coleta dos frutos em fermentação (10 g de amostra) foi realizada de forma asséptica com intervalo de três dias entre as coletas (tempo 0, 72, 144, 216, 288 e 360 horas) e transferida

para sacos plásticos autoclavados (150 x 200 mm) contendo 90 mL de solução salina peptonada estéril [0,85% (m/v) de cloreto de sódio e 0,1% (m/v) de peptona bacteriológica]. Posteriormente, sucessivas diluições seriadas foram realizadas e 100 µL de amostra foi inoculada e espalhada na superfície de placas de Petri (200 x 15 mm), contendo diferentes meios de cultura. Os meios de cultivo utilizados para o isolamento foram LB (caldo lisogênico) e Ágar MacConkey (para isolamento de bactérias Gram negativas). As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C em estufa bacteriológica por 2 dias. Na figura 3 está esquematizado o passo a passo do isolamento e manutenção dos isolados.

**Figura 3.** Resumo esquemático do isolamento e manutenção dos microrganismos isolados.



Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram caracterizadas de acordo com sua morfologia. A análise da morfologia incluiu tamanho, forma, cor, borda, aparência, brilho e elevação, de acordo com a metodologia convencional de Kurtzman et al. (2011). Os resultados para o isolamento foram expressos em contagem total dos morfotipos, identificando o tipo de meio cultivado e o fruto. As colônias foram agrupadas de acordo com as mesmas características morfológicas.

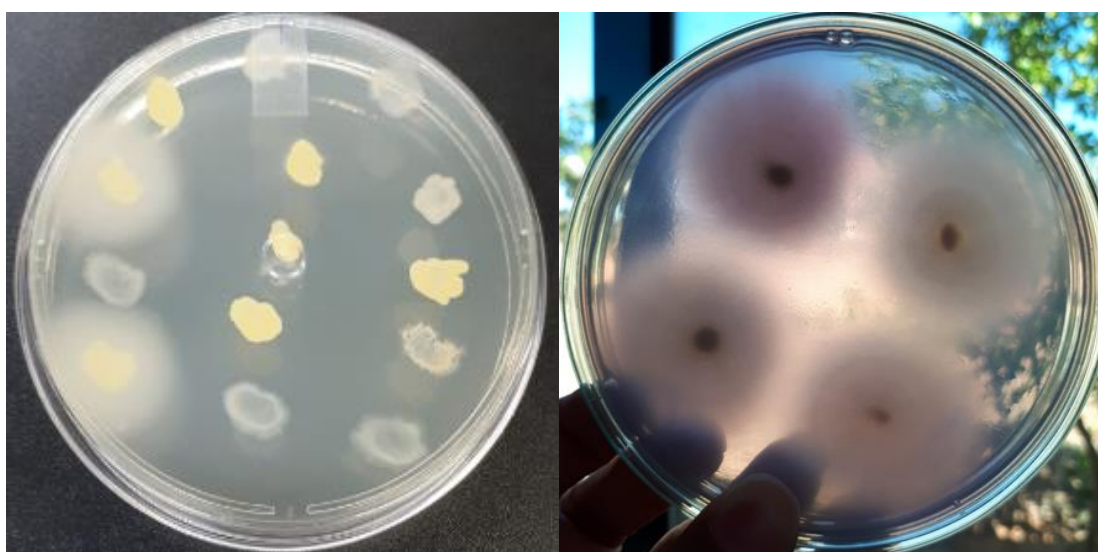
Após o isolamento, os microrganismos foram preservados em criotubos contendo glicerol 20% (v/v), sendo mantidos em ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o momento da reativação, a qual foi realizada retirando amostras dos criotubos com o auxílio de uma alça descartável estéril, inoculando-as em placas contendo LB sólido, as quais foram posteriormente incubadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 48 horas.

### 4.3. Seleção de microrganismos produtores de lipase

#### 4.3.1. Triagem de microrganismos lipolíticos em placas contendo meio seletivo e diferencial

A triagem preliminar de microrganismos lipolíticos foi realizada em placas de Petri contendo o meio proposto por Hankin e Anagnostaki (1975) composto por (g/L): peptona, 10; NaCl, 5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1, agar, 20, suplementado com 1% (p/v) de Tween 80. O pH final foi ajustado para 7,0 pela adição de HCl ou NaOH 1 M. O meio foi autoclavado a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 20 min. As culturas foram incubadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e examinadas diariamente durante 7 dias. As linhagens microbianas cujas colônias apresentaram halos (figura 4), provenientes da precipitação de cristais de cálcio complexados com ácido láurico, foram consideradas potenciais produtoras de lipase. Os diâmetros dos halos de hidrólise e das colônias microbianas foram determinados com auxílio de um paquímetro.

**Figura 4.** Área de formação de halo pela precipitação dos cristais de cálcio.



O índice enzimático (IE) foi obtido a partir dos valores resultantes da divisão do diâmetro do halo de hidrólise pelo diâmetro da colônia. As colônias mostrando uma área opaca, devido à precipitação de sais de cálcio, foram selecionadas para a triagem subsequente em meio líquido.

#### **4.3.2. Triagem de microrganismos lipolíticos em cultivos submersos.**

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 18 mL de meio mineral (MM) adaptado Rapp e Backaus (1992), contendo (g/L): sulfato de amônio, 2; fosfato de potássio monobásico, 1,5; fosfato de sódio dibásico, 3,5; sulfato de magnésio heptahidratado, 0,2; extrato de levedura, 1; suplementado de azeite de oliva a 1% (m/v). O pH foi ajustado para 7,0 pela adição de HCl ou NaOH 1 M. Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave vertical a 121 °C e 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Culturas estoques das linhagens potenciais produtoras de lipase foram transferidas para placas Petri contendo LB sólido, por até 48 h. Colônias isoladas posteriormente foram transferidas para 20 mL de LB durante 24 h, a uma agitação de 150 rpm e 30 °C, para que fosse atingida uma densidade óptica mínima de 0,60, em um comprimento de onda de  $\lambda = 610$  nm, o qual corresponde a um mínimo de  $10^7$  UFC/mL. Alíquotas de 2 mL deste pré-inóculo foram utilizadas para inocular 18 mL de MM. Os cultivos submersos foram realizados em incubadora refrigerada com agitação orbital, sendo mantidos a 150 rpm, 28 °C por 48 horas. Após o tempo de cultivo das linhagens isoladas, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 30 minutos a 10 °C, para obtenção do sobrenadante, o qual foi utilizado para análise da atividade enzimática.

#### **4.4. Determinação da atividade de lipase**

A atividade de lipase foi determinada a partir do substrato palmitato de p-nitrofenila (pNPP) (ALMEIDA et al., 2012). Para o preparo de 20 mL de meio reacional, 3,8 mg de pNPP foi solubilizado em 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e então diluído a 19,5 mL em tampão McIlvaine a 0,5 mM pH 7,0; contendo 0,5% (v/v) de Triton X-100. A hidrólise do pNPP foi determinada a 40 °C pela liberação do p-nitrofenol. Após pré-incubação de 0,9 mL do meio reacional por 5 min., a reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL de amostra dos sobrenadantes de cultivo. A reação foi interrompida após 1 minuto com choque térmico a 90 °C, seguido da

adição de 1mL de uma solução saturada de tetraborato de sódio. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 410nm (figura 5). A atividade enzimática foi calculada utilizando a seguinte equação.

$$\text{Atividade enzimática} \left( \frac{U}{ml} \right) = \frac{\text{Abs final} - \text{Abs inicial}}{\epsilon} \times \frac{1}{V_i} \times 10^3 \times V_f \times \frac{1}{t \text{ (min)}} \times \text{diluição}$$

Eq (1)

Onde:

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

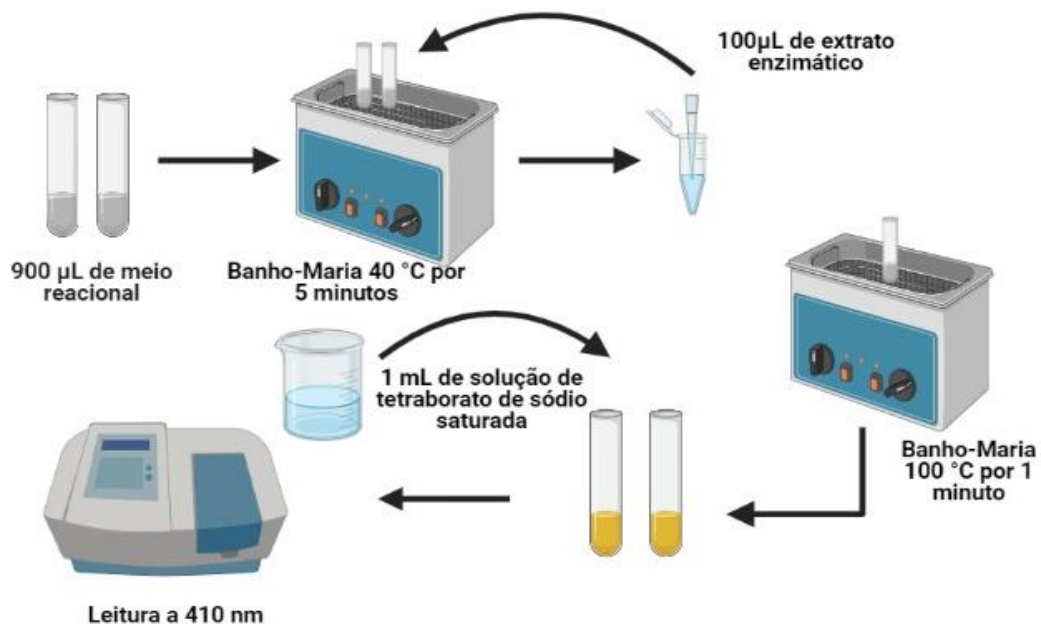
Abs = absorbância

$V_i$  = volume inicial (volume de enzima adicionado para iniciar a reação)

$V_f$  = volume final da reação (de acordo com o cálculo da concentração de pNP na curva de calibração)

$t$  (min) = tempo da reação em minutos

**Figura 5.** Resumo esquemático determinação da atividade enzimática de lipase.



Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de pNP por minuto, por mililitro. O coeficiente de absorvidade molar obtido foi



$1,2596 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , o mesmo foi adquirido conforme a curva de calibração de p-Nitrofenol em anexo (anexo 1).

## **4.5. Caracterização dos microrganismos produtores de lipase**

### **4.5.1. Caracterização morfológica e bioquímica**

As linhagens isoladas com a capacidade de produção de lipase foram caracterizadas pela técnica de coloração de Gram, morfologia celular e testes de catalase e oxidase.

### **4.5.2. Coloração de Gram**

Para a aplicação do protocolo, foram fixados esfregaços de células em uma lâmina onde adicionou-se uma solução de cristal violeta a qual permaneceu em contato com a lâmina por 60 segundos, seguido da adição do reagente lugol por também 60 segundos. Depois, lavou-se a lâmina com água destilada e em seguida com uma solução álcool-acetona. Após lavar-se com água corrente, adicionou-se uma solução de safranina por 30 segundos. Por fim, retirou-se o excesso de corante com água, secou-se a lâmina com papel filtro e a mesma foi analisada ao microscópio óptico em óleo de imersão. Microrganismos com coloração azulada foram considerados gram-positivos, enquanto aqueles com coloração avermelhada gram-negativos (PELCZAR, 1996).

### **4.5.3. Morfologia celular**

As bactérias foram analisadas segundo a morfologia celular, quanto à forma e arranjo de colônias, seguindo o Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994).

### **4.5.4. Teste de Catalase**

O teste de catalase foi realizado com a adição de uma gota de peróxido de hidrogênio sobre colônias isoladas após 24 h de incubação. As linhagens bacterianas que liberaram bolhas foram consideradas catalase positivas e as outras, cuja liberação não foi evidenciada, catalase negativa (FADIN, 1976).

#### 4.5.5. Teste de Oxidase

O teste de oxidase, o qual verifica a presença da enzima citocromo oxidase, foi realizado através da transferência de células em uma alça estéril para uma tira de papel imersa no reagente tetrametil-p-fenilenodiamina. As linhagens oxidase positiva apresentaram cor púrpura-azulada, enquanto linhagens oxidase negativa não se coraram ou apresentaram cor amarelada (FADIN, 1976).

#### 4.6. Caracterização molecular

As linhagens bacterianas produtoras de lipase foram identificadas por técnicas moleculares envolvendo a amplificação do gene 16S rRNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior análise de suas sequências (SAMBROOK et al., 1989).

A extração de DNA foi realizada usando o kit de extração de DNA illustra™ PHYTOPURE™ de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR foi realizada utilizando o kit PCR Master Mix (Ludwig Biotec, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador automático (Bio-rad T100 Thermal Cycler, Estados Unidos). Os primers usados para identificar isolados bacterianos por sequenciamento do gene 16S rRNA foram 27f (5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') e 1512r (5' - ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT - 3') (WANG et al., 2006).

A desnaturação inicial do DNA foi realizada a 95 ° C por 10 min, seguida por 25 ciclos de desnaturação a 93 ° C por 1 min, anelamento a 50 ° C por 1 min, alongamento a 72 ° C por 1 min 30 s e, então, uma etapa de alongamento final a 72 ° C por 5 min.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Ludwig Biotec, Brasil) a 80 V, por 1 h.

O marcador molecular HighRanger 1 kb DNA Ladder (NORGEN Biotek Corporation, Canadá) foi utilizado como padrão para reconhecimento do peso molecular das bandas obtidas. Os fragmentos amplificados foram visualizados pelo corante Safer Dye 6x Loading Buffer (KASVI, Brasil) e transiluminação UV (L.PIX Loccus Biotecnologia, Brasil). Os produtos

amplificados foram purificados usando o kit PCR Products Purification Kit (MEBEP Bioscience, China). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados por ACTGene (Brasil), usando um sequenciador Applied Biosystems® Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzers (ThermoFischer Scientific, Estados Unidos). As sequencias parciais obtidas do gene 16S rRNA foram analisadas através do software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5.3.

#### **4.6.1. Análise das sequências obtidas**

As sequências obtidas para cada linhagem foram comparadas com o banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information, EUA), utilizando a ferramenta BLASTn para a identificação das linhagens bacterianas. A identificação das linhagens isoladas por gênero ou espécie foi baseada no percentual de similaridade e alinhamento das sequencias parciais obtidas comparadas àquelas disponíveis no banco de dados do NCBI (SCOLA et al., 2003; SNELL-CASTRO et al., 2005).

#### **4.7. Aplicação das enzimas em reação de esterificação enzimática**

Esta etapa foi realizada com o preparo de uma mistura reacional formada por álcool e ácido em volume de 1:1 adaptado de Piva, (2020), dissolvidas em DMSO. 2,5 mL de meio reacional foi adicionado em Erlenmeyers de 50 mL, e o tempo de reação contado a partir da adição da enzima.

A atividade de esterificação da enzima foi quantificada através da reação do ácido mirístico a 0,06 mol/L e álcool isobutílico (razão molar 1:1). Os experimentos foram realizados em shaker a 40 °C, 180 rpm por 24 horas. Esta foi iniciada pela adição de 1 U/mL (m/v) de enzima ao meio reacional, mantida em frasco de vidro selado. A quantidade de enzima utilizada de acordo com o volume reacional está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Quantidade de enzimas utilizadas para reação de esterificação.

<b>Bactérias</b>	<b>Quantidade de enzima utilizada na reação (g)</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PP 107	0,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 24	0,11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 47	0,38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 61	0,06
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TCMK 62	0,71
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 64	0,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 66	0,16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 71	0,04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 72	0,07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 77	0,12
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TCMK 78	1,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 85	0,18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 86	0,12
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> TCMK 100	1,01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 119	0,18
<i>Pseudomonas boreopolis</i> TCLB 48	0,11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCLB 73	0,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCLB 74	0,34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCLB 75	0,14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCLB 76	0,15

#### 4.7.1. Teor de ácido carboxílico

O teor de ácido carboxílico foi determinado através da titulação de 1 mL de alíquota, previamente pesada, no início e ao final da reação e diluída em 10 mL de etanol. A titulação foi feita com KOH 0,02 M até pH 11,0. A determinação do percentual de ácido carboxílico foi realizada a partir da Equação 2:

$$C = \frac{V \cdot M \cdot MM}{10 \cdot W}$$

Eq (2)

Onde:

C = é o percentual de ácido carboxílico,

V = é o volume (mL) de KOH gasto na titulação,

M = é a molaridade do KOH,

MM = é a massa molar do ácido carboxílico e

W = é a massa (g) correspondente a 1 mL de amostra retirada para titulação.

#### 4.7.2. Atividade de esterificação

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade de esterificação foi calculada utilizando a seguinte equação.

$$AE = \frac{(Vb - Va) \times M \times 1000 \times Vf}{t \times ME \times Vc}$$

Eq (3)

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

Va = volume de KOH gasto na titulação da amostra retirada após 24 horas (mL);

Vb = volume de KOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL);

M = molaridade da solução de KOH;

Vf = volume final de meio reacional (mL);

t = tempo (min);

ME = massa de enzima (g);

Vc = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

#### 4.7.3. Percentual de esterificação

O percentual de esterificação corresponde ao percentual do ácido consumido, conforme Equação 4:

$$\% \text{ de esterificação} = \frac{Co - C}{Co} \times 100$$

Eq (4)

Onde:

Co = é a concentração inicial do ácido carboxílico residual livre, no tempo 0 h;

C = é a concentração do ácido carboxílico residual livre após o tempo de reação.

#### **4.8. Especificidade por substrato**

Especificidade da enzima foi avaliada a partir da dosagem da atividade utilizando-se os substratos sintéticos, p-nitrofenil butirato, p-nitrofenil octanoato, p-nitrofenil decanoato, p-nitrofenil dodecanoato, p-nitrofenil miristato, p-nitrofenil palmitato e p-nitrofenil estearato, os quais foram avaliados nas condições já citadas anteriormente (tópico 4.4), concentração final de 0,05 M em tampão McIlvaine pH 7,0 a 40 °C.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Isolamento e triagem de microrganismos lipolíticos em meio sólido.**

A partir da fermentação espontânea dos frutos, foram obtidos 481 isolados, sendo 184 (38,25%) provenientes de pupunha e 297 (61,25%) do tucumã. Na triagem em placas contendo meio sólido seletivo e diferencial foram observados 41 possíveis produtores de lipase. Costa et al. (2019) com o objetivo de isolar microrganismos da pupunha e verificar o potencial antimicrobiano dos mesmos, chegaram a 75 isolados, sendo 60 linhagens de fungos e 15 linhagens de bactérias.

Os microrganismos podem ser encontrados de 2 formas nos frutos: epifíticos e endofíticos. Os epifíticos estão presentes na superfície do vegetal (THAPA et al., 2017). Os microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior dos tecidos do hospedeiro vegetal (PINTO, 2019). Em uma única planta há variações das populações microbianas, mesmo com pequena diferença de localização e tempo (BONATELLI, 2012).

De forma geral, as bactérias e os fungos representam os microrganismos endofíticos mais comuns em vegetais, no entanto, os fungos são isolados com maior frequência (AMORIM, 2018). A maior incidência e prospecção de fungos, se deve a grande produção de metabólitos

secundários que são matéria-prima potencial para a bioprospecção de novos compostos para aplicação nas indústrias, sendo a síntese de enzimas um deles (SOUZA e SANTOS, 2017).

Os microrganismos que apresentaram halo devido à precipitação de sais de cálcio, foram considerados positivos e posteriormente selecionados para cultivo em meio líquido. Os isolados e seus índices enzimáticos são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Triagem de linhagens microbianas com potencial para a produção de enzimas lipolíticas.

<b>Isolado</b>	<b>*Índice Enzimático</b>	<b>Isolado</b>	<b>*Índice Enzimático</b>	<b>Isolado</b>	<b>*Índice Enzimático</b>	<b>Isolado</b>	<b>*Índice Enzimático</b>
PP 14	6,3	TCMK 71	5,5	TCLB 42	6,1	TCLB 93	6,9
PP 99	4,9	TCMK 72	6,0	TCLB 48	4,7	TCLB 94	4,9
PP 107	3,5	TCMK 77	5,0	TCLB 60	8,4	TCLB 95	6,7
TCMK 24	6,8	TCMK 78	7,8	TCLB 73	7,3	TCLB 96	5,7
TCMK 47	5,1	TCMK 82	7,0	TCLB 74	8,0	TCLB 114	5,8
TCMK 55	5,0	TCMK 85	9,2	TCLB 75	7,5	TCLB 121	5,5
TCMK 61	7,0	TCMK 86	7,6	TCLB 76	5,4	TCLB 143	4,1
TCMK 62	4,8	TCMK 100	6,3	TCLB 81	5,8	TCLB 152	5,7
TCMK 63	5,5	TCMK 119	8,2	TCLB 82	4,1		
TCMK 64	3,6	TCLB 29	4,6	TCLB 83	5,0		
TCMK 66	4,5	TCLB 40	6,3	TCLB 88	7,2		

O índice enzimático é a relação entre o diâmetro do halo, incluindo a colônia e o diâmetro da colônia. O mesmo foi obtido pela mensuração diária durante 7 dias. O código PP se refere ao fruto da pupunha e TC ao tucumã, MK ao ágar MacConkey e LB ao Caldo Lisogênico, justificando portanto, os códigos utilizados para os isolados.



A triagem em meio sólido com substratos específicos agiliza o processo de produção das enzimas pela sua sensibilidade, rapidez e simplicidade (SILVA, 2014). Entretanto, substratos como Tween 80 podem ser hidrolisados por esterases, confundindo dessa forma a triagem positiva para lipase, sendo necessário, triagens subsequentes para confirmar o resultado (SPERB et al. 2015; GUPTA et al. 2003). Entre os isolados analisados, 8,52% apresentaram atividade lipolítica na triagem em placas. O número de possíveis produtores foi superior no tucumã (38) em relação a pupunha (3), o que pode ser explicado pelo teor de lipídeos encontrados nos dois frutos, sendo o tucumã composto em média de 40,49% (FERREIRA et al., 2009) de lipídeos e a pupunha contendo 8,22% (MELO et al., 2017). Oliveira (2012) isolaram 94 bactérias do fruto da Macaúba (*Acrocomia aculeata*), que também é uma palmeira da família *Arecaceae*, e encontrou 9 (9,57%) isolados com atividade para lipase através da triagem em placa. Os índices enzimáticos variaram entre 1,23 a 2,1.

Vale et al. (2015) objetivaram isolar e avaliar o potencial de leveduras da castanha do Babaçu (*Attalea speciosa Mart*), que é uma palmeira da mesma família dos frutos realizados neste trabalho, para produção de enzimas, dentre elas, a lipase. Dos 84 isolados, 62 (73,8%) apresentaram formação de halos na triagem em placas. No entanto, todos os valores de índice enzimático foram inferiores a 2,0. Segundo Lealem e Gashe (1994), para um microrganismo ser considerado bom produtor de enzimas em meio sólido, seu índice enzimático deve ser superior a 2,0.

Percebe-se que o percentual de isolados produtores de lipase em trabalhos sobre prospecção varia em função do fruto e do gênero a qual os microrganismos pertencem. Nesse estudo, o percentual de isolados produtores de lipase foi inferior aos acima citados. No entanto, o potencial de produção enzimática foi superior, pois os índices enzimáticos são bem maiores ao encontrados nos outros trabalhos.

## **5.2. Triagem de microrganismos lipolíticos em cultivos submersos**

Os 41 isolados pré-selecionados na triagem em placa foram testados quanto à capacidade de produzir lipase em cultivos com meio líquido. Quatro microrganismos se

destacaram com os maiores valores de atividade ( $> 3$  U/mL), sendo 1 da pupunha (PP 107, 3,09 U/mL) e 3 do tucumã (TCMK 64, 3,72 U/mL; TCMK 71, 4,33 U/mL e TCMK 77, 3,02 U/mL). Valores de atividade intermediários (2,99 – 0,80 U/mL) foram observados em 15 isolados, sendo todos eles provenientes do fruto tucumã (TCMK 24, TCMK 47, TCMK 61, TCMK 62, TCMK 66, TCMK 72, TCMK 78, TCMK 85, TCMK 86, TCMK 119, TCLB 48, TCLB 73, TCLB 74, TCLB 75 e TCLB 76). Por fim, 22 isolados apresentaram baixa atividade lipolítica ( $< 0,80$ ). Os valores das atividades enzimáticas estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Triagem de linhagens microbianas produtoras de lipase isoladas de frutos amazônicos.

<b>Isolado</b>	<b>Atividade Enzimática (U/ml)</b>	<b>Isolado</b>	<b>Atividade Enzimática (U/ml)</b>	<b>Isolado</b>	<b>Atividade Enzimática (U/ml)</b>
PP 14	0,20 ± 0,01	TCMK 78	0,92 ± 0,04	TCLB 76	1,01 ± 0,14
PP 99	0,33 ± 0,02	TCMK 82	0,39 ± 0,00	TCLB 81	0,45 ± 0,23
PP 107	3,09 ± 0,05	TCMK 85	0,88 ± 0,04	TCLB 82	0,12 ± 0,01
TCMK 24	1,19 ± 0,05	TCMK 86	1,62 ± 0,04	TCLB 83	0,26 ± 0,02
TCMK 47	1,61 ± 0,06	TCMK 100	0,78 ± 0,13	TCLB 88	0,23 ± 0,02
TCMK 55	0,21 ± 0,01	TCMK 119	2,64 ± 0,21	TCLB 93	0,29 ± 0,03
TCMK 61	2,99 ± 0,01	TCLB 29	0,34 ± 0,07	TCLB 94	0,13 ± 0,07
TCMK 62	1,21 ± 0,08	TCLB 40	0,23 ± 0,01	TCLB 95	0,22 ± 0,02
TCMK 63	0,39 ± 0,02	TCLB 42	0,24 ± 0,05	TCLB 96	0,27 ± 0,05
TCMK 64	3,72 ± 0,09	TCLB 48	1,21 ± 0,02	TCLB 114	0,31 ± 0,03

TCMK 66	1,72 ± 0,09	TCLB 60	0,20 ± 0,00	TCLB 121	0,14 ± 0,03
TCMK 71	4,33 ± 0,08	TCLB 73	2,31 ± 0,04	TCLB 143	0,17 ± 0,02
TCMK 72	2,12 ± 0,09	TCLB 74	1,61 ± 0,04	TCLB 152	0,25 ± 0,02
TCMK 77	3,02 ± 0,04	TCLB 75	1,52 ± 0,12		

---

Os cultivos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 18 mL de meio de cultivo composto (g/L): sulfato de amônio, 2, fosfato de potássio, 1,5, fosfato de sódio, 3,5, sulfato de magnésio, 0,2, extrato de levedura, 1, suplementado de azeite de oliva a 1%. Os cultivos foram inoculados com 2 mL da suspensão de células e mantidos a 150 rpm, 30 °C por 48 horas. A atividade da lipase foi determinada com palmitato de p-nitrofenila (pNPP) como substrato. A leitura da absorbância foi realizada a 410nm. Valores da atividade enzimática foram apresentado em média e ± desvio padrão: duplicata/amostra.

Os resultados observados a partir da triagem em placa e do cultivo submerso mostraram que não houve correlação entre a formação de halo (índice enzimático) e atividade enzimática obtidos, ou seja, neste estudo um alto de índice enzimático não significou que a linhagem isolada apresenta uma alta atividade lipolítica a partir de cultivos submersos. Um exemplo claro disso está nos isolados da pupunha, onde PP 107 apresentou menor índice enzimático (3,5) e maior atividade (3,09 U/mL). Já o oposto ocorreu com o PP 14, o qual apresentou o maior índice (6,33) e a menor atividade (0,20 U/mL) dos isolados da pupunha. Segundo Colen (2006), a produção de halo não significa alto volume de produção enzimática, pois a zona de hidrólise diz respeito a concentração de proteínas difundida no ágar e não da atividade enzimática propriamente.

Castiglioni et al. (2018) avaliaram a produção de lipase por *Burkholderia cepacia*, utilizando diferentes meios de cultivo, variando as concentrações de seus componentes, e chegaram a alcançar 2,9 U/mL de atividade enzimática. Liew et al. (2015) sabendo da necessidade de se conhecer os fatores de crescimento de cada microrganismo, otimizou as condições de cultivo da fermentação submersa para produção de lipase de *Burkholderia cepacia*, variando parâmetros como pH, velocidade de agitação e tempo de incubação. Após as análises, nas condições operacionais ótima investigada (pH 9, agitação de 300 rpm e tempo de incubação de 72 horas), a produção de lipase chegou a 11,18 U/mL.

No nosso estudo, a maior atividade foi atingida pelo microrganismo TCMK 71 com 4,33 U/mL, sem que ocorresse a otimização do meio, sendo, portanto, um microrganismo com potencial de produção de lipase.

Vários estudos foram realizados visando o isolamento de microrganismos produtores de lipase, devido à importância desta enzima em processos biotecnológicos. As lipases estão amplamente distribuídas na natureza, no entanto, as lipases microbianas são preferidas em comparação as derivadas de plantas e animais, pois possuem uma disponibilidade maior na natureza, tem produção de baixo custo e alto rendimento, há simplicidade em sua manipulação genética, variedade catalítica, bem como maior estabilidade e especificidade (FURINI, 2017; GEOFFRY & ACHUR, 2018; CHANDRA et al. 2020; SOLEYMANI et al. 2017).

Dentre os microrganismos produtores de lipase, as bactérias se destacam por possuírem características promissoras, como rápido crescimento em relação aos fungos filamentosos e leveduras, o que desta forma, aumenta sua produtividade. Os gêneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter* sp., *Staphylococcus* sp. e *Chromobacterium* sp têm sido explorados para a produção de lipases entre as bactérias (CASTIGLIONI et al., 2018; MOBARAK-QAMSARI et al., 2011; CHANDRA et al., 2020).

### **5.3. Caracterização morfológicas e bioquímicas das linhagens isoladas produtoras de lipase**

Os isolados que apresentaram capacidade de produção de lipase pelo cultivo submerso, foram caracterizadas quanto a morfologia celular e testes bioquímicos de catalase, oxidase e coloração de Gram. Foram retirados da amostra os microrganismos que obtiveram atividade enzimática inferior a 0,70 U/mL, restando, portanto, 20 isolados.

Na Tabela 4 estão apresentadas as características macroscópicas. Todos os isolados apresentaram forma, elevação, tamanho, superfície, aparência e opacidade iguais, diferenciando-se apenas quanto a margem, que variou entre ondulada (20% dos isolados) e inteira (80% dos isolados), e pigmento que resultou em 90% verde-castanho e 10% amarelo-esverdeado.

**Tabela 4.** Caracterização macroscópicas dos microrganismos produtores de lipase.

<b>Isolado</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevação</b>	<b>Margem</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Superfície</b>	<b>Aparência</b>	<b>Opacidade</b>	<b>Pigmento</b>
<b>PP 107</b>	Circular	Convexa	Ondulada	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 24</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 47</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 61</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 62</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 64</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 66</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 71</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 72</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 77</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 78</b>	Circular	Convexa	Ondulada	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 85</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 86</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCMK 100</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Amarela- Esverdeada
<b>TCMK 119</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCLB 48</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Amarela- Esverdeada
<b>TCLB 73</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCLB 74</b>	Circular	Convexa	Inteira	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho
<b>TCLB 75</b>	Circular	Convexa	Ondulada	Média	Lisa	Brilhante	Translúcida	Verde-Castanho

**TCLB 76**    Circular    Convexa    Ondulada    Média    Lisa    Brilhante    Translúcida    Verde-Castanho

---

Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo o meio LB e mantidos sob incubação a 30° C por 48 horas.



Na Tabela 5 estão apresentados o grupo, morfologia celular e testes bioquímicos (Gram, catalase e oxidase).

**Tabela 5.** Morfologia Celular e Testes Bioquímicos.

<b>Isolado</b>	<b>Grupo</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Gram</b>	<b>Catalase</b>	<b>Oxidase</b>
PP 107	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 24	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 47	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 61	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 62	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 64	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 66	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 71	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 72	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 77	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 78	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 85	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 86	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 100	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCMK 119	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCLB 48	Bactéria	Bacilo	-	-	+
TCLB 73	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCLB 74	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCLB 75	Bactéria	Bacilo	-	+	+
TCLB 76	Bactéria	Bacilo	-	+	+

A caracterização morfológica e bioquímica geralmente é utilizada para identificação preliminar de microrganismos isolados, e embora seja trabalhosa, é importante para separar os microrganismos de interesse e agrupar os semelhantes,

permitindo assim diminuir a quantidade de isolados que serão utilizados, e ainda, pode ser essencial em casos que não são possíveis identificar e distinguir uma espécie (ANDRADE, 2008).

#### 5.4 ANÁLISE MOLECULAR

O DNA de todos os isolados foi extraído com sucesso com razões A260/A280 e A260/A230 de 1,8 a 2,0 e 2,0 a 2,2 respectivamente. A concentração de DNA puro variou de 254,7 ng/ul a 2378,8 ng/ul. Os dados estão apresentados na tabela 6.

**Tabela 6.** Análise de Extração de DNA.

Isolado	Concentração de DNA (ng/uL)	Microrganismo	Concentração do produto de PCR (ng/uL)
PP 107	615,1	Bactéria	10,7
TCMK 24	288,2	Bactéria	10,1
TCMK 47	323,8	Bactéria	14,7
TCMK 61	441,2	Bactéria	8,3
TCMK 62	639,8	Bactéria	14,3
TCMK 64	516,2	Bactéria	13,5
TCMK 66	495,5	Bactéria	11,8
TCMK 71	556,8	Bactéria	11,0
TCMK 72	343,8	Bactéria	9,6
TCMK 77	1218,9	Bactéria	11,1
TCMK 78	2378,8	Bactéria	11,7
TCMK 85	1200,8	Bactéria	11,8
TCMK 86	380,1	Bactéria	10,5
TCMK 100	722,3	Bactéria	13,1
TCMK 119	587,6	Bactéria	14,6
TCLB 48	802,6	Bactéria	21,7
TCLB 73	1223,5	Bactéria	10,0
TCLB 74	646,2	Bactéria	14,7
TCLB 75	254,7	Bactéria	10,9
TCLB 76	1496,7	Bactéria	9,3

Após a análise das sequências parciais obtidas, as mesmas foram comparadas com o banco de dados do NCBI através da ferramenta BLASTn. A identificação das linhagens

isoladas por gênero ou espécie foi baseada no percentual de similaridade e alinhamento das sequências parciais obtidas comparadas àquelas disponíveis no banco de dados do NCBI. As linhagens bacterianas isoladas de pupunha e tucumã foram identificadas e passaram a serem referidas como as respectivas espécies com maior similaridade para sequências parciais do gene 16S rRNA, assim como apresentado na Tabela 7. As espécies mencionadas como resultado da análise comparativa com o banco de dados do NCBI apresentaram um nível de similaridade com as sequências parciais das linhagens isoladas superior a 98,5%, sendo a maioria com percentual de similaridade de sequências variando de 99 a 100%.

**Tabela 7.** Identificação de bactérias amplificadas pelo gene rRNA 16S.

<b>Isolado</b>	<b>Identificação</b>	<b>% Similaridade</b>
PP 107	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 61	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 62	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,48
TCMK 64	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 66	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 72	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 77	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 78	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99,77
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,32
TCMK 85	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 86	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCMK 100	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99,77

	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,31
	<i>Stenotrophomonas geniculata</i>	99,08
TCMK 119	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCLB 48	<i>Pseudomonas boreopolis</i>	98,63
TCLB 73	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCLB 74	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCLB 75	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
TCLB 76	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100

Dos 20 isolados, 16 (80%) são pertencentes a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, antes referidos como: PP 107; TCMK 24; TCMK 47; TCMK 61; TCMK 64; TCMK 66; TCMK 71; TCMK 72; TCMK 77; TCMK 85; TCMK 86; TCMK119; TCLB 73; TCLB 74; TCLB 75 e TCLB 76. 3 isolados apresentaram porcentagem de similaridade acima de 99% para mais de 1 espécie. O isolado TCMK 62 mostrou similaridade com *Stenotrophomonas pavanii* e *Stenotrophomonas maltophilia*, o TCMK 78 com alta similaridade para *Stenotrophomonas pavanii* e *Stenotrophomonas maltophilia*, e o TCMK 100 com *Stenotrophomonas pavanii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Stenotrophomonas geniculata*. O isolado TCLB 48 apresentou similaridade de 98,63% para *Pseudomonas boreopolis*, sendo o único a não atingir um percentual de similaridade acima de 99% para nenhuma espécie.

Pelas as propriedades únicas como atividade em ampla faixa de pH e temperatura e alta enantioseletividade, os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* tem se destacado na escolha da maioria dos estudos multidirecionais como isolamento de novas cepas, otimização da produção de enzimas e emprego de engenharia de proteínas pela tecnologia do DNA recombinante (GUPTA et al., 2007; KATARIA et al., 2021). Dentre os métodos aplicados para produção de lipases microbianas a nível industrial, a engenharia de proteínas é descrita como promissora, pois é capaz de obter enzimas com melhores propriedades cinéticas e desempenho catalítico, aumenta a especificidade a substratos e altera o pH e temperatura ótima (SALGADO et al., 2021).

Devido ao potencial em aplicações industriais e biotecnológicas, as lipases bacterianas extracelulares têm se tornado cada vez mais relevante. Grande parte dos microrganismos produtores de lipase são bactérias Gram negativas e o gênero mais importante é *Pseudomonas*, que possui várias espécies produtoras, sendo a *P. aeruginosa* a de maior destaque (PATEL et al., 2016; SIRISHA et al., 2010; ULLAH et al., 2016; PRAMANIK et al., 2018; FEITOSA, 2009; FURINI, 2017).

Há vários trabalhos relatando diferentes espécies de *Pseudomonas* dos mais diversos ambientes produzindo lipase, sendo esse gênero especialmente interessante para aplicações biotecnológicas. Mobarak-Qamsari et al. (2011) isolaram e testaram bactérias de uma planta de processamento de óleo quanto a produção de lipase, a cepa com maior atividade lipásica foi caracterizada bioquimicamente e identificada pelo sequenciamento do gene 16 rRNA, foi realizado também melhoramento do meio de produção. Após a caracterização e identificação, o isolado revelou-se como *Pseudomonas aeruginosa* (com 98,94% de similaridade com a sequência 16 rRNA), e conseguiram aumentar a produção de lipase em 3 vezes após melhorar as condições do meio de produção. A lipase de *P. aeruginosa* exibiu atividade e estabilidade máxima entre pH 7 e 10, com azeite e peptona como substratos mais adequados. Dessa forma, provou ser uma lipase alcalina com potencial para aplicação nas indústrias de couro, detergente e química fina.

Sachan et al., (2018) isolaram bactérias de amostras de solo de canavial. Foram isoladas 15 cepas lipolíticas, sendo 9 Gram positivas e 6 Gram negativas, a cepa de melhor atividade foi caracterizada e identificada através de testes bioquímicos, foi submetida também a parâmetros químicos e aspectos físicos. A partir da caracterização, a cepa foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa*, com capacidade para produção de lipase a uma temperatura de 50 °C e pH de 8. O trabalho ressalta a importância de se aplicar tecnologias voltadas a expressão de genes, para dessa forma aumentar a produção de enzimas e suprir as necessidades das indústrias.

O gênero *Stenotrophomonas* é composto por 12 espécie de bactérias bacilares, Gram-negativas distintas, caracterizadas como isolados ambientais e clínicos. Entre as espécies do gênero estão a *S. maltophilia* e *S. pavonii*, sendo esta última, pouco reportada na literatura. A *S. maltophilia* é a espécie mais estudada do gênero devido a sua relação como patógeno humano emergente, mas também pela importância ambiental benéfica e

valiosa industrialmente (GHOSH et al., 2020; KIM et al., 2017; SHERPA et al., 2021; SILVA, 2019).

Com o advento do sequenciamento do genoma completo, o campo da pesquisa muda radicalmente, podendo fornecer informações valiosas relacionadas à identificação das funções gênicas (SHERPA et al., 2021). Existem microrganismos cultiváveis que são potenciais produtores de novas lipases, porém, ainda não foram explorados. Pesquisas relatam a capacidade de secreção de diferentes enzimas por *Stenotrophomonas*, indicando seu potencial para exploração (RYAN et al., 2009; LI et al., 2016).

Visto que dentro do gênero *Stenotrophomonas* apenas a espécie *S. maltophilia* é capaz de provocar malefícios em humanos, com o intuito de conhecer as barreiras existentes entre os benefícios gerados as plantas e os malefícios causados aos humanos Alavi et al. (2014), através da genômica, transcriptômica e ensaios fisiológicos, usaram cepas de *S. rhizophila* para humanos e compararam com *S. maltophilia* associada à planta. Através das análises, foi possível constatar que há uma grande diferença entre as duas espécies, sendo a sobrevivência relacionada a mecanismos específicos, associados a genes específicos. Desta forma, a *S. rhizophila* pode ser explorada para o uso na biotecnologia.

A descoberta de uma nova lipase de *S. maltophilia* e suas características fizeram com que Li et al. (2016) associasse sua existência a uma nova família de lipases bacterianas, dessa forma, a lipase foi clonada e caracterizada. Com o objetivo de validar as propriedades enzimáticas, foi realizada a caracterização bioquímica da proteína recombinante purificada. Os resultados da caracterização indicam que é uma lipase alcalina ativa a frio, estável em altas concentrações de solventes hidrofóbicos e com preferência para ésteres de cadeia média e longa (C8:0 – C14:0). A preferência por esses substratos, indicam se tratar de uma lipase verdadeira. De acordo com os resultados encontrados, o estudo sugere se tratar de uma lipase pertencente a uma nova família de lipases bacterianas, denominada família XVI.

### 5.5. Aplicação das enzimas em reação de esterificação enzimática

A atividade de esterificação de lipases dos diferentes isolados foi testada com o ácido mirístico (C14:0) reagindo com álcool isobutílico na proporção molar 1:1 na presença do solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados foram apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Atividade de esterificação e rendimento da esterificação de lipases produzidas por linhagens isoladas de frutos amazônicos.

Isolado	Atividade de Esterificação (U/g)	Esterificação (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PP 107	0,08	5,24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 24	0,16	3,70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 47	0,05	9,33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 61	0,28	9,51
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TCMK 62	0,06	5,59
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 64	0,30	10,46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 66	0,30	8,74
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 71	0,50	13,41
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 72	0,58	17,83
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 77	0,42	13,28
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TCMK 78	0,04	6,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 85	0,37	4,64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 86	0,23	10,91
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> TCMK 100	0,12	2,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCMK 119	0,06	3,62
<i>Pseudomonas boreopolis</i> TCLB 48	0,25	4,79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCLB 73	0,30	11,62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCLB 74	0,13	12,46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCLB 75	0,22	9,77
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCLB 76	0,18	7,66

Condições experimentais: A atividade de esterificação ocorreu com a reação do ácido mirístico e álcool isobutílico (razão molar 1:1). Foi conduzida em shaker a 40 °C, 180 rpm por 24 horas. Esta foi iniciada pela adição de 1 U/mL (m/v) de enzima. 1 mL de alíquota diluída em 10 mL de etanol. A titulação foi feita com KOH 0,02 N até pH 11.

O maior valor encontrado na esterificação, na presença do solvente DMSO, foi 17,83%, utilizando a enzima produzida pelo microrganismo *P. aeruginosa* TCMK 72.

Valores próximos a esse foram obtidos pelas linhagens *P. aeruginosa* TCMK 71 e *P. aeruginosa* TCMK 77, com 13,41 % e 13,28%, respectivamente. Aragão et al. (2009), utilizando lipase comercial livre, obtiveram 33% de esterificação em 72 horas de reação na síntese de butirato de isoamila, sugerindo estudos posteriores quanto do potencial da enzima utilizada. Mendes et al. (2019), ao isolar fungos filamentosos que produzem enzimas lipolíticas de folhas de decomposição de ambientes aquáticos, encontraram 36% de fungos filamentosos com atividade de esterificação, sendo 0,11 U/mL a maior atividade.

As lipases constituem um grupo importante dentro da biotecnologia, e dentre as aplicações tecnológicas, provaram ser os melhores biocatalizadores para reações como a produção de éster, o que torna a esterificação catalisada por lipase proveniente de rotas microbianas e enzimáticas, economicamente viável, pois é capaz de reduzir processos e consequentemente custos, bem como apresenta maior rendimento e redução de chances de formação de produtos indesejáveis (AMERI et al. 2019; BAYOUT et al., 2019; SÁ et al., 2017; MENESES et al., 2019; DANDAVATE et al. 2009).

Na Tabela 9 estão listados alguns trabalhos que utilizaram lipases microbianas para a síntese de ésteres. No trabalho de Cai et al. (2017), utilizando lipase de *Bacillus amyloliquefaciens*, foi sintetizado o éster acetado de cinamila a partir da reação do álcool cinamílico com o acetato de vinila (1:2, razão molar). Narwal et al. (2016), utilizando lipases de *Bacillus aerius*, obteve acetato de isoamila utilizando ácido acético e álcool isoamílico. Meneses et al (2019), no intuito de sintetizar propionato de benzila utilizando álcool benzílico e ácido propiônico (razão molar 1:5) e *Candida antarctica* conseguiram um rendimento de 99%. Vadgama, et al. (2015) testaram a formação miristato de isopropila, com a utilização de ácido mirítico e álcool isopropílico na presença de *Candida antarctica* como catalizador. Souza et al. (2017), utilizando *Candida antarctica*, sintetizaram butirato de metila e etila por esterificação do ácido butírico com metanol e etanol (razão molar 1:1). Todero et al. (2015) obtiveram o rendimento de 96,1% de butirato de isoamila sintetizado por álcool isoamílico e ácido butírico, utilizando *Thermomyces lanuginosus*. Meneses et al (2019), a partir da reação álcool benzílico e ácido butírico (razão molar 1:1) catalisada por *Candida antarctica*, sintetizaram butirato de benzila com rendimento de 80%.



**Tabela 9.** Aplicação de lipases microbianas para síntese de ésteres.

<b>Microrganismo</b>	<b>Éster produzido</b>	<b>Rendimento Máximo</b>	<b>Autor</b>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Acetado de cinamila	93%	Cai, et al. 2017
<i>Bacillus aerius</i>	Acetato de isoamila	68%	Narwal et al 2016
<i>Candida antarctica</i>	Propionato de benzila	99%	Meneses, et al, 2019
<i>Candida antarctica</i>	Miristato de isopropila	87,65%	Vadgama, et al. 2015
<i>Candida antarctica</i>	Butirato de metila e etila	96,8%	Souza, et al. 2017
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Butirato de isoamila	96, 1%	Todero, et al. 2015
<i>Candida antarctica</i>	Butirato de benzila	80%	Meneses, et al. 2019

Reações de esterificação podem ser realizadas por meio da via ácida ou enzimática, nesse caso, com a aplicação de lipases. A via enzimática, tem sido amplamente pesquisada, isso devido às especificidades do processo, tais como: alta seletividade e baixo consumo de energia (CÁDERNAS et al., 2021). Sendo a reação de esterificação a que mais está relacionada com o papel natural das enzimas (RODRIGUES et al., 2019). Nesse sentido, a esterificação ocorre diretamente com o ácido graxo, seguindo o mecanismo de ativação pela lipase, usando a tríade catalítica, que geralmente é serina, histidina e ácido glutâmico (MEDEIROS et al., 2013).

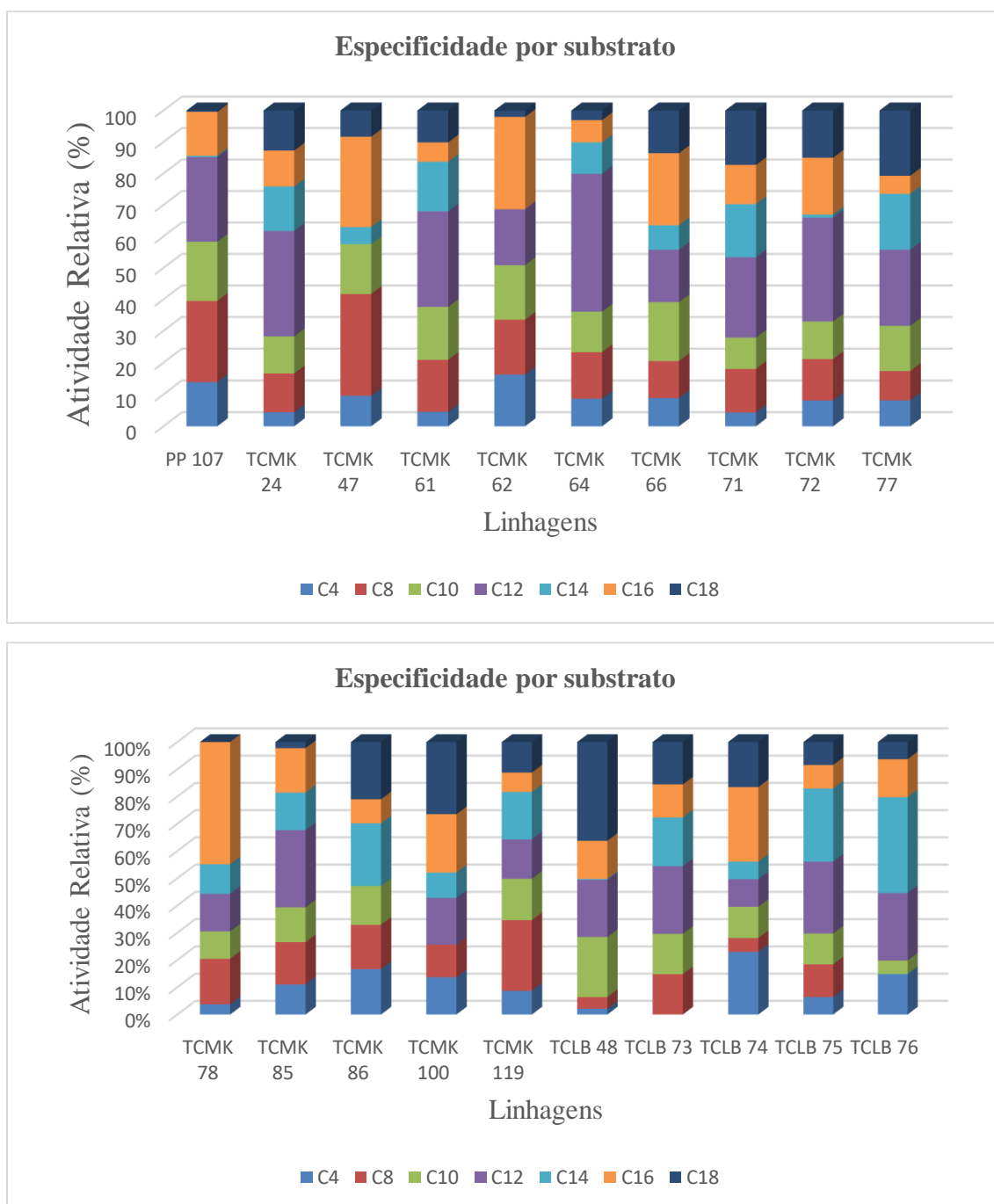
Na prática essa reação é realizada em reatores de batelada sob controle de agitação e temperatura, com meio composto por um determinado substrato. No estudo de Agueiras et al. (2019), os autores usaram ácido oleico, óleo de macaúba, álcool, biocatalizador de lipase e como matéria-prima o farelo de algodão. Conversões superiores a 80% em um período de quatro horas foram obtidos a partir de um sólido fermentado, o qual converteu o ácido oleico em oleato de etila, no processo de esterificação. É interessante destacar que esse sólido pode ser lavado com etanol e reutilizado em mais quatro reações.

Resultados com maior taxa de esterificação foi observado no estudo de Cea et al. (2019). A lipase usada promoveu um aumento de 95% na conversão do oleato de etila. Provavelmente esse comportamento está relacionado com a exposição dos sítios ativos da enzima (YAACOB et al., 2017). O referido estudo, usou lipase imobilizada, onde os sítios ativos ficam mais expostos promovendo a reação catalítica

Os resultados do presente trabalho são promissores do ponto de vista que as enzimas utilizadas são de linhagens isoladas de frutos amazônicos e precisam ser purificadas e caracterizadas. Dessa forma, a otimização dos parâmetros operacionais podem melhorar o rendimento da esterificação, podendo ser promissoras para aplicações na produção de ésteres de aromas para a aplicação na formulação de alimentos.

## 5.6 ESPECIFICIDADE DO SUBSTRATO

A atividade hidrolítica dos diferentes microrganismos produtores de lipase foi avaliada em substratos de p-nitrofenila (Butirato C4; Octanoato C8; Decanoato C10; Dodecanoato C12; Miristato C14; Palmitato C16; Stearato C18) (Figura 6). Dentre os 7 substratos testados, o C12 foi o que mais se destacou, sendo a maior atividade relativa para 12 (*P. aeruginosa* PP 107; *P. aeruginosa* TCMK 24; , *P. aeruginosa* TCMK 61, *S. maltophilia* TCMK 62; *P. aeruginosa* TCMK 64, *P. aeruginosa* TCMK 71; *P. aeruginosa* TCMK 72; *P. aeruginosa* TCMK 77; *P. aeruginosa* TCMK 85; *P. aeruginosa* TCLB 73; *P. aeruginosa* TCLB 75; *P. aeruginosa* TCLB 76) dos 20 microrganismos, seguido por C8 com 2 (*P. aeruginosa* TCMK 47; *P. aeruginosa* TCMK 119), C16 com 2 (*S. maltophilia* TCMK 78; *P. aeruginosa* TCLB 74), C18 com 2 (*S. pavanii* TCMK 100; *P. boreopolis* TCLB 48), C10 (*P. aeruginosa* TCMK 66) e C14 (*P. aeruginosa* TCMK 86).



**Figura 6.** Atividade enzimática de lipase em ésteres *p*-nitrofenílicos. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 7 a 40° C.

Algumas propriedades específicas das lipases de *Pseudomonas* podem variar dependendo do grupo ao qual a enzima pertence (RIOS et al., 2018) isso explica o motivo de haver a preferência por diferentes substratos, mesmo sendo do mesmo gênero. As lipases exibem uma ampla gama de substratos e dependendo do seu estado físico, pode ocorrer interferências na especificidade (ALMEIDA et al, 2016; GUPTA et al, 2004)).

Kanmani et al. (2015), usaram uma nova cepa lipolítica para clonagem e caracterização e destacaram a preferência das lipases pelos ácidos graxos de cadeia longa, com mais de dez átomos de carbono. Nesse estudo, foi observado que a lipase teve preferência por ésteres p-nitrofenílicos de cadeia longa, mostrando sua atuação na interface óleo-água.

As verdadeiras lipases catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis que possuem ácidos graxos de cadeia média a longa (acima de 10 carbonos) (LIU, 2017; RAMNATH et al., 2017; LOPES et al., 2011; BORNSCHEUER, 2002). Como foi possível observar na análise de especificidade por substrato, dos 20 microrganismos, apenas 1 teve preferência por ácidos graxos de 8 carbonos, tendo os demais, a preferência por cadeia acima de 12 carbonos.

Devido às características de ampla especificidade de substrato, estabilidade em solventes orgânicos, estereosseletividade e regioosseletividade, as lipases se tornam biocatalisadores de grande importância para aplicações tecnológicas. Porém, garantir que enzimas de características específicas e alta atividade sejam produzidas, são necessárias abordagens de engenharia genética para se obter a enzima com a função desejada (KUN et al, 2019).

Li et al., (2013) isolaram uma bactéria secretora de lipase da espécie *S. maltophilia* e após purificação parcial, foi testada quanto a especificidade de substrato. A enzima foi capaz de hidrolisar triacilgliceróis com cadeias de 2 a 18 carbonos, com atividade ótima para 10 carbonos e baixa atividade para ácidos graxos de cadeia curta (menores que 6). Desta forma, foi possível concluir a partir da caracterização de especificidade por substratos, que se trata de uma lipase verdadeira.

Pensando em aplicações para as enzimas produzidas nesse trabalho, é possível formular um coquetel enzimático, concentrando as enzimas com membranas de micro e ultrafiltração, pois a mesma requer baixa energia, é de fácil manuseio e aumenta a escala do produto (MONDAL et al., 2019; ALVES et al., 2020; NAGANTHRAN et al., 2017).

Salgado et al., (2021) sequenciaram o genoma de *Streptomyces violascens* e a clonagem e expressão de lipase foram realizadas em *Bacillus subtilis*. A enzima recombinante foi capaz

de hidrolisar ácidos graxos na cadeia principal de glicerídeos, melhorando assim o conteúdo de DHA e EPA no óleo de bacalhau.

## 6. CONCLUSÕES

Por se tratar de frutos ricos nutricionalmente, os frutos amazônicos pupunha e tucumã possuem grande potencial para exploração enzimática, visto que, fornece nutrientes necessários para o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, que podem secretar diferentes enzimas para várias aplicações industriais.

O percentual de isolados produtores de lipase variou de acordo com o fruto, sendo 38,25% para pupunha e 61,75% para o tucumã, fato esse que pode ser explicado pela composição nutricional dos frutos, sendo o tucumã rico em lipídeos, o que favorece a indução de produção de microrganismos produtores de lipase.

Os isolados *P. aeruginosa* PP 107, *P. aeruginosa* TCMK 64, *P. aeruginosa* TCMK 71 e *P. aeruginosa* TCMK 77 obtiveram as maiores atividades para lipase em cultivo em meio líquido, com valores acima de 3 U/mL.

Todos os microrganismos isolados são bactérias pertencentes as espécies de *Pseudomonas aeruginosa* e *boreopolis*, e *Stenotrophomonas maltophilia* e *pavani*. Tanto as *P. boreopolis*, quanto a *S. pavanii*, necessitam ser exploradas, pois ainda não foram reportadas na literatura para o uso biotecnológico.

As enzimas produzidas foram capazes de catalisar reações de esterificação, chegando a atingir 17,83 % de conversão com o isolado *P. aeruginosa* TCMK 72, permitindo desta forma, concluir que os mesmos possuem potencial para aplicação em reações de esterificação.

Na análise de especificidade por substrato, mais de 50% dos isolados apresentaram atividade ótima para substratos de ácidos graxos de cadeia média a alta. A partir do perfil de hidrólise de cada isolado, é possível formular um coquetel enzimático com diferentes isolados e com aplicação específica.

## REFERÊNCIAS

- AGUIEIRAS, E. C., DE BARROS, D. S., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., FREIRE, D. M. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable energy**, v. 130, p. 574-581, 2019.
- ALAVI, P., STARCHER, M. R., THALLINGER, G. G., ZACHOW, C., MÜLLER, H., BERG, G. A genômica comparativa de *Stenotrophomonas* revela genes e funções que diferenciam bactérias benéficas e patogênicas. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2014.
- ALMEIDA, A. F., TAULK-TORNISIELO, S. M., CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. *Annals of Microbiology*, v. 63, n. 4, p. 1225-1234, 2012.
- ALMEIDA, A. F.; DIAS, K. B.; SILVA, A. C. C.; TERRASAN, C. R. F.; TAUKTORNISIELO, A. M.; CARMONA, E. C.; Agroindustrial Wastes as Alternative for Lipase Production by *Candida viswanathii* under Solid-State Cultivation: Purification, Biochemical Properties, and Its Potential for Poultry Fat Hydrolysis, **Enzyme research**, v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1353497>
- ALMEIDA, A. F.; TERRASAN, C. R. F.; TERRONE, C. C.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. **Process biochemistry**, v. 65, p.71-80, 2018.
- AMERI, A., SHAKIBAIE, M., SAHAMI, Z., KHOABI, M.,FOROOTANFAR, H. Statistical optimization of cultural medium composition of thermoalkalophilic lipase produced by a chemically induced mutant strain of *Bacillus atrophaeus* FSHM2. **3 Biotech**, v. 9, n. 7, p. 1-11, 2019.
- AMORIM, S. S. Taxonomia, diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Lafoensia pacari* A. St. Hil.(mangava-brava) presente no Pantanal Mato-grossense. 2018.
- ANDRADE, D.M. Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257–270, 2016.
- ANUNCIAÇÃO, P. C., GIUFFRIDA, D., MURADOR, D. C., DE PAULA FILHO, G. X., DUGO, G., PINHEIRO-SANT’ANA, H. M. Identification and quantification of the native carotenoid composition in fruits from the Brazilian Amazon by HPLC–DAD–APCI/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 83, p. 103296, 2019.

ARAGÃO, V. C., ANSCHAU, A., PORCIUNCULA, B. D. A., THIESEN, C., KALIL, S. J., BURKERT, C. A. V., & BURKERT, J. F. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2268-2272, 2009.

ARAUJO, N. M. P., ARRUDA, H. S., MARQUES, D. R. P., DE OLIVEIRA, W. Q., PEREIRA, G. A., PASTORE, G. M. Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: A review. **Food Research International**, v. 147, p. 110520, 2021.

ARAÚJO, R., CASAL, M., CAVACO-PAULO, A. **Application of enzymes for textile fibres processing**. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 26, n. 5, p. 332-349, 2008.

ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. 2007.

ARBIGE, MICHAEL V.; SHETTY, JAY K.; CHOTANI, GOPAL K. Industrial Enzymology: The Next Chapter. **Trends In Biotechnology**, 2019.

ARIS, M. H., ANNUAR, M. S. M., LING, T. C. **Lipase-mediated degradation of poly- $\epsilon$ -caprolactone in toluene: Behavior and its action mechanism**. *Polymer Degradation and Stability*, v. 133, p. 182-191, 2016.

ASSMANN, C. E., WEIS, G. C. C., DA ROSA, J. R., BONADIMAN, B. D. S. R., DE OLIVEIRA ALVES, A., SCHETINGER, M. R. C., DA CRUZ, I. B. M. Amazon-derived nutraceuticals: promises to mitigate chronic inflammatory states and neuroinflammation. *Neurochemistry International*, p. 105085, 2021.

AZEVEDO, J. S. M.; CORREIA, A.; HENRIQUES, I.; Molecular analysis of the diversity of genus *Psychrobacter* present within a temperature estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, p. 451-460, 2013.

BALDISSERA, M. D., SOUZA, C. F., DOLESKI, P. H., GRANDO, T. H., SAGRILLO, M. R., DA SILVA, A. S., MONTEIRO, S. G. Treatment with tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) for diabetic mice prevents changes in seric enzymes of the purinergic system: improvement of immune system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 374-379, 2017.

BANSODE, S. R., RATHOD, V. K. An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. **Ultrasonics sonochemistry**, v.38, p. 503-529, 2017.

BASTO, G. J., CARVALHO, C. W. P., SOARES, A. G., COSTA, H. T. G. B., CHÁVEZ, D. W. H., DE OLIVEIRA GODOY, R. L., & PACHECO, S. Physicochemical properties and carotenoid content of extruded and non-extruded corn and peach palm (*Bactris gasipaes, Kunth*). *LWT-Food Science and Technology, Mysore*, v. 69, p. 312-318, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.065>

BAYOUT, I., BOUZEMI, N., GUO, N., MAO, X., SERRA, S., RIVA, S., SECUNDO, F. Natural flavor ester synthesis catalyzed by lipases. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 35, n. 2, p. 209-218, 2020.

BHARATHI, D., RAJALAKSHMI, G., KOMATHI, S. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. **Journal of King Saud University-Science**. 2018.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22 2019.

BONATELLI, M. L. Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose. 2012. (Dissertação de Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP. 2012.

BORGES, C. V.; FERREIRA, F. M.; SOUZA, V. F. de; ATROCH, A. L.; ROCHA, R. B. Seleção entre e dentro de progênies para a produção de frutos de pupunha. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 60, n. 2, p. 177-184, 2017.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

BORNSCHEUER, U.T. KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in organic synthesis – regio- and stereoselective biotransformations**. Wiley-VCH, Weinheim. 1999.

BRANDÃO, Camila Pinto. **Caracterização e avaliação de genótipos de pupunheira ao mercado de frutos para mesa**. 2020. Tese de Doutorado. UFRA/Campus Belém.

BRÍGIDA, A. I.; AMARAL, P. F.; COELHO, M. A.; GONÇALVES, L. R. Lipase de *Yarrowia lipolytica*: produção, caracterização e aplicação como biocatalisador industrial. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. *Revista de Catálise Molecular B: Enzimática* v. 101, p.148-158, 2014.

CAI, Q.; HU, C.; YANG, N.; WANG, Q.; WANG, J.; PAN, H.; RUAN, C. Enhanced activity and stability of industrial lipases immobilized onto spherelike bacterial cellulose. **International journal of biological macromolecules**, v.109, p.1174-1181, 2018.

CAI, X., WANG, W., LIN, L., HE, D., SHEN, Y., WEI, W., & WEI, D. Z. Cinnamyl Esters Synthesis By Lipase-Catalyzed Transesterification in a Non-Aqueous System. **Catal Lett**. v.147, p. 946–952, 2017.

CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa Lf*) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313-319, 2015.

CAO, X.; LIAO, L.; FENG, F. Purificação e caracterização de uma lipase extracelular de *Trichosporon sp.* e sua aplicação no enriquecimento de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3. **LWT**, v. 118, 2019.

CÁRDENAS, J., ORJUELA, A., SÁNCHEZ, D. L., NARVÁEZ, P. C., KATRYNIOK, B., CLARK, J. **Pre-treatment of Used Cooking Oils for the Production of Green Chemicals: A Review**. *Journal of Cleaner Production*, 2021.

CARDOSO, D., SÄRKINEN, T., ALEXANDER, S., AMORIM, A. M., BITTRICH, V., CELIS, M., FORZZA, R. C. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 40, p. 10695-10700, 2017.



CARVALHO, A. V.; BECKMAN, J. C.; MACIEL, R. de A.; FARIAS NETO, J. T. de Características físicas e químicas de Frutos de pupunheira no estado do Pará. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 35, p. 763-768, 2013.

CARVALHO, A. V.; VASCONCELOS, M. A. M. de; SILVA, P. A.; ASCHERI, J. L. R. Produção de snacks de terceira geração por extrusão de misturas de farinhas de pupunha e mandioca. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 12, n. 4, p. 277-284, 2009.

CARVALHO, A. V.; VASCONCELOS, M. A. M. de; SILVA, P. A.; ASCHERI, J. L. R. Produção de snacks de terceira geração por extrusão de misturas de farinhas de pupunha e mandioca. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 12, n. 4, p. 277-284, 2009.

CASTIGLIONI, G. L.; COSTA, J. A. A.; ALEGRE, R. M. Study of lipase production by *Burkholderia cepacia*. *Engenharia sanitaria e ambiental*, v. 23, n. 4, p. 637-644, 2018.

CEA, M., GONZÁLEZ, M. E., ABARZÚA, M., NAVIA, R. **Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar**. *Journal of environmental management*, v. 242, p. 171-177, 2019.

CEA, M., GONZÁLEZ, M. E., ABARZÚA, M., NAVIA, R. **Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar**. *Journal of environmental management*, v. 242, p. 171-177, 2019.

CHANDRA, P., SINGH, R., ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, v. 19, n. 1, p. 1-42, 2020.

CHOI, Y. H., PARK, Y. J., YOON, S. J., LEE, H. B. **Purification and characterization of a new inducible thermostable extracellular lipolytic enzyme from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, p. 11-19, 2016.

CHOONG, W. P., TAN, C. H., SHOW, P. L., LAM, H. L., ANNUAR, M. S. B. M., JUAN, J. C., ... LING, T. C. **Efficient enzyme-catalysed transesterification of microalgal biomass from *Chlamydomonas* sp.** *Energy*, p. 1370-1373, 2016. .Doi: 10.1016/j.energy.2016.06.032.

CIPOLATTI, E. P., VALÉRIO, A., HENRIQUES, R. O., PINTO, M. C. C., LORENTE, G. F., MANOEL, E. A., PESSELA, B. C. **Production of new nanobiocatalysts via immobilization of lipase B from *C. antarctica* on polyurethane nanosupports for application on food and pharmaceutical industries**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165, p. 2957-2963, 2020.

CLEMENT, C. R. KALIL FILHO, A. N.; MODOLO, V. A.; YUYAMA, K.; RODRIGUES, D. P.; LEEUWEN, J. van.; FARIAS NETO, J. T. de; CRISTO-ARAÚJO, M. de; FLORES, W. B. C. Domesticação e melhoramento de pupunha. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Ed.). Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas. Viçosa: Editora UFV, p. 367-398, 2009.

COLLA, L. M, PRIMAZ, A. L., BENEDETTI, S., LOSS, R. A., LIMA, M. D, REINEHR, C. O., COSTA, J.A.V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 461-467, 2016.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. 2012.

CORDEIRO, S. A.; SILVA, M. L. Rentabilidade e risco de investimento na produção de palmito de pupunha (*Bactris gasipaes Kunth.*). *Cerne*, Lavras, v. 16, n. 1, p. 53-59, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-77602010000100006>

CORTEZ, D. V., CASTRO, H. F. D., ANDRADE, G. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Química Nova*, vol. XY, n. 00, p. 1-12, 2016.

COSTA, G. V.; ROCHA, W. C.; FREITAS, A. D. G. Microrganismos endofíticos encontrados no fruto da pupunheira (*Bactris gasipaes Kunth*) e seu potencial antimicrobiano. **Rev Scie. Amaz**, v. 8, n. 3, p. 23-27, 2019.

COSTA, W. A.; M. S. O.; SILVA, M. P.; CUNHA, V. M. B.; PINTO, R. H. H.; BEZERRA, F. W. F.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Açaí (*Euterpe oleracea*) and Bacaba (*Oenocarpus bacaba*) as functional food. In: *Superfood and Functional Food-An Overview of Their Processing and Utilization*. IntechOpen, 2017.

MAIA, G. C. H. M.; CAMPOS, M. S.; BARROS-MONTEIRO, J.; CASTILLO, J. E. L.; FALEIROS, M. S.; SALES, R. S. A.; GALENO, D. M. L.; LIRA, E.; SOUZA, F. C. A.; ORTIZ, C. Effects of *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Tucumã) on diet-induced dyslipidemic rats. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2014, 2014.

CUNHA JUNIOR, R M.; DOMINGUES, P. B. A.; AMBRÓSIO, R. O.; MARTINS, C. A. F.; SILVA, J. G. B. P. C. P.; PIERI, F. A. Brazilian amazon plants: an overview of chemical composition and biological activity. In: *Natural Resources Management and Biological Sciences*. IntechOpen, 2020.

DANDAVATE, V., JINJALA, J., KEHARIA, H., MADAMWAR, D. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresource technology*, v. 100, n. 13, p. 3374-3381, 2009.

DIDONET, A. A. O mercado de um produto florestal não madeireiro e o resíduo sólido gerado pela sua comercialização: o caso do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey.) nas feiras de Manaus. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Florestas Tropicais), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, 2012.

DIDONET, A. A., FERRAZ, I. D. K. O comércio de frutos de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey-Arecaceae) nas feiras de Manaus (Amazonas, Brasil). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 353-362, 2014.

ELIAS, G. A. Palmeiras (*Arecaceae*) em Santa Catarina, Sul do Brasil. 2017. 191 f. Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, SC, 2017.

ELIAS, G. A.; CORRÊA, P. F.; ZANETTE, V. C.; SANTOS, R. Arecaceae: análise bibliométrica das espécies nativas do estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciência e Natura*, v.37 n.1, p. 85 – 92, 2015.

FADDIN, M. J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 312, 1976.

FARIA, J. V., VALIDO, I. H., PAZ, W. H., DA SILVA, F. M., DE SOUZA, A. D., ACHO, L. R., BATAGLION, G. A. Comparative evaluation of chemical composition and biological activities of tropical fruits consumed in Manaus, central Amazonia, Brazil. *Food Research International*, v. 139, p. 109836, 2021.

FARIAS NETO, J. T. A Situação Atual da Pupunha no Estado do Pará. In: Reunião técnica do projeto de ProBio/MMA. Pupunha – raças primitivas e parentes silvestres, Manaus, Amazonas, p. 22-24, 2005.

FEITOSA, I. C. Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. **Universidade Tiradentes**, 2009.

FERREIRA, C. M. O. Isolamento e seleção de bactérias lipolíticas provenientes de água residual de abatedouro. 2015.

FERREIRA, E. D. S., LUCIEN, V. G., AMARAL, A. S., SILVEIRA, C. D. S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare Mart*). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 19(4), 427-433, 2009.

FERREIRA, M. J., MOTA, M. F., MARIANO, R. G., FREITAS, S. P. Evaluation of liquid-liquid extraction to reducing the acidity index of the tucuma (*Astrocaryum vulgare Mart.*) pulp oil. *Separation and Purification Technology*, v. 257, p. 117894, 2021.

FISCHER, M., PLEISS, J. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic acids research*, v. 31, n. 1, p. 319-321, 2003.

FONSECA MACHADO, A. P., DO NASCIMENTO, R. D. P., DA ROCHA ALVES, M., REGUENGO, L. M., JUNIOR, M. R. M. Brazilian tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare*) fruits: bioactive composition, health benefits, and technological potential. **Food Research International**, p. 110902, 2021.

FREITAS SANTOS, P. D., RUBIO, F. T. V., DE CARVALHO BALIEIRO, J. C., THOMAZINI, M., FAVARO-TRINDADE, C. S. Application of spray drying for production of microparticles containing the carotenoid-rich tucumã oil (*Astrocaryum vulgare Mart.*). *LWT*, v. 143, p. 111106, 2021.b

FREITAS, L. C., BARBOSA, J. R., DA COSTA, A. L. C., BEZERRA, F. W. F., PINTO, R. H. H., DE CARVALHO JUNIOR, R. N. Dos resíduos à indústria sustentável: como os resíduos agroindustriais podem ajudar no desenvolvimento de novos produtos?. **Recursos, Conservação e Reciclagem**, v. 169, p. 105466, 2021. a

FURINI, G., **Produção de enzimas lipolíticas por bactérias isoladas de sistemas de tratamento biológico de efluentes**. 2017, 81 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente) - Programa de pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente, Porto Alegre/RS – 2017.

GAUR, R.; HEMAMALINI, R.; KHARE, S.K.. Lipolytic Enzymes. **Current Developments In Biotechnology And Bioengineering**, p. 175-198, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-63662-1.00008-7>

GEOFFRY, KIPTOO; ACHUR, RAJESHWARA N. Optimization of novel halophilic lipase production by *Fusarium solani* strain NCCCL 4084 using palm oil mill effluente. *Jornal de Engenharia Genética e Biotecnologia*, v. 16, n. 2, pág. 327-334, 2018.

GHOSH, R., CHATTERJEE, S., MANDAL, N.C. *Stenotrophomonas*. In: **Micróbios Benéficos em Agro-Ecologia**. Imprensa Acadêmica, p. 427-442, 2020.

GOUJARD, L., ROUMANET, P. J., BAREA, B., RAOUL, Y., ZIARELLI, F., LE PETIT, J., GUÉGAN, P. **Evaluation of the effect of chemical or enzymatic synthesis methods on biodegradability of polyesters**. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 24, n. 1, p. 64-71, 2016.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **OCL Oilseeds and fats crops and lipids**, v. 24, n. 4, p. D403, 2017.

GUPTA, N., SAHAI, V., GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 518-526, 2007.

GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. **Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties**. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

GUPTA, R., RATHI, P., GUPTA, N., BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 37, n. 1, p. 63-71, 2003.

HANKIN, L; ANAGNOSTAKIS S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*, v. 67, p. 597–607, 1975.

HERNANDEZ, K., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 4, p. 873-878, 2011.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STANLEY, J.T.; WILLIAM, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, p.786-788, 1994.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

JESUS, M. V., DE OLIVEIRA, T. S., FERREIRA, R. D. M., DE LIMA, A. M., DA SILVA RODRIGUES, J. R., SILVA, C. F., SOUZA, R. R. Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. *Scientia Plena*, v. 12, n. 5, 2016.

KALIL FILHO, A. N., CLEMENT, C. R., DE RESENDE, M. D. V., DE FARIAS NETO, J. T., BERGO, C. L., YOKOMIZO, G. K. I., MODOLO, V. A. Programa de melhoramento genético de pupunha na Embrapa, IAC e INPA. **Embrapa Florestas-Documents (INFOTECA-E)**, 2010.

KANMANI, P., KUMARESAN, K., & ARAVIND, J. **Gene cloning, expression, and characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase**. Brazilian Journal of Microbiology, p. 1235-1243, 2015.

KANMANI, P.; KUMARESAN, K.; ARAVIND, J. Utilization of coconut oil mill waste as a substrate for optimized lipase production, oil biodegradation and enzyme purification studies in *Staphylococcus pasteurii*. **Electronic Journal Of Biotechnology**, v. 18, n. 1, p.20-28, 2015.

KATARIA, A., SHARMA, R., SHARMA, S., SINGH, B., KAUR, G., YAKUBU, C.. Recent applications OF BIO-ENGINEERING principles to modulate the functionality of proteins in food systems. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

Kerr LS, Clement RNS, Clement CR, Kerr WE . Cozinando com a Pupunha. INPA, Manaus. 94p. 2012

KHAN, F. I., LAN, D., DURRANI, R., HUAN, W., ZHAO, Z., WANG, Y. **The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties**. Frontiers in bioengineering and biotechnology, v. 5, n. 16, 2017.

KIM, K. R., KANG, W.R., OH, D.K. Sequência completa do genoma de *Stenotrophomonas* sp. KACC 91585, uma bactéria eficiente para hidratação de ácidos graxos insaturados. **Journal of biotechnology** , v. 241, p. 108-111, 2017.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 320p, 2019.

KUMAR, A., GUDIUKAITE, R., GRICAJEVA, A., SADAUSKAS, M., MALUNAVICIUS, V., KAMYAB, H., PANT, D. Microbial lipolytic enzymes—promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation. **Energy**, v. 192, p. 116674, 2020.

KURTZMAN, C.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: A Taxonomic Study, ed.5, Elsevier, v. 1 , 2011.

LAI, O. M.; LEE, Y. Y.; PHUAH, E. T.; AKOH, C. C. Lipase/esterase: Properties and Industrial Applications. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p.158-167, 2019.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostistef*). Journal of Bacteriology, Danvers, v.77, n.3 p.348-352, 1994.

LEE, J. H., LEE, J. H., KIM, D. S., YOO, H. Y., PARK, C., KIM, S. W. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon. Bioresource Technology Reports, 2019.

LI, M., YANG, L. R., XU, G., WU, J. P. Cloning and characterization of a novel lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* GS11: the first member of a new bacterial lipase family XVI. Journal of biotechnology, v. 228, p. 30-36, 2016.

LIEW, Yuh Xiu et al. Optimization of alkaline lipase production from *Burkholderia cepacia* through submerged fermentation. Chemical Engineering Transactions, v. 45, p. 1675-1680, 2015.

LIU, C. H., HUANG, C. C., WANG, Y. W., LEE, D. J., CHANG, J. S. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. Applied Energy, p. 41-46, 2012. Doi: 10.1016/j.apenergy.2012.05.053.

LIU, W., LI, M., YAN, Y. Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and used for biodiesel production. *Scientific reports*, p. 1-11, 2017. Doi: 10.1038/s41598-017-16036-7.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. Chapter 11. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*. 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, p. 265-275, 1951.

LUZ, B. D. da S. Produção de lipases visando-se aplicações industriais empregando-se microrganismos selecionados na bioprospecção realizada no parque estadual serra do Ouro Branco/MG. – 2014. 59 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São João del-Rei. Mestrado em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável, 2014.

MAK, A. E.; SIMON, R. R. Avaliação da segurança pré-clínica da lipase triacilglicerol QLM de *Burkholderia ubonensis*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2019.

MATOS, K. A. N., LIMA, D. P., BARBOSA, A. P. P., MERCADANTE, A. Z., CHISTE, R. C. Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products lassified as very high carotenoid sources. *Food chemistry*, v. 272, p. 216-221, 2019.

MEDEIROS, G. A., GONÇALVES, S. B., RODRIGUES, D. S., NETO, B. A. Enzimas em Líquidos Iônicos: Uma Combinação Promissora para um Biodiesel Limpo. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 1, p. 74-94, 2013.

MELO, C. M. T., COSTA, L. L., PEREIRA, F. C., CASTRO, L. M., NEPUMOCENO, S. Análises físico-químicas do fruto in natura da pupunha. *Revista Inova Ciência & Tecnologia/Innovative Science & Technology Journal*, v. 3, n. 1, p. 13-17, 2017.

MENDES, D. B. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases com potencial de aplicação para a produção de biodiesel por catálise enzimática. 2019. 133f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia Rede Bionorte, Palmas, 2019.

MENESES, A. C., LERIN, L. A., ARAÚJO, P. H. H., SAYER, C., DE OLIVEIRA, D.. Benzyl propionate synthesis by fed-batch esterification using commercial immobilized and lyophilized Cal B lipase. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 42, n. 10, p. 1625-1634, 2019.

MENESES, A. C.; SÁ, A. G. A.; LERIN, L. A.; CORAZZA, M. L.; DE ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; OLIVEIRA, D. Benzyl butyrate esterification mediated by immobilized lipases: Evaluation of batch and fed-batch reactors to overcome lipase-acid deactivation. *Process Biochemistry*. v. 78, p. 50-57, 2019.

MENEZES, E. G. O., BARBOSA, J. R., PIRES, F.C. S., FERREIRA, M.C. R., E SILVA, A. P. D. S., SIQUEIRA, L.M.M., DE CARVALHO JUNIOR, R. N.. Desenvolvimento de uma nova equação de escala para obter óleo de Tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) rico em carotenoides usando CO<sub>2</sub> supercrítica como solvente. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 181, p. 105481, 2022.

MESSIAS, J. M., COSTA, B. Z. D., NASCIMENTO, V. M. G. D., GIESE, E. C., DEKKER, R. F., BARBOSA, A. D. M.. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas*, p. 213-234, 2011.

MOBARAK-QAMSARI, E.; KASRA-KERMANSHAHI, R.; MOOSAVI-NEJAD, Z. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iranian journal of microbiology*, v. 3, n. 2, p. 92, 2011.

MOHTASHAMI, M., FOOLADI, J., HADDAD-MASHADRIZEH, A., HOUSAINDOKHT, M. R., & MONHEMI, H. Molecular mechanism of enzyme tolerance against organic solvents: Insights from molecular dynamics simulation. *International journal of biological macromolecules*, p. 914-923, 2019.

MORAIS-JUNIOR, W. G., KAMIMURA, E. S., RIBEIRO, E. J., PESSELA, B. C., CARDOSO, V. L., DE RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. *Protein Expression and Purification* 123, 2016.

MORDOR INTELLIGENCE .Industrial enzymes market - growth, trends, covid-19 impact, and forecasts (2022 - 2027). Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market#>

NARWAL, S. K., SAUN, N. K., DOGRA, P., & GUPTA, R. Green synthesis of isoamyl acetate via silica immobilized novel thermophilic lipase from *Bacillus aerius*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 42, n. 1, p. 69-73, 2016.

NAVVABI, A.; RAZZAGHI, M.; FERNANDES, P.; KARAMI, L.; HOMAEI, A. Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. *Process Biochemistry*, v. 70, p. 61-70. 2018.

NEVES, L. C.; TOSIN, J. M.; BENEDETTE, R. M.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**, v. 174, p.188-196, 2015.

NIGAN, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, v. 3, n. 3, p. 597-611, 2013.

NOOR , I. M.; M. HASAN, K. B.; RAMACHANDRAN. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 1, p. 13–20, 2003.

OLIVEIRA, N. P. S. Avaliação da produção de hidrolases de interesse industrial e substâncias bioativas por bactérias associadas aos frutos da Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart). 2012.

OLIVEIRA, S. F.; NETO, J. P. M.; SILVA, K. E. R. Uma revisão sobre a morfoanatomia e as propriedades farmacológicas das espécies *Astrocaryum aculeatum* Meyer e *Astrocaryum vulgare* Mart. *Scientia Amazonia*, v. 7, n. 3, p. 18-28, 2018.

OLIVEIRA, T. S. Seleção de leveduras produtoras de enzimas hidrolíticas a partir de frutos do cerrado Tocantinese. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2015.

ORDOÑEZ-SANTOS, L. E., MARTÍNEZ-GIRÓN, J., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, D. X. Extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) peel by means of ultrasound application and vegetable oil. *Dyna*, v. 86, n. 209, p. 91-96, 2019.

PASCOAL, A.; ESTEVINHO, L. M.; MARTINS, I. M.; CHOUPINA, A. B. Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 104, p. 119-126, 2018.

PATEL, M.; MISTRY, J.; DESAI, S.; PATEL, S.; DESAI, S. Isolation and Characterization of Lipase producing Bacteria from Vegetable Oil Spillage Site. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* v. 5, n. 8, p. 214–232, 2016.

PAZ, W. H., DE ALMEIDA, R. A., BRAGA, N. A., DA SILVA, F. M., ACHO, L. D., LIMA, E. S., KOOLEN, H. H. Remela de cachorro (*Clavija lancifolia* Desf.) fruits from South Amazon: Phenolic composition, biological potential, and aroma analysis. *Food research international*, v. 109, p. 112-119, 2018.

PAZ, W. H., DE ALMEIDA, R. A., BRAGA, N. A., DA SILVA, F. M., ACHO, L. D., LIMA, E. S., KOOLEN, H. H. Remela de cachorro (*Clavija lancifolia* Desf.) fruits from South Amazon: Phenolic composition, biological potential, and aroma analysis. *Food research international*, v. 109, p. 112-119, 2018.

PEREIRA, A. S.; FONTES-SANT'ANA, G. C.; AMARAL, P. F. F. Mango agroindustrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. *Food and Bioproducts Processing*, v. 115, p. 68-77, 2019.

PIAZZA, S. P., PUTON, B. M., DALLAGO, R. M., DE OLIVEIRA, D., CANSIAN, R. L., MIGNONI, M., PAROUL, N. Production of benzyl cinnamate by a low-cost immobilized lipase and evaluation of its antioxidant activity and toxicity. **Biotechnology Reports**, 2021.

PINTO, R. A. F. O. Bioprospecção e caracterização de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos isolados de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub. 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2019.

PIVA, G. S. **Estudo cinético do processo de esterificação enzimática de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) com ácido cinâmico**. 2020. 94 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, 2020.

PRAMANIK, K., SAREN, S., MITRA, S., GHOSH, P. K., MAITI, T. K. Computational elucidation of phylogenetic, structural and functional characteristics of *Pseudomonas* lipases. **Computational biology and chemistry**, V. 74, p. 190-200, 2018.

QUAYSON, E., AMOAH, J., HAMA, S., KONDO, A., OGINO, C. Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2020.



RAMNATH, L., SITHOLE, B., GOVINDEN, R. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Canadian journal of microbiology*, v. 63 n.3, p. 179-192, 2016.

RAMNATH, L., SITHOLE, B., GOVINDEN, R. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*, v. 15, p. 114-124, 2017.

RAPP, P.; BACKHAUS, S.; Formation of cellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 14, p. 938-943, 1992.

RASHID, R.; ANWAR, Z.; ZAFAR, M.; RASHID, T.; BUTT, I .Chitosan-alginate immobilized lipase based catalytic constructs: Development, characterization and potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p.992-1001, 2018.

RAVEENDRAN, S., PARAMESWARAN, B., UMMALYMA, S. B., ABRAHAM, A., MATHEW, A. K., MADHAVAN, A., PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food technology and biotechnology*, v. 56, n. 1, p. 16, 2018.

REGNER, E. L., SALVATIERRA, H. N., BAIGORÍ, M. D., PERA, L. M. Biomass-bound biocatalysts for biodiesel production: Tuning a lipolytic activity from *Aspergillus niger* MYA 135 by submerged fermentation using agro-industrial raw materials and waste products. *Biomass and Bioenergy*, v. 120, p. 59-67, 2019.

RIGO, D., GAYESKI, L., TRES, G. A., CAMERA, F. D., ZENI, J., VALDUGA, E., BACKES, G. T. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.

RIOS, N. S., PINHEIRO, B. B., PINHEIRO, M. P., BEZERRA, R. M., DOS SANTOS, J. C. S., & GONÇALVES, L. R. B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process biochemistry**, v. 75, p. 99-120, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.003>

ROBIC, A.; ULLMANN, C.; AUFRAY, P.; PERSILLON, C.; MARTIN, J. Enzymes for industrial applications. *Developement enzymes pour des applications industrielles*, v. 24, n. 4, 2017.

RODRIGUES, R. C., VIRGEN-ORTÍZ, J. J., DOS SANTOS, J. C., BERENGUER-MURCIA, Á., ALCANTARA, A. R., BARBOSA, O., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnology advances*, v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019.

RYAN, R. P., MONCHY, S., CARDINALE, M., TAGHAVI, S., CROSSMAN, L., AVISON, M. B., DOW, J. M. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 7, p. 514-525, 2009.

SÁ, AGA, DE MENESES, AC, DE ARAÚJO, PHH, DE OLIVEIRA, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 95-105, 2017.

SALGADO, C. A.; DOS SANTOS, C. I. A.; VANETTI, M. C. D. Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. **Food Bioscience**, p. 101509, 2021.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: a review. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 86-96, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.; Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, ed.2 1989.

SANTOS, B. W. C., FERREIRA, F. M., DE SOUZA, V. F., CLEMENT, C. R., ROCHA, R. B. Discriminant analysis of physical and chemical fruit traits of peach palm (*Bactris gasipaes Kunth*) from the upper Madeira River, Rondônia, Brazil. **Científica**, Jaboticabal, v. 45, n. 2, p. 154-161, 2017. DOI: <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2017v45n2p154-161>

SANTOS, I. L., SCHMIELE, M., AGUIAR, J. P. L., STEEL, C. J., SILVA, E. P., SOUZA, F. D. C. D. A. Evaluation of extruded corn breakfast cereal enriched with whole peach palm (*Bactris gasipaes, Kunth*) Flour. **Food Science and Technology**, Mysore, v. 40, n. 2, p. 458-464, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.04019>

SANTOS, M. D. F. G. D., ALVES, R. E., BRITO, E. S. D., SILVA, S. D. M., SILVEIRA, M. R. S. D.. Características de qualidade de frutos e óleos de palmeiras nativas da Amazônia brasileira. *Revista Brasileira de Fruticultura* , v. 39, 2017.

SAVICKAITE, A., DRUTEIKA, G., SADAUSKAS, M., MALUNAVICIUS, V., LASTAUSKIENE, E., GUDIUKAITE, R. Study of individual domains' functionality in fused lipolytic biocatalysts based on *Geobacillus* lipases and esterases. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 261-271, 2021. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.026.

SAVICKAITE, A., SADAUSKAS, M., GUDIUKAITE, R. Immobilized GDEst-95, GDEst-lip and GD-95RM lipolytic enzymes for continuous flow hydrolysis and transesterification reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 421-434, 2021. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2018.05.011.

SAVVIDOU, M. G., KATSABEA, A., KOTIDIS, P., MAMMA, D., LYMPEROPOULOU, T. V., KEKOS, D., KOLISIS, F. N. Studies on the catalytic behavior of a membrane-bound lipolytic enzyme from the microalgae *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *Enzyme and microbial technology*, p. 64-71, 2018.

SCOLA, B.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; JUNGANG, L.; LAMBALLERIE, X.; DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D.; A giant virus in amoebae. **Science**, p. 2033, 2003.

SEDDIGI, Z. S.; MALIK, M. S.; AHMED, S. A.; BABALGHITH, A. O.; KAMAL, A. Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase–metal combinations for dynamic processes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 348, p.54-70, 2017.

SHARMA, SHIVIKA; KANWAR, SHAMSHER S. Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.

SHERPA, M. T., DAS, S., NAJAR, I. N., THAKUR, N. Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* strain P13 gives insight into its protease production and assessment of sulfur and nitrogen metabolism. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100012, 2021.

SILVA, E. B. D. Isolamento e seleção de fungos silvestres com potencial para a produção das enzimas lípases e tanase extracelulares. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

SILVA, F. P. Análises genômicas de três isolados do gênero *Stenotrophomonas* oriundos de vermicomposto. 2019, 78 f. Dissertação (Centro de Biociências e Biotecnologia) - Universidade Federal do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes /RJ, 2019.

SILVA, F. S., RODRIGUES, M. O., OLIVEIRA, R. C. D. Aplicação de aerogéis para remoção de pitch na indústria de celulose e papel. 2017.

SIRISHA, E.; RAJASEKAR, N.; NARASU, M. LAKSHMI. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in Biological Research*, v. 4, n. 5, p. 249-252, 2010.

SNELL-CASTRO, R.; GODON J. J.; DELGENÈS, J. P.; DABERT P.; Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, p. 229-242, 2005.

SOCCOL, C. R., DA COSTA, E. S. F., LETTI, L. A. J., KARP, S. G., WOICIECHOWSKI, A. L., DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research & Innovation*. V.1, n.1, p.20, 2017.

SOLEYMANI, S., ALIZADEH, H., MOHAMMADIAN, H., RABBANI, E., MOAZEN, F., SADEGHI, H. M., RABBANI, M. Efficient media for high lipase production: one variable at a time approach. *Avicenna journal of medical biotechnology*, v. 9, n. 2, p. 82, 2017.

SOUZA, B. S.; SANTOS, T. T. Endophytic fungi in economically important plants: ecological aspects, diversity and potential biotechnological applications. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.4, n.2, pp.113-126, 2017

SOUZA, M. C. M.; SANTOS, K. P., FREIRE, R. M., BARRETO, A. C. H., FECHINE, P. B. A., GONÇALVES, L. R. B. Production of flavor esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 34, n. 3, p. 681-690, 2017.

SPERB, J. G. C., COSTA, T. M., VAZ, D. A., VALLE, J. A. B., VALLE, R. D. C. S. C., TAVARES, L. B. B. Análise qualitativa da produção de lípases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. *Engevista*, v. 17, n. 3, 385-397, 2015.

ŠULCIENĖ, M., KOLVENBACH, B., AMMANN, E., MATIJOŠYTĖ, I. Towards an affordable enzymatic production of biopolyols–Comparing the immobilization of lipases by two optimized techniques. *International journal of biological macromolecules*, v. 116, p. 1049-1055, 2018.

TACIAS-PASCACIO, V. G., PEIRCE, S., TORRESTIANA-SANCHEZ, B., YATES, M., ROSALES-QUINTERO, A., VIRGEN-ORTÍZ, J. J., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. **RSC advances**, v. 6, n. 102, 2016.

TACIN, M. V.; MASSI, F. P.; FUNGARO, M. H. P.; TEIXEIRA, M. F. S.; PAULA, A. V.; CARVALHO SANTOS-EBINUMA. Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.17, p. 369-378, 2019.

TEIXEIRA, M. F. N., Produção de lipase por *Candida viswanathii*: otimização das condições de cultivo, purificação em sistema aquoso bifásico e propriedades bioquímicas. Dissertação apresentada ao Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFT, Palmas – TO, 2017.

TEIXEIRA, N.; MELO, J. C.; BATISTA, L. F.; PAULA-SOUZA, J.; FRONZA, P.; BRANDÃO, M. G. Edible fruits from Brazilian biodiversity: A review on their sensorial characteristics versus bioactivity as tool to select research. **Food Research International**, v. 119, p.325-348, 2019.

THAPA, S.; PRASANNA, R.; RANJAN, K.; VELMOUROUGANE, K.; RAMAKRISHNAN, B. Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. **Microbiology Research**, v. 204, p. 55–64, 2017.

TODERO, L. M., BASSI, J. J., LAGE, F. A., CORRADINI, M. C. C., BARBOZA, J. C., HIRATA, D. B., & MENDES, A. A. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 8, p. 1601-1613, 2015.

TSEGAYE, B., JAISWAL, S., & JAISWAL, A. K. Food Waste Biorefinery: Pathway towards Circular Bioeconomy. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1174, 2021.

ULLAH, S., MALOOK, I., BASHAR, K. U., RIAZ, M., ASLAM, M. M., REHMAN, Z. U. JAMIL, M Purification and application of lipases from *Pseudomonas* species. **Biological Sciences-PJSIR**, v. 59, n. 2, p. 111-116, 2016.

VADGAMA, RAJESHKUMAR N.; ODANETH, ANNAMMA A.; LALI, ARVIND M. Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part I: Batch optimization studies. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 133-137, 2015.

VAISALI, C., CHARANYAA, S., BELUR, P. D., REGUPATHI, I. Refining of edible oils: a critical appraisal of current and potential technologies. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 13-23, 2014.

VALE, S. C. S.; GUIMARÃES, A. P. M.; MORAIS, P. B. Ocorrência e potencial biotecnológico de leveduras associadas aos frutos de *Attalea speciosa* Mart ex Spreng. **J. of Bioenergy and Food Science**, v. 2, p. 213-225, 2015.

VERMA, Swati; MEGHWANSHI, Gautam Kumar; KUMAR, Rajender. Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. **Biochimie**, 2021.

VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J., HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, v. 9, p, 113-148, 2000.

WANDERLEY, M. D., NEVES, E., ANDRADE, C. J. D. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista Citino**, p. 44-50, 2011.

WANG X, HARUTA S, WANG P, ISHII M, IGARASHI Y, CUI Z. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. **FEMS Microbiol Ecol**. v. 57, n. 1, p. 106-15, 2006. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00099.x.

YAACOB, N., AHMAD KAMARUDIN, N. H., LEOW, A. T. C., SALLEH, A. B., RAJA ABD RAHMAN, R. N. Z., MOHAMAD ALI, M. S. The role of solvent-accessible Leu-208 of cold-active *Pseudomonas fluorescens* strain AMS8 lipase in interfacial activation, substrate accessibility and low-molecular weight esterification in the presence of toluene. **Molecules**, v. 22 n. 8, p. 1312, 2017.

ZAITSEV, S. Y.; SAVINA, A. A.; ZAITSEV, I. S. Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology. *Advances in colloid and interface science*, v. 272, 2019.

ZANINETTI, R. A. Caracterização do óleo de frutos de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) para produção de biodiesel. 2009. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agranomia) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

**ANEXO**  
**CURVA DE CALIBRAÇÃO p – NITROFENOL (pNP)**

Preparo da solução de pNP 0,1 mg/ml em água destilada.

$$\text{Concentração da pNP (mg/ml)} = \frac{\text{massa pNP (mg)}}{\text{volume (ml)}}$$

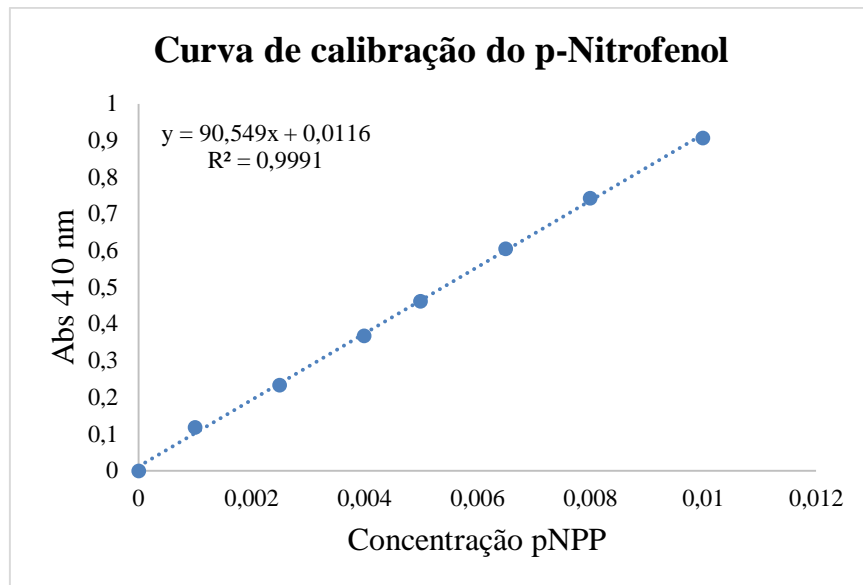
Tubos	pNP (vol mL)	H <sub>2</sub> O vol - ml	Tetraborato de Sódio vol – ml	[pNP] (mg/ml)	Abs 410 nm	Abs 410 nm	Média Abs 410
0	0,00	1,00	1,00	0	0	0	0
1	0.02	0.98	1,00	0.001	0,117	0,120	0,119
2	0.05	0.95	1,00	0.0025	0,237	0,230	0,234
3	0.08	0.92	1,00	0.004	0,349	0,389	0,369
4	0.10	0.90	1,00	0.005	0,449	0,478	0,464
5	0.13	0.87	1,00	0.0065	0,600	0,612	0,606
6	0.16	0.84	1,00	0.008	0,738	0,751	0,745
7	0.20	0.80	1,00	0.01	0,907	0,910	0,909

Cálculo da concentração final de p-NP (mg/ml):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$0,1 \text{ mg/ml} \cdot 0,020 \text{ ml} = C_2 \cdot 2,000 \text{ ml}$$

$$C_2 = \frac{0,1 \text{ mg/ml} \cdot 0,020 \text{ ml}}{2,00} = 0,001 \text{ mg/ml}$$



**Cálculo do Coeficiente de Extinção Molar:**

$$\epsilon = a \cdot b \cdot c$$

a – coeficiente angular da reta

b – caminho óptico (cm)

c – concentração molar da xilos

$$\epsilon = 90,549 \cdot 1 \cdot 139,11$$

$$\epsilon = 12596,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$