

Artigo

Caracterização Química e Físico-Química do Óleo de Faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus*) – Uso na Determinação da Atividade Enzimática do Extrato do Fungo *Rhizopus sp.*

Moura, C. V. R.*; Neres, H. L. S.; Moura, E. M.; Muratoric, M. C. S.; Coelho, T. L. S.; Melo, I. E. M. S.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (5), 00-00. Data de publicação na Web: 18 de Agosto de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>

Chemical and Physicochemical Characterization of Faveleria (*Cnidoscopus phyllacanthus*) Oil – It Use of Determination of Enzymatic Activity of Extract of Fungi *rhizopus sp.*

Abstract: This work has as a main goal to characterize chemical and physicochemical the oil from Faveleira seeds (*Cnidoscopus phyllacanthus*), in addition to obtaining an enzymatic extract from fungi *Rhizopus sp.* (IOC 2291) in peptonated means and evaluate its activity in triacylglycerols of the extracted oil. The Faveleira seeds showed a high oil content (33.73 %), which characterizes this plant species as a typical oleaginous. The fungus *Rhizopus sp.* was used in fermentative process in liquid substrate peptonated and its growth activity and release of metabolites was checked through pH measurements and mycelial mass formation. The extract filtered after fermentation was lyophilized and characterized by Spectroscopy Infrared and High-Performance Liquid Chromatography for the lipase identification. The morphology of the compound was determined by X-ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy. The catalytic power of extract was tested in Faveleira oil, presenting activity 277.49 U g⁻¹ greater than the value found for conventional substrates such as olive oil (220.41 U g⁻¹).

Keywords: Faveleira; Faveleira Oil, Lipase; fungi, *Rhizopus sp.*

Resumo

Este trabalho tem como objetivo principal a caracterização química e físico-química do óleo de sementes de Faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus*), obtenção do extrato originário do fungo *Rhizopus sp.* (IOC 2291) em meios peptonados e avaliação da atividade enzimática usando o óleo extraído. As sementes de Faveleira apresentaram elevado teor de óleo (33,73 %), o que caracteriza esta espécie vegetal como uma oleaginosa típica, possibilitando sua exploração como biomassa em diversos setores industriais. O fungo *Rhizopus sp.* foi utilizado no processo fermentativo em substrato líquido peptonado e sua atividade de crescimento e liberação de metabólitos foi verificada através de medidas de pH e formação de massa micelial. O extrato filtrado após a fermentação foi liofilizado e caracterizado por espectroscopia de infravermelho e cromatografia líquida de alta eficiência para identificação da enzima (lipase). A morfologia do composto foi determinada por Difraccção de raios X e Microscopia Electrónica de Varrimento. O poder catalítico do extrato foi testado em óleo de Faveleira, apresentando atividade 277,49 U g⁻¹ maior que o valor encontrado para substratos convencionais, como o azeite de oliva (220,41 U g⁻¹).

Palavras-chave: Faveleira; Óleo de Faveleira Oil, Lipase; Fungo, *Rhizopus sp.*

* Universidade Federal do Piauí, Departamento de Química, CEP 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

 carla@ufpi.edu.br
DOI: [10.21577/1984-6835.20200103](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200103)

Caracterização Química e Físico-Química do Óleo de Faveleira (*Cnidosculus phyllacanthus*) – Uso na Determinação da Atividade Enzimática do Extrato do Fungo *Rhizopus sp.*

Carla Verônica Rodarte de Moura^{a,*} , Haroldo Luis Sousa Neres^{a,b}, Edmilson Miranda de Moura^a, Maria Christina Sanches Muratori^c, Tiago Linus Silva Coelho^a, Itaciara Erliny Maria da Silva Melo^a

^a Universidade Federal do Piauí, Departamento de Química, CEP 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

^b Instituto Federal do Piauí, Departamento de Química, CEP 64210-260, Parnaíba-PI, Brasil.

*carla@ufpi.edu.br

Recebido em 30 de Setembro de 2019. Aceito para publicação em 29 de Julho de 2020.

1. Introdução

2. Parte Experimental

- 2.1. Reagentes
- 2.2. Equipamentos e medidas
- 2.3. Composição centesimal das sementes de Faveleira
- 2.4. Extração e degomagem do óleo de Faveleira
- 2.5. Composição química do óleo de Faveleira
- 2.6. Obtenção do extrato enzimático do fungo *Rhizopus sp*
- 2.7. Caracterização espectroscópica do extrato enzimático
- 2.8. Determinação da atividade enzimática

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Composição e propriedades química das sementes e do óleo de Faveleira
- 3.2. Caracterização espectroscópica e térmica do óleo de Faveleira
- 3.3. Caracterização do extrato enzimático do fungo *Rhizopus sp*
- 3.4. Atividade enzimática

4. Conclusão

1. Introdução

Os óleos vegetais são predominantemente compostos por moléculas de triacilgliceróis e pequenas concentrações de diacilgliceróis e monoacilgliceróis. Portanto, eles são insolúveis

em água e possuem alta solubilidade em solventes orgânicos apolares.^{1,2} Os triacilgliceróis são formados por moléculas de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol. ^{1,2}

O Brasil, devido a sua grande extensão territorial e excelentes condições climáticas, é um dos poucos países com amplo potencial para

explorar diversos óleos vegetais como matéria prima para várias aplicações.^{3,4} A principal fonte de óleo vegetal no Brasil é a soja, seguida pelo algodão, óleo de palma e girassol. Apesar dessa grande variedade de fontes de óleos vegetais que o Brasil possui, ainda assim é importante pesquisar novas fontes alternativas para o uso em alimentação, além de outros usos industriais, pois a demanda do mercado é crescente.^{5,6}

Cnidioscolus quercifolius (sin. *C. phyllacanthus*, formerly known as *Jatropha phyllacantha* Müll. Arg.),^{7,8} popularmente chamada de Favela, Faveleira, Favelerio ou mandioca brava,^{7,8} é uma planta da família das euforbiáceas (*euphorbiaceae*). É um arbusto dotado de espinhos e flores brancas, dispostos em cúpulas. O fruto é uma cápsula contendo as sementes oleaginosas,^{7,8} como sementes de fava, por isso os nomes “favela”, “faveleiro” e “Faveleira”. Ela é endêmica no Brasil, sendo distribuída entre os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Bahia, Pernambuco, Piauí e São Paulo. A região de Paulistana-Piauí apresenta uma grande concentração de árvores de Faveleira, distribuídas pelo seu território e com morfologia similar. O uso da Faveleira ainda é restrito e artesanal, sendo usado principalmente na alimentação animal e na extração bruta do óleo para alimentação humana.^{8,9} As sementes de Faveleira apresentam cerca de 35% de óleo por semente, classificando-o como um óleo que pode ser usado para vários fins industriais, tais como, produtos de limpeza, cosméticos, tintas, vernizes, medicina, plásticos e lubrificantes, reduzindo assim, a dependência de outras fontes oleaginosas e permitindo o desenvolvimento de regiões que cultivam a Faveleria.^{10,11,12} Além da alta concentração de óleo, as sementes da Faveleira apresentam um significativo conteúdo de proteínas e carboidratos, que podem ser usados na dieta humana, desde que seja comprovada a ausência de substâncias tóxicas ou alergênicas.

Um dos maiores desafios atualmente enfrentados pelas pesquisas acadêmicas e industriais é o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam o uso da biomassa como matéria-prima renovável para a produção de bens de qualquer tipo.¹³⁻¹⁵ A biocatálise é mais ecológica do que outros processos industriais, pois reúne os princípios da química verde, segurança, economia de átomos, prevenção de resíduos e eficiência energética. Nesse cenário, a avaliação da atividade catalítica de lipases e seus substratos

de reação tem sido de grande importância para o campo científico-tecnológico.¹⁶⁻¹⁸

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases) são enzimas que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras de cadeia longa, produzindo compostos como ácidos graxos livres e glicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol.⁷⁻⁹ As lipases podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas.¹⁴ Em comparação com plantas e animais, verificou-se que os microrganismos produzem altos rendimentos de lipases, de modo que a maioria das enzimas industriais é de origem microbiana. *Rhizopus* é um gênero de fungos amplamente utilizado em processos biotecnológicos para produzir substâncias valiosas, como ácido fumárico e ácido láctico.^{14,18} Portanto, o papel dos fungos nos processos fermentativos de obtenção de extratos enzimáticos tem sido bem documentado e a demanda industrial por novas fontes de lipase continua estimulando o isolamento e a triagem de novos microrganismos lipolíticos.^{19,20}

Um grande número de métodos foi estabelecido para determinar a atividade lipolítica de um determinado extrato enzimático, compreendendo principalmente três tipos de ensaio: (a) quantificação dos ácidos graxos liberados por métodos titulométricos; (b) detecção de alterações por métodos condutométricos, turbidimétricos, densiométricos ou microscópicos das propriedades biofísicas dos substratos durante a lipólise; e (c) aplicação de métodos fotométricos para determinação de cor liberada de produtos fluorescentes.²¹

Em geral, os substratos mais comuns estudados são o azeite de oliva e o óleo de soja.²² O método titulométrico de atividade enzimática tem sido utilizado para *Rhizopus Chinensis*, *Apergillus niger*, *Cândida viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus miehei* e *Rhizopus sp.*^{21,22}

O azeite de oliva é o substrato mais utilizado para medir atividade enzimática via titrimétrica. No entanto, as lipases possuem especificidade de substrato. A lipolase decompõe os lipídios apolares seletivamente.²³ As lipases de *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus tosse*, *Geotrichum candidum* e *Candida lypolytica* são relatadas como fortemente específicas para os ésteres de cadeia curta.²⁴ A lipase de *Rhizopus chinensis* é específica para ácidos graxos e ésteres metílicos.^{25,26}

O uso do azeite de oliva para medir atividade enzimática das diferentes lipases, pode levar a um resultado não verdadeiro. Embora outros substratos

devam ser escolhidos, o ensaio titulométrico é uma maneira simples de determinar atividade enzimática para lipases. Portanto, o estudo de substratos mais adequados para cada tipo de lipase é claramente necessário.

O método titulométrico é um método fácil de determinar a atividade enzimática da lipase. Durante a hidrólise do óleo catalisado por lipase, os ácidos graxos livres são liberados para o meio de reação, diminuindo o pH. Quanto maior a quantidade de ácido graxo livre liberada, mais ativa é a lipase. A quantidade de ácidos graxos livres pode ser quantificada por uma simples titulação ácido-base. Esse método tem sido utilizado para *Rhizopus Chinensis*, *Apergillus niger*, *Cândida viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus miehei* e *Rhizopus sp. e lipases*.^{21,22}, tendo as enzimas uma especificidade de substrato. A lipolase decompõe os lipídios não polares seletivamente.²³

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a extração de óleo de sementes de Favela, sua composição química, propriedades físico-químicas e o uso do óleo na determinação da atividade enzimática do extrato do fungo *Rhizopus sp.*

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico e foram usados sem prévio tratamento.

2.2. Equipamentos e medidas

As caracterizações físico-químicas foram realizadas utilizando um densímetro Anton Paar DMA 4500 automático para determinação da densidade a 25° C, e um viscosímetro Quimis para determinação da viscosidade a 40° C. A acidez, peróxido, saponificação e teor de iodo foram determinados por métodos oficiais descritos pelos números da American Oil Chemical Society (AOCS), Cd 3D-63, Cd 8-53, Cd 8B-90 e Tg 1-64, respectivamente.²⁷

Os espectros de FTIR foram adquiridos utilizando um espectrômetro com transformada de Fourier da marca Perkin Elmer Spectrum 100, ajustado para medir 32 varreduras cumulativas a 4 cm⁻¹ numa região de frequência de 4000 a 400 cm⁻¹. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr.

As análises de Ressonância Magnética Nuclear ¹H RMN foram realizadas em um equipamento da marca Bruker AVANCE DPX 400, utilizando CDCl₃ como solvente.

As medidas termogravimétricas (TG) foram realizadas em um equipamento TG-DTG, Shimadzu, modelo DTG-60TA. Os experimentos foram conduzidos na faixa de temperatura de 30 a 500°C, utilizando cadinho de alumínio de 0,5 mm de diâmetro com aproximadamente 15 mg de amostra, com taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ e sob atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹). As condições do equipamento foram verificadas com uma referência padrão de CaC₂O₄.H₂O. As curvas TG/DTG foram obtidas sob as mesmas condições experimentais para a correção da linha de base. A perda de peso da amostra foi determinada como a diferença entre a perda de peso inicial e final.

As análises de DSC foram realizadas em equipamento Shimadzu DSC 2920 na faixa de temperatura de 30 a 500°C, utilizando cadinho de Al fechado com cerca de 3,0 mg de amostra, aquecimento de 10°C min⁻¹ e sob atmosfera de nitrogênio (80 mL min⁻¹). O equipamento foi verificado com índio e zinco.

2.3. Composição centesimal das sementes de Faveleira

As sementes de Faveleira foram coletadas em uma área rural de Paulistana-Piauí, região do sertão nordestino do Brasil. Os grãos posteriormente foram lavados e secos em estufa por 60°C durante 24 h. Em seguida as sementes foram trituradas e realizada a determinação da composição centesimal (teor de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas) de acordo com os métodos descritos na Association of Official Analytical Chemists: 31.1.02 (AOAC), 31.1.04 (AOAC), 31.4.02 (AOAC), 31.1.08 (AOAC).²⁸ O teor de carboidratos totais foi calculado por diferença de 100%.

2.4. Extração e degomagem do óleo de Faveleira

As sementes de Faveleira foram trituradas em liquidificador e o óleo foi extraído com hexano em extrator Soxhlet por 18 h. O solvente foi removido em evaporador rotatório a 60°C. Na prática, o processo foi executado várias vezes até obter 2 L de óleo. O óleo bruto foi pré-aquecido a 60°C e depois agitado com 0,1% (em peso) de ácido fosfórico durante 15 min, então NaOH

(8% em peso), suficiente para neutralizar entre 70-90% do ácido adicionado, e 2% em peso de água foram adicionados. A mistura foi aquecida (60°C) e agitada durante 1 h. Em seguida, foi arrefecida até à temperatura ambiente e a goma foi separada da solução por centrifugação. Este procedimento foi repetido usando 3% em peso de água para remover as gomas remanescentes. O óleo foi filtrado em filtro de papel contendo sulfato de sódio anidro para secagem total do óleo.²⁹

2.5. Composição química do óleo de Faveleira

A composição química do óleo foi determinada seguindo a metodologia descrita por Araújo *et al.*²⁸ 100 mg de óleo de Faveleira foi pesado e transferido para um tubo de centrífuga de 20 mL. Uma solução metanólica de KOH (2,0 mol L⁻¹) foi adicionada (0,2 mL) antes da vedação do tubo e misturada vigorosamente por 20 min em um agitador de vortex. 2 mL de uma solução saturada de NaCl foi adicionada e a fase orgânica foi extraída. Uma alíquota (1,0-2,0 µL) da solução de hexano foi analisada em um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu GC17A com um detector de massa (GC-MS) QP5000. Os parâmetros instrumentais e condições experimentais utilizados para a análise foram: Coluna capilar: SP 2560, Supelco, 5% fenilmetilpolissiloxano DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm espessura do filme, gás transportador: hélio (1,7 mL min⁻¹); fluxo 0,6 mL min⁻¹, tempo de aquisição de 42,5 min e corte de solvente em 4 min, faixa de massa de 40 a 400, energia eletrônica de 70 eV, tensão multiplicadora de 1,3 kV, analisador quadrupolo, temperatura do injetor (230°C), temperatura da interface (150°C/2 min) e temperaturas da coluna (150-230°C a 5°C min⁻¹, 230°C/7 min, 230-260°C a 4°C min⁻¹ e 260°C/10 min).

2.6. Obtenção do extrato enzimático do fungo *Rhizopus sp*

As cepas do fungo *Rhizopus sp.* foram fornecidas pelo Instituto Oswaldo Cruz e mantidas sob refrigeração em tubos contendo 5 mL de ágar batata-dextrose. A fermentação do estado líquido foi realizada extraindo os esporos pela adição de 2 mL de água autoclavada no tubo de ensaio antes da agitação em um agitador vortex. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução de caldo de peptona em água. Subsequentemente, o tubo foi agitado num agitador orbital a 125 rpm a

30°C durante 4 dias. O caldo de fermentação foi filtrado e liofilizado antes de ser caracterizado. O caldo de peptona foi preparado em 500 mL de água contendo 25 g de peptona bacteriológica, 0,25 g de NaNO₃·7H₂O, 0,6 g de KH₂PO₄ e 0,25 g de MgSO₄·7H₂O e esterilizados em autoclave por 15 min. O extrato foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado no equipamento ModulyoD Greeze Dryer da Thermo Electron Corporation e armazenado a 4°C para uso posterior. A mudança de pH durante o processo de fermentação e a quantidade de massa micelial formada foram determinadas.

2.7. Caracterização espectroscópica do extrato enzimático

A lipase comercial do fungo *Rhizopus oryzae* (≥30 U mg⁻¹, Sigma Aldrich) foi usada para comparação com a lipase do fungo *Rhizopus sp* produzida neste trabalho. As análises de FTIR foram realizadas conforme descrito no item 2.2. acima. As análises de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) foram realizadas usando um cromatógrafo Agilent, modelo 1260, com detector de arranjo de diodos e uma coluna Superdex® 200. O modo isocrático foi utilizado por 55 min para análise cromatográfica durante todas os experimentos e utilizou-se 50 mM de tampão TRIS/HCl como fase móvel num pH 7.2. O fluxo foi de 0,5 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 50 µL e a detecção foi realizada a 280 nm. A coluna foi mantida a 25°C durante todo o experimento.

2.8. Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada pela mistura de 100 mg de extrato liofilizado, 1 g de óleo de Faveleira e 4 mL de tampão de fosfato de sódio (50 mM). A solução aquosa foi ajustada para pH = 6 por adição de KOH aquoso e mantida sob agitação contínua durante 60 min a 25° C. Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 15 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1 v/v) e a atividade foi medida por titulação dos ácidos graxos liberados com solução de KOH (50 mmol L⁻¹) até pH=11. Em seguida, titulou-se uma solução branca contendo o mesmo meio reacional sem o extrato enzimático para determinar a quantidade de ácidos graxos livres preexistentes no substrato utilizado. Uma unidade enzimática (U) é definida

como a quantidade da enzima que liberta 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições do ensaio. A atividade enzimática utilizando azeite de oliva como substrato foi determinada nas mesmas condições para efeito de comparação.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição e propriedades química das sementes e do óleo de Faveleira

A quantidade de óleo encontrada nas sementes de Faveleira estudadas nesse trabalho foi de 34% por semente. Esse resultado foi parecido como o encontrado por Cavalcante *et al.*¹¹ Esse resultado é bastante promissor, tornando as sementes úteis para aplicações futuras em indústrias farmacêuticas, cosméticas, de tintas, revestimentos, plásticos, lubrificantes ou biodiesel, reduzindo a dependência de outras fontes de óleo e possibilitando o

desenvolvimento de regiões que cultivam a planta.^{12,30}

Após a retirada do óleo, sobra-se a torta que é formada por 62% de resíduos sólidos (bagaço), que apresentam uma grande quantidade de proteínas e carboidratos, o que permite sua aplicação em processos fermentativos utilizando microrganismos para obtenção de extratos enzimáticos ou na alimentação animal. A Tabela 1 apresenta a composição centesimal das sementes de Faveleira.

A Figura 1 mostra o cromatograma da composição de ácidos graxos do óleo de Faveleira. Basicamente ele é composto pelos seguintes ácidos: ácido palmítico (19,83%), ácido linoléico (41,71%), ácido oléico (22,94%) e ácido esteárico (15,50%).

Este óleo possui ácidos predominantemente insaturados correspondendo a 64,65% (picos 2 e 3, ácido linoléico e ácido oléico, respectivamente), o que pode ter relevância médica ou industrial, pois a presença de ácidos insaturados determina excelentes propriedades físico-químicas e biológicas. Outro ponto a ser considerado é que

Tabela 1. Composição Centesimal das Sementes de Faveleira

Componente	Conteúdo (%)
Umidade	4.72 \pm 0.01
Lipídeos	33.73 \pm 0.27
Proteínas (N x 6.25)	22.14 \pm 0.17
Cinzas	3.81 \pm 0.03
Carboidratos	35.58

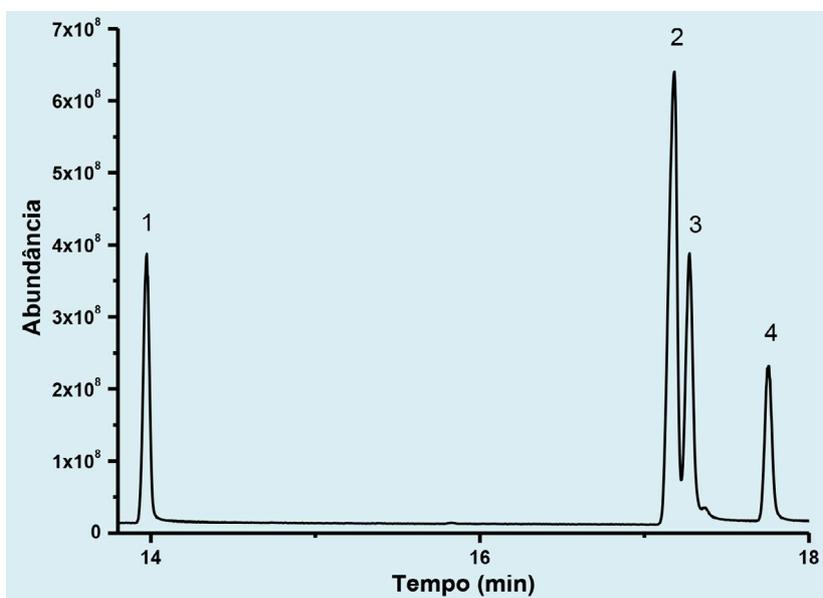


Figura 1. Cromatograma do Óleo de Faveleira. Picos: 1 (ácido palmítico), 2 (ácido linoléico), 3 (ácido oléico) e 4 (ácido esteárico)

a presença de ácidos insaturados derivados de óleos vegetais desempenha um papel importante na regulação de vários processos fisiológicos do corpo humano.

A qualidade dos óleos vegetais e sua aplicação nos processos industriais está totalmente ligada às suas propriedades físico-químicas, que são influenciadas pela sua composição química. Nas indústrias alimentícias, as propriedades dinâmicas dos fluidos, como viscosidade e densidade, são fundamentais e decisivas para sua aceitação no mercado consumidor e são importantes para a execução de projetos e processos de gerenciamento de equipamentos.¹²

Os dados da Tabela 2 mostram que os valores de viscosidade ($30,07 \pm 0,012 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$) e densidade ($0,9092 \pm 0,0003 \text{ g cm}^{-3}$) do óleo de Faveleria estão dentro da faixa de valores encontrados para outros óleos disponíveis no mercado, como óleo de soja, óleo de milho e óleo de algodão.^{31,32}

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulador brasileiro responsável pela aprovação e fiscalização da qualidade dos óleos vegetais produzidos, afirma que os limites máximos de acidez e peróxido são de 4,0 mg e 12,0 mEq Kg⁻¹, respectivamente.³³ Os valores encontrados para o óleo da Favela estão dentro dos parâmetros estabelecidos por esta agência.

O índice de iodo mede a quantidade de iodo em gramas que reage com 100 gramas de óleo e determina o grau de insaturação presente nos óleos vegetais, ou seja, quanto maior o número de ligações duplas ou triplas no triglicerídeo que estão presentes no óleo, maior o índice de iodo.³⁴

O índice de saponificação é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessários para saponificar 1 g de ácidos graxos sob certas condições,¹² e aponta o peso molecular dos ácidos formadores de triacilglicerol, ou seja, quanto maior o índice de saponificação,

menor o peso molecular do éster de ácido graxo em análise.^{12,35,36} O óleo da Faveleira apresentou índices de saponificação e de iodo de acordo com outros óleos vegetais.³⁶⁻³⁸ Portanto, as propriedades físico-químicas analisadas do óleo da Faveleira estão dentro dos limites estabelecidos pelo órgão regulador brasileiro.

3.2. Caracterização espectroscópica e térmica do óleo de Faveleira

Para que os óleos sejam usados e comercializados é necessário o controle de vários parâmetros, como a pureza, o processo de refinamento e o teor de água.

O espectro de infravermelho (Figura 2) do óleo de Faveleira apresenta bandas em 1745 cm⁻¹, 1237 cm⁻¹, 1163 cm⁻¹ e 1101 cm⁻¹, associadas a ligações de estiramento de C = O e C-O, relacionadas a triacilgliceróis.³⁸ Em 3018 cm⁻¹, observa-se o modo de estiramento da dupla ligação presente nos ácidos oléico e linoleico, e a faixa de estiramento em uma região de 2933-2848 cm⁻¹, atribuída às ligações simples presentes na cadeia carbônica dos triglicerídeos.³⁵ É possível verificar uma banda pequena na região de 3400 cm⁻¹ a qual foi atribuída ao estiramento da ligação O-H que pode estar associada a uma pequena quantidade de água absorvida.

O espectro de ¹H RMN (Figura 3) apresentou sinais bem definidos e representativos de triacilgliceróis. Os sinais a δ 0,88, δ 1,25, δ 1,61, δ 2,03, δ 2,30 e δ 2,76 foram atribuídos aos hidrogênios de metileno no final da cadeia de hidrocarbonetos, hidrogênios da cadeia metilénica, grupos β -carbonilmetileno, hidrogênios de alilmetileno, grupos carbonilo e metileno bis-alílico, respectivamente.

Os sinais em δ 4.16 e δ 4.28 correspondem a hidrogênios de metileno da parte glicérica do triglicerídeo, e um multiplete a δ 5.33 está relacionado a hidrogênios CH da cadeia de glicerol.²⁹

Tabela 2. Propriedades Físico-Químicas do Óleo de Faveleira

Propriedades	Medidas
Viscosidade at 40 °C (mm ² s ⁻¹)	30.07 ± 0.012
Densidade à 25 °C (g cm ⁻³)	0.9092 ± 0.0003
Índice de Aceidez (mg g ⁻¹)	0.48 ± 0.002
Índice de Peróxido (mEq Kg ⁻¹)	1.94 ± 0.125
Índice de Iodo (g 100g ⁻¹)	114.18 ± 0.421
Índice de Saponificação (mg g ⁻¹)	199.16 ± 0.362

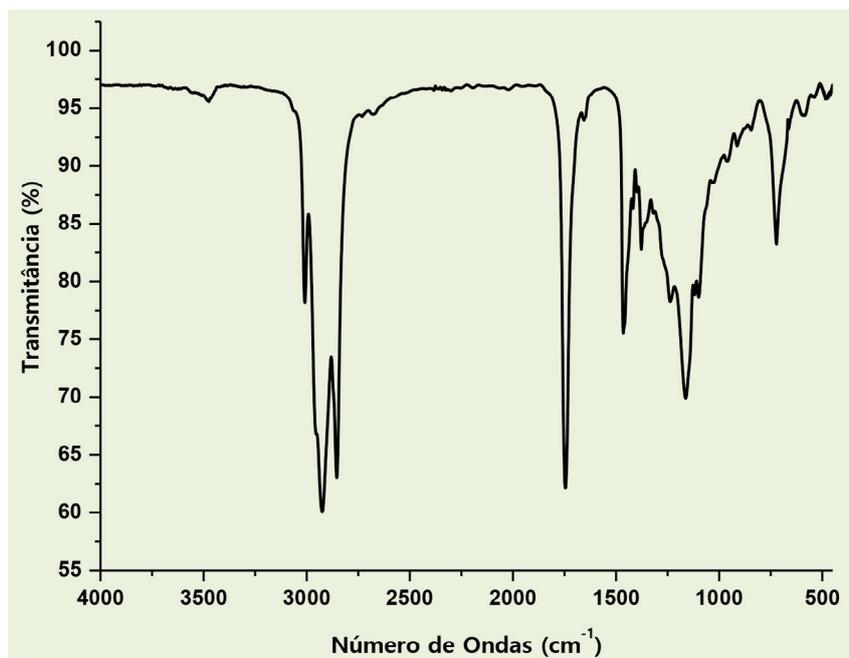


Figura 2. Espectro de Infravermelho do Óleo de Faveleria

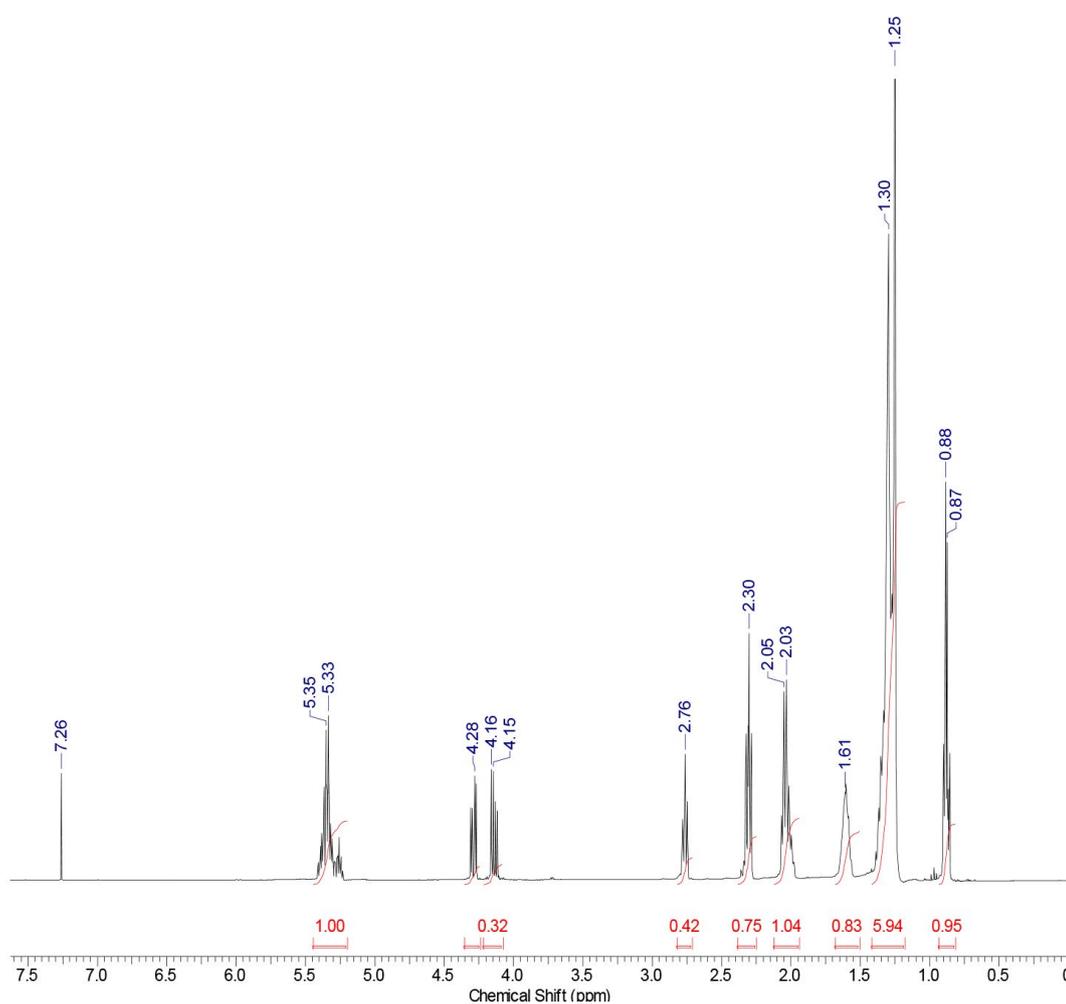


Figura 3. Espectro de ¹H NMR do Óleo de Faveleria

A estabilidade térmica do óleo é um fator determinante para os processos de conservação e para utilização em vários processos industriais. Esta estabilidade pode ser verificada por meio da técnica de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). As curvas TG/DTG e DSC (Figura 4) mostraram um evento de perda de massa única a 416°C, atribuído ao processo de decomposição dos triglicerídeos do óleo de Faveleria.^{30,36}

Este resultado demonstra que o óleo da Faveleira tem uma estabilidade térmica superior a outros óleos de espécies oleaginosas utilizadas em segmentos industriais, como soja, algodão e coco de babaçu.³⁹⁻⁴¹ A massa residual foi de apenas 1,2%, sugerindo que o processo de degomagem com $\text{O H}_3\text{PO}_4$ foi efetivo para remoção de gengivas e resíduos da amostra.

3.3. Caracterização do extrato enzimático do fungo *Rhizopus sp*

Levando-se em conta todas as propriedades estudadas para o óleo de Faveleira e a possível aplicabilidade inexplorada dele na indústria, a hidrólise da biomassa produzida a partir desta fonte, promovida por um extrato enzimático obtido do fungo *Rhizopus sp*, é bastante interessante e é explorado aqui.

A atividade do microrganismo sobre a peptona durante o processo de fermentação foi monitorada por pH a cada 24 h; houve consumo e liberação de diversas substâncias, incluindo lipases, que proporcionam alterações químicas no sistema.^{42,43} Diversos estudos para obtenção de lipases em substratos líquidos demonstraram aumento de pH durante o processo de fermentação.⁴⁴⁻⁴⁵ Figura 5 (a) mostra que a fermentação em meio peptonado

com o fungo *Rhizopus sp*. promoveu um aumento significativo no pH, indicando a alta atividade do microrganismo no ambiente e a possível formação de lipases. A atividade dos microrganismos também pode ser medida pela formação de massa micelial durante a fermentação em meio líquido, como mostra a Figura 5 (b).⁴⁵ Neste caso, houve a formação de 2,1 g de massa micelial por 100 mL do meio de fermentação usado. Isto sugere que o meio nutricional, permitiu o crescimento do fungo e conseqüentemente a formação de lipase.

Após o processo de fermentação, foi realizada uma filtração para remover a massa micelial e outros compostos indesejáveis principais. O objetivo da filtração foi obter proteínas que estavam dentro da faixa de tamanho permitida para as enzimas. Portanto, o filtrado foi liofilizado e caracterizado por Espectroscopia no Infravermelho (IR) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Enzimas são cadeias poliméricas compostas de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. As forças intermoleculares e intramoleculares, como ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, determinam a conformação e a estabilidade da estrutura molecular.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier da espécie comercial (*Rhizopus oryzae*) e da espécie sintetizada (*Rhizopus sp*) (Figura 6A) mostram bandas associadas a grupos amida (CONH), tipicamente observadas em proteínas. A banda de 1658 cm^{-1} está relacionada à vibração amida I e ao ácido carboxílico C=O. Ambos os materiais apresentam o estiramento da ligação C-H a 2936 cm^{-1} , mas com uma diminuição para o *Rhizopus sp*. As semelhanças dos espectros confirmam a síntese da lipase originária do *Rhizopus sp*. pelo método utilizado neste trabalho.⁴⁶

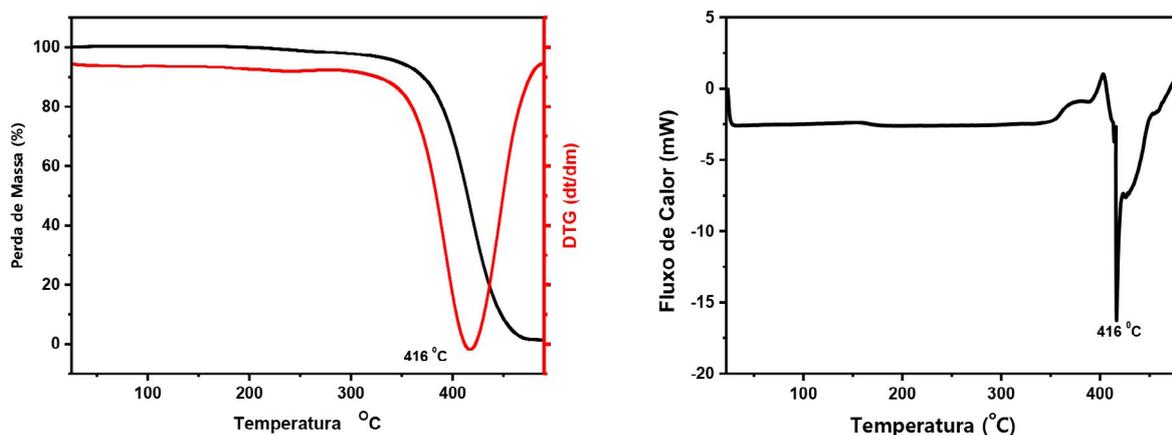


Figura 4. Curvas TG/DTG and DSC do Óleo de Faveleria

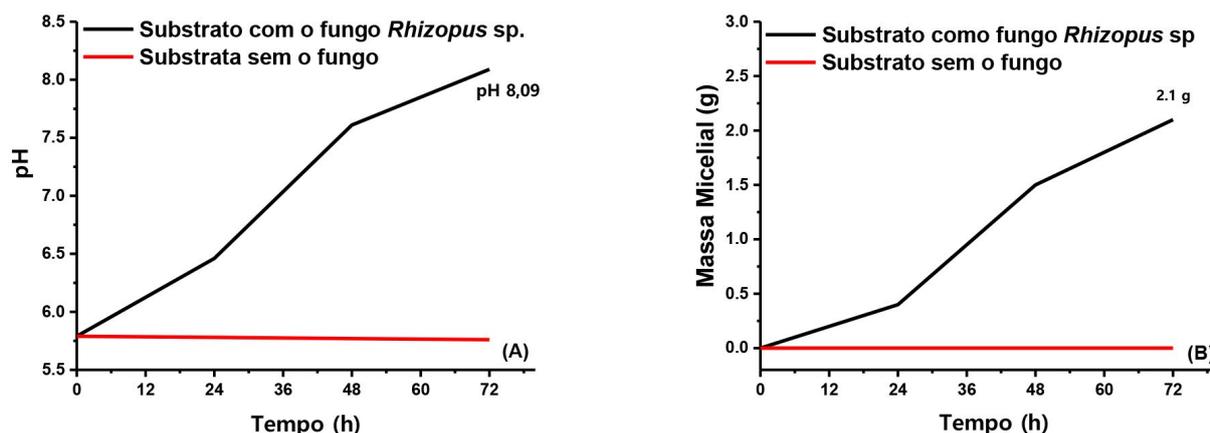


Figura 5. Variação de pH (A), crescimento da massa micelial durante o processo de fermentação com o fungo *Rhizopus sp* (B)

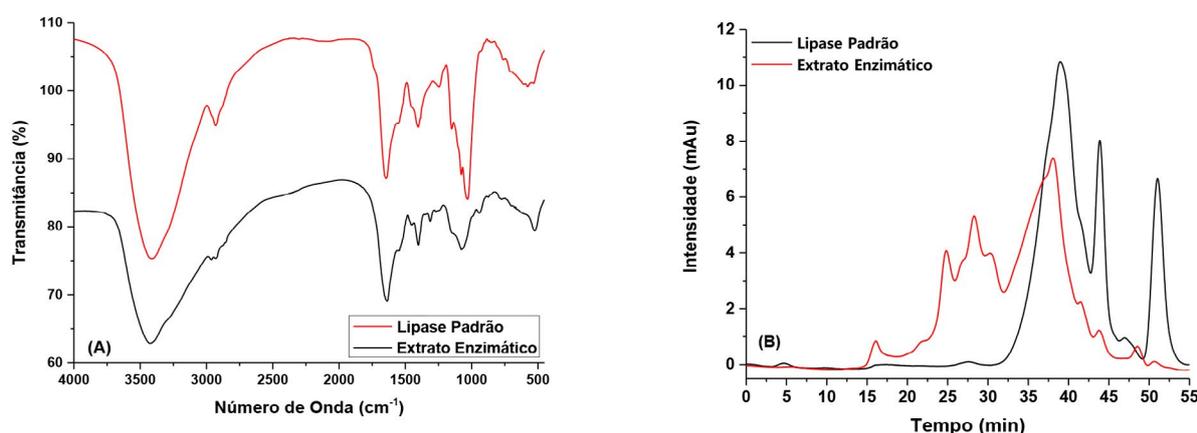


Figura 6. Espectro de Infravermelho (A) and Cromatograma de CLAE (B) do padrão de Lipase Comercial e do Extrato Enzimático do Fungo *Rhizopus sp*

O cromatograma de CLAE do extrato enzimático (Figura 6B) apresenta um pico amplo atribuído à lipase; esta informação foi verificada com uma inserção de um padrão externo no extrato e assegura que a lipase originária do fungo *Rhizopus sp.* lipase foi sintetizada.

O grau de cristalinidade e a morfologia do extrato enzimático liofilizado foram realizados por difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 7 mostra o difratograma do extrato enzimático, e o material é essencialmente amorfo, por apresentar picos largos, dispersos e poucos intensos.⁴⁷

A não-cristalinidade do material foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 8), pois as imagens demonstram um material não uniforme, ou seja, várias partículas com tamanhos diferentes.⁴⁸ Essa característica é importante porque a ausência de cristalinidade

tem relação direta com a obtenção. uma matriz completa e eficiente de proteção de compostos bioativos, além de ter uma maior solubilidade do que os compostos cristalinos.

3.4. Atividade enzimática

A identificação e quantificação da lipase foram feitas por titulação após a reação de hidrólise pela liberação de ácidos graxos.^{49,50} A unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto sob as condições do ensaio, de acordo com a Equação 1:

$$UA = \frac{(V_a - V_b) \times 1000 \times M_{NaOH}}{t_{(min)} \times m_{enzymatic\ extract}} \quad (1)$$

Onde:

V_a = volume de NaOH usado na titulação depois da reação de hidrólise

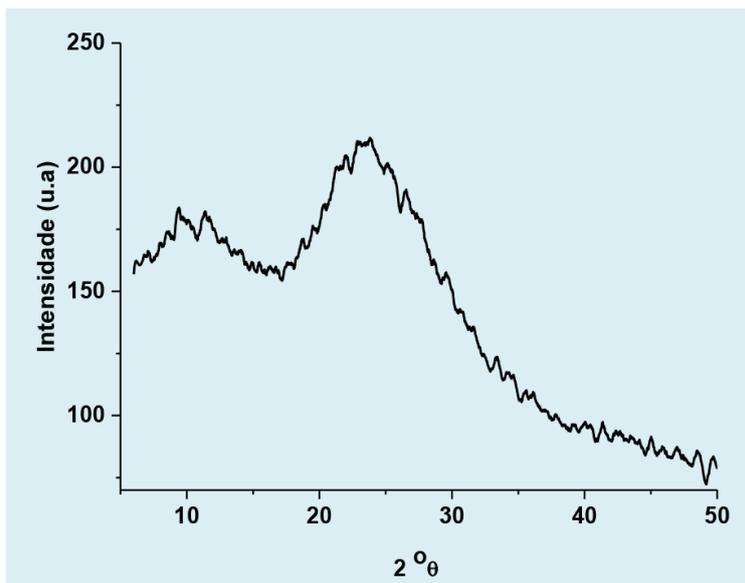


Figura 7. DRX do Extrato Enzimático do Fungo *Rhizopus sp* Liofilizado

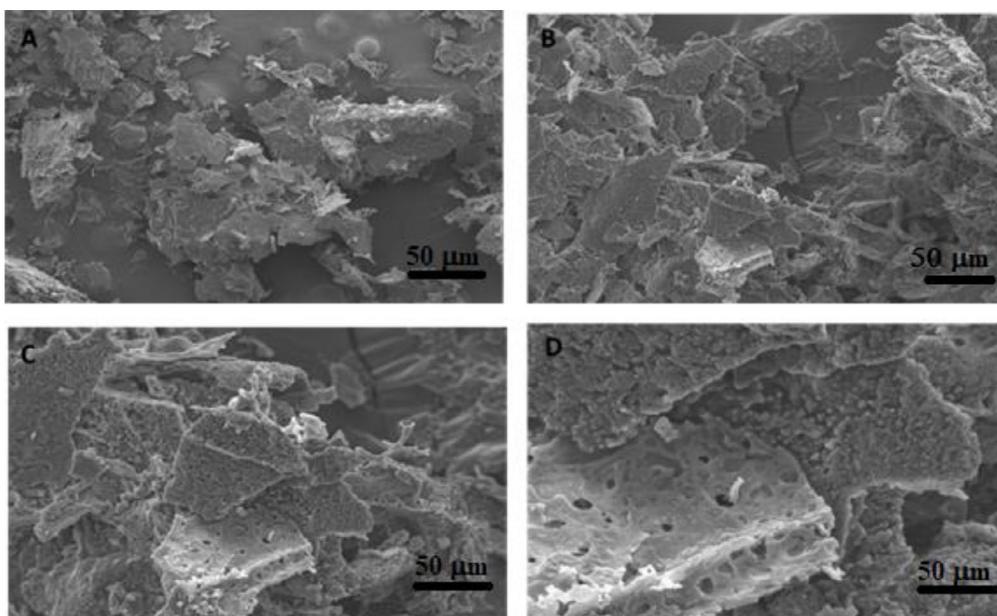


Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura do Extrato Enzimático do Fungo *Rhizopus sp* Liofilizado

V_b = volume da titulação sem a amostra (branco)
 M_{NaOH} = concentração molar da solução padrão de hidróxido de sódio

t = tempo de reação em minutos

m = massa em gramas do extrato enzimático

O método titulométrico, utilizando NaOH como titulante e fenolftaleína como indicador, é um método comum para medir a atividade enzimática de produtos liberados por hidrólise catalisada por lipase.⁵¹ Acredita-se que triacilglicerol trioleína de cadeia longa e azeite são os substratos ideais.⁵¹ Por outro lado, a especificidade do substrato das lipases pode

levar a um resultado inadequado, se o mesmo substrato for utilizado para o método volumétrico da atividade enzimática.

O triacilglicerol mais utilizado para a determinação da atividade enzimática é derivado do azeite de oliva; no entanto, a busca por novas alternativas para a determinação da atividade enzimática é necessária, pois proporciona maiores previsões para o desenvolvimento de enzimas e substratos analíticos. A atividade enzimática encontrada utilizando o óleo de Faveleira foi de $277,49 \pm 0,54 \text{ U g}^{-1}$, enquanto a atividade encontrada para o óleo de oliva foi de $220,41 \pm 0,90 \text{ U g}^{-1}$.

É relatado que a lipase de *Rhizopus oryzae* prefere a hidrólise de cadeias de ácidos graxos saturados (C18).^{30,52} Os resultados do óleo de Faveliera mostraram aproximadamente 65% de ácidos saturados, cujo ácido esteárico (C18) representa 15,50% da composição química, enquanto o azeite de oliva tem sido relatado como tendo quase 22% de ácidos graxos com cadeia saturada em sua composição química.⁵³

Este fato mostra que o óleo da Faveleira pode ser uma importante alternativa para utilização na determinação da atividade enzimática do fungo *Rhizopus sp.* Além disso, todos os resultados deste estudo demonstram que o óleo da Faveleira é uma excelente fonte alternativa não só para a determinação da atividade enzimática, mas também para seu uso em diversos setores da indústria devido às suas excelentes propriedades físico-químicas.

4. Conclusão

As sementes de Faveliera da região do interior do Piauí apresentam alto teor de óleo e excelentes propriedades físico-químicas, o que pode promover seu uso como biomassa em diversos segmentos industriais, por exemplo, em uma indústria de biodiesel.

A torta da Faveleira possui grande teor de proteínas e carboidratos e pode ser uma alternativa aos processos de fermentação em substratos sólidos de microrganismos. O óleo de favela é constituído essencialmente por ácidos graxos de cadeia longa (mais de 10 átomos de carbono), proporcionando seu uso como substrato para processos de determinação de atividade enzimática e reações de hidrólise para obtenção de biodiesel.

O processo de degomagem utilizado resultou em uma alta pureza do óleo, confirmada por Espectroscopia no Infravermelho e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, e a alta estabilidade térmica foi confirmada por Termogravimetria e Calorimetria. O processo de fermentação em substrato de fase peptona com fungo *Rhizopus sp.* resultou em mudanças significativas no pH e formação de massa micelial, determinando uma boa interação do fungo com o meio. A lipase do extrato enzimático liofilizado foi identificada por meio de Espectroscopia

Infravermelha e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A atividade enzimática do fungo *Rhizopus sp.* foi maior no óleo de Faveleira do que no azeite de oliva, que convencionalmente é utilizado como substrato, demonstrando que esse óleo é uma excelente fonte alternativa não só para a determinação da atividade enzimática, mas também para seu uso em diversos setores da indústria devido à sua excelente e propriedades químicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e à Fundação de Proteção à Pesquisa do Estado do Piauí Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelo apoio financeiro. Agradecemos também ao Laboratório de Biodiesel e Materiais (LBM) e ao Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), pelo fornecimento da estrutura que possibilitou esse trabalho, e ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) pelo fornecimento das linhagens fúngicas (IOC 2291).

Referências Bibliográficas

- ¹ Dupont, J.; *The Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2th ed., Academic Press: Maryland 2003.
- ² Baynes, J. A.; Dominiczak, M. H.; *Medical Biochemistry*, 5th ed., Elsevier: Canada 2018.
- ³ Froehner, S.; Leithold, J.; Lima, L. F.; Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade. *Química Nova* **2007**, *30*, 2016. [CrossRef]
- ⁴ Moura, C. V. R.; Neres, H. L. S.; Lima, M. G.; Moura, E. M.; Moita Neto, J. M.; Oliveira, J. E.; Lima, J. R. O., Sttolin, I. M.; Araujo, E. C. R.; *Cr/ Al Oxide as Solid Acid Catalyst to Afford Babassu Biodisel. Journal of the Brazilian Chemical Society* **2016**, *27*, 515. [CrossRef]
- ⁵ Conceição, M. M.; Candeia, R. A.; Dantas, H. J.; Soledade, L. E. B.; Fernandes, V. J.; Souza, A.
- ⁶ Rheological Behavior of Castor Oil Biodiesel, *Energy Fuels* **2005**, *19*, 2185. [CrossRef]
- ⁷ Brock, J.; Nogueira, M. R.; Zakrzewski, C.; Corazza, F. D.; Corazza, M. L.; Oliveira, J. V. Experimental measurements of viscosity and thermal conductivity of vegetable oils. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2008**, *28*, 564. [CrossRef]

- ⁸ National Research Council (U.S.); Committee on Managing Global Genetic Resources: Agricultural Imperatives, **1991**. The U.S. National Plant Germplasm System. National Academies Press. 139. ISBN-9780309043908.
- ⁹ Oliveira, M. D. M.; Bezerra, L. L.; Dantas, C. V. S.; Voight, E. L.; Maia, J. M.; Macedo, C. E. C., The role of xylopodium in Na⁺ exclusion and osmolyte accumulation in Faveleira [*Cnidoscolus phyllacanthus* (d. arg.) Pax et K. Hoffm] under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **2014**, *36*, 2871. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Laurêncio, A. M.; Sales, M. F.; O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **2008**, *22*, 806. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Souza, B. B.; Batista, N. L.; Oliveira, G. J. C.; Utilização da Faveleira (*cnidoscolus phyllacanthus*) como fonte de suplementação alimentar para caprinos e ovinos no semiárido brasileiro. *Agropecuária Científica no Seminário* **2012**, *8*, 1. [[Link](#)]
- ¹² Cavalcanti, M. T.; Bora, P. S.; Carvajali, J. C. L.; Propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da Faveleira (*Cnidoscolus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm.) com e sem espinhos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2009**, *29*, 597. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Lima, J. R. D.; Silva, R. B.; Santos, L. S. S.; Santos, J. R.; Moura, E. M.; Moura, C. V. R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. *Química Nova* **2007**, *30*, 600. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Bassegoda, A.; Cesarini, S.; Diaz, P.; Computer-Aided Protein Directed Evolution: A Review of Web Servers, Databases and other Computational Tools for Protein Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2012**, *2*, 1. [[CrossRef](#)]
- ¹⁵ Montiel, M. C.; Serrano, M.; Máximo, M. F.; Gómez, M.; Ortega-Requena, S.; Bastida, J.; Synthesis of cetyl ricinoleate catalyzed by immobilized Lipozyme® CalB lipase in a solvent-free system. *Catalysis Today* **2015**, *255*, 49. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ Su, F.; Li, G. L.; Fan, Y. L.; Yan, Y. J.; Enhancing biodiesel production via a synergic effect between immobilized *Rhizopus oryzae* lipase and Novozym 435. *Fuel Processing Technology* **2015**, *137*, 298. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Ramachandran, P.; Narayanan, G. K.; Gandhi, S.; Sethuraman, S.; Krishnan, U. M.; *Rhizopus oryzae* Lipase Immobilized on Hierarchical Mesoporous Silica Supports for Transesterification of Rice Bran Oil, *Applied Biochemistry Biotechnology* **2015**, *175*, 2332. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Huang, S.; Li, X.; Xu, L.; Ke, C.; Zhang, R.; Yan, Y.; Protein-Coated Microcrystals from *Candida rugosa* Lipase: Its Immobilization, Characterization, and Application in Resolution of Racemic Ibuprofen. *Applied Biochemistry Biotechnology* **2015**, *177*, 36. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Jain, D.; Mishra, S.; Multifunctional solvent stable *Bacillus* lipase mediated biotransformations in the context of food and fuel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2015**, *117*, 21. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Peil, G. H. S.; Kuss, A. V.; Rave, A. F. G.; Villarreal, J. P. V.; Yohana, M. L.; Nascente, H.; Nascente, P. S.; Bioprospecting of lipolytic microorganisms obtained from industrial effluents. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2016**, *88*, 1769. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Reinehra, C. O., Rizzardi, J., Silva, M. F., Oliveira, D., Treichel, H., Coll, L. M.; Produção de lipases de *Aspergillus niger* E *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação de alcoóis. *Química Nova*, **2014**, *37*, 454. [[CrsosRef](#)]
- ²² Pastore, G. M.; Costa, Santos, V. S. R.; Koblitz, M. G.; Production, partial purification and biochemical characterization of a novell *Rhizopus* sp. strain lipase, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2003**, *23*, 135. [[CrossRef](#)]
- ²³ Singh, A. K., Mukhopadhyay, M., Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2012**, *166*, 486. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Ali, S., Ren, S., Huang, Z., Extracellular lipase of an entomopathogenic fungus effecting larvae of a scale insect. *Journal of Basic Microbiology* **2014**, *54*, 1148. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Melis, S.; Pauly, A.; Delcour, J. A. Impact of lipases with different substrate specificity in wheat flour separation on the properties of the resultant gluten. *Journal of Cereal Science* **2017**, *77*, 291. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Song, X.; Qi, X.; Hao, B.; Qu, Y.; Studies of substrate specificities of lipases from different sources. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2008**, *110*, 1095. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Pogori, N.; XU, Y.; Cheikhoussef, A.; A. Potential aspects of lipases obtained from *Rhizopus* fungi. *Research Journal of Microbiology* **2007**, *2*, 101. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Official Methods and Recommended Practices of AOCS, 7th Edition, Urban, USA, 1992. [[Link](#)]
- ²⁹ Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists – Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, edited by Kenneth Helrich, 15th Edition, Virginia, USA, 1990. [[Link](#)]

- ³⁰ Araújo, F. D. S.; Araújo, I. C.; Costa, I. C. G.; Moura, C. V. R.; Chaves, M. H.; Araújo, E. C. E.; study of degumming process and evaluation of oxidative stability of methyl and ethyl biodiesel of *Jatropha curcas* L. oil from three different Brazilian states. *Renewable Energy* **2014**, *71*, 495. [CrossRef]
- ³¹ Cao, J.; Dang, G. H.; Li, H. F.; Li, T. T.; Yue, Z. G.; Li, N.; Liu, Y. J.; Liu, S. G.; Chen, L. P.; Identification and characterization of lipase activity and immunogenicity of lipL from *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos One* **2015**, *10*, e0138151. [CrossRef]
- ³² Brock, J.; Nogueira, M. R.; Zakrzewski, C.; Corazza, F. C.; Corazza, M. L.; Oliveira, J. V.; Experimental measurements of viscosity and thermal conductivity of vegetable oils. *Food Science Technology* **2008**, *28*, 564. [CrossRef]
- ³³ Diamante, L. M.; Lan, T.; Absolute Viscosities of Vegetable Oils at Different Temperatures and Shear Rate Range of 64.5 to 4835 s⁻¹. *Journal of Food Processing* **2014**, ID 234583. [CrossRef]
- ³⁴ Resolução RDC nº270, de 22 de setembro de **2005**, ANVISA. [Link]
- ³⁵ Muniz, M. A. P.; Santos, M. N. F.; Costa, C. E. F.; Morais, L.; Lamarao, M. L. N.; Ribeiro-Costa, R. M.; Silva, J. O. C.; Physicochemical characterization, fatty acid composition, and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK oil. *Pharmacognosy Magazine* **2015**, *11*, 147. [CrossRef]
- ³⁶ Araújo, F. D. S.; Moura, C. V. R.; Chaves, M. H.; Methyl biodiesel from *Dipteryx lacunifera*: preparation, characterization and effect of antioxidant on the oxidation stability. *Química Nova* **2010**, *33*, 1671. [CrossRef]
- ³⁷ Kobori, C. N.; Jorge, N.; Characterization of some seed oils of fruits for utilization of industrial residues, *Ciência e Agrotecnologia* **2005**, *29*, 1008. [CrossRef]
- ³⁸ Shimamoto, G. G.; Favaro, M. M. A.; Turbino, M.; Simple methods via Mid-IR or ¹H NMR spectroscopy for the determination of the iodine value of vegetable oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2015**, *26*, 1431. [CrossRef]
- ³⁹ Gomes, J. C.; Soares, L. F.; Pereira, C. A. S.; Jham, G. N.; Effects of paraquat on the quality of lipidic fraction of soybean. *Ciência e Agrotecnologia* **2003**, *27*, 178. [CrossRef]
- ⁴⁰ Lopes, W. A.; Fascio, M.; Flow chart for infrared spectra interpretation of organic compounds. *Química Nova* **2004**, *27*, 670. [CrossRef]
- ⁴¹ Santos, C. O.; Santos, I. M. G.; Souza, A. G.; Prasad, S.; Santos, A. V.; J. Thermal Stability and Kinetic Study on Thermal Decomposition of Commercial Edible Oils by Thermogravimetry. *Food Science* **2002**, *67*, 1393. [CrossRef]
- ⁴² Souza, A. G.; Danta, H. J.; Silva, M. C. D.; Santos, I. M. G.; Fernandes, V. J.; Sinfronio, F. S. M.; Teixeira, L. S. G.; Novak, C.; Thermal stability and kinetic study on thermal decomposition of commercial edible oils by thermogravimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. **2007**, *90*, 945. [CrossRef]
- ⁴³ Dar, G. H.; Kamili, A. N.; Nazir, R.; Bandh, S. A.; Jan, T. R.; Chishti, M. Z.; Enhanced production of α-amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial Pathogenesis* **2015**, *88*, 10. [CrossRef]
- ⁴⁴ Lima, B. F.; Amorim, H. S.; Nascimento, A. E.; Takaki, G. M. C.; Silva, C. A. A.; Selection of media of production lipase samples by *Aspergillus* sp. isolated from Caatinga in Pernambuco. *E-xacta* **2014**, *7*, 147. [CrossRef]
- ⁴⁵ Brozzoli, V.; Crognale, S.; Sampedro, I.; Federici, F.; D'Annibale, A.; Petruccioli, M.; Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technology* **2009**, *100*, 3395. [CrossRef]
- ⁴⁶ Papagianni, M.; An evaluation of the proteolytic and lipolytic potential of *Penicillium* spp. isolated from traditional greek sausages in submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2014**, *172*, 767. [CrossRef]
- ⁴⁷ Pereira, R. M.; Andrade, G. S.; Castro, H. F.; Campos, M. G. N.; Performance of Chitosan/ Glycerol Phosphate Hydrogel as a Support for Lipase Immobilization. *Materials Research*. **2017**, *20*, supl. 2. [CrossRef]
- ⁴⁸ Araujo, C. S. T.; Alves, V. N.; Rezende, H. C.; Almeida, I. L. S.; Assunção, R. M. N.; Tarley, C. R. T.; Segatelli, M. G.; Coelho, N. M. M.; Characterization and use of *Moringa oleifera* seeds as biosorbent for removing metal ions from aqueous effluents. *Water Science & Technology* **2010**, *62*, 2198. [CrossRef]
- ⁴⁹ Calliari, C. M.; Magnani, M.; Gomez, R. J. H. C.; Production, characterization and technological properties of biopolymer produced by *Agrobacterium radiobacter* k84. *Agrobacterium radiobacter* k84, *Semina: Ciências Agrárias* **2011**, *32*, 633. [CrossRef]
- ⁵⁰ 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* **2013**, *63*, 1225. [CrossRef]

⁵¹ Fendri, A.; Louati, H.; Sellami, M.; Gargouri, H.; Smichi, N.; Zarai, Z.; Aissa, I.; Miled, N.; Gargouri, Y.; A thermoactive uropygial esterase from chicken: purification, characterisation and synthesis of flavour esters. *International Journal of Biology* **2012**, *50*, 1238. [[CrossRef](#)]

⁵² Stoytcheva, M.; Montero, G.; Zlatev, R.; Leon, J. A.; Gochev, V.; Analytical methods for lipases activity determination: A review. *Current Analytical Chemistry* **2012**, *8*, 400. [[CrossRef](#)]

⁵³ Hiol, A.; Jonzo, M. D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; ClaudeComeau, L.; Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, *36*, 4221. [[CrossRef](#)]

⁵⁴ Tekaya, M.; El-Gharbi, S.; Chehab, H., MohamedHammami, F.; Mechri, B.; Long-term field evaluation of the changes in fruit and olive oil chemical compositions after agronomic application of olive mill wastewater with rock phosphate. *Food Chemistry* **2018**, *239*, 664. [[CrossRef](#)]