

***Cereus Jamacaru* COMO SUBSTRATO DE BAIXO CUSTO PARA PRODUÇÃO DE LIPASE PELO FUNGO *Aspergillus niger* (ATCC 1004)¹**

Romário Alves Santana²
Dhiéssica dos Santos Ribeiro³
Vanessa Neres Santana⁴
Baraquizio Braga do Nascimento Junior⁵

Resumo

Cereus jamacaru é uma cactácea popularmente conhecida com "Mandacaru" no Brasil e presente em todo continente americano. No presente trabalho foi avaliada a atividade enzimática do extrato da planta in natura, seca e fermentada através da fermentação no estado sólido (FES) com fungo *Aspergillus niger* ATCC 1004. Foi utilizado a metodologia de superfície de resposta e o planejamento Doehlert, variando o tempo (h), temperatura (°C) e umidade (%). O extrato do substrato in natura apresentou uma atividade enzimática de lipase de (23.03± 0.001 UA) e seco (15.03 ± 0.002). De acordo com os dados obtidos na otimização, os resultados da tabela ANOVA indica que há uma boa concordância entre a resposta prevista e os valores experimentais estudados para cada variável. O R² foi de 0,94, mostrando que 94% dos resultados experimentais podem ser explicados pelo planejamento adotado. Tempos de fermentações superiores a 100 h e inferiores a 90 h, temperaturas maiores que 35°C e menores

1 Projeto de pesquisa de Pós - Graduação (Mestrado) - Capes

2 Mestrando de Química da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia - UESB.
E-mail: romario13mv@hotmail.com;

3 Mestrando de Química da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia - UESB.
E-mail: dhiessicaquimica@gmail.com;

4 Mestrando de Química da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia - UESB.
E-mail: nsnessa@hotmail.com;

5 Docente do Programa de Pós – Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB.
E-mail: baraquizio@gmail.com;

que 30°C e umidades superiores a 70% e inferiores a 60% diminuem a produção de lipase produzida por *Aspergillus niger* ATCC 1004. De acordo com os resultados obtidos é possível verificar que após a fermentação a atividade da enzima lipase aumentou, podendo ser uma fonte de estudos para produção de produtos com alto valor agregados.

Palavras-chave: Cactácea, In natura, Seco, Fermentação sólida, Otimização.

Introdução

As enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica e permitem que inúmeras reações químicas ocorram em condições suaves, quando comparado aos processos químicos tradicionais (PENHA et al, 2016).

As lipases (triacilglicerol-acil hidrolases, EC3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas consideradas de grande potencial como biocatalisadores em numerosos processos industriais, graças à sua capacidade de catalisar diferentes reações como a síntese de ingredientes alimentícios, detergentes, cosméticos, a obtenção de drogas enantiopuras e outros produtos refinados (NEETHU et al, 2015; LIU et al, 2009; SONG et al 20116; YAN et al, 2014). Além disso, deve-se considerar que as lipases toleram um grande número de substratos naturais e não necessitam de cofatores (SIÓDMIK et al, 2012). Assim, parece óbvio que uso dessa enzima como biocatalisador para a indústria aumentará continuamente (LIU et al, 2009; D'ANNIBALE et al, 2006).

Embora se saiba que as lipases possam ser obtidas de diferentes fontes, incluindo animais, vegetais e micróbios, as que são originárias de microorganismos são preferíveis para aplicações industriais devido ao menor tempo de produção em relação as demais, são mais estáveis e ativas na presença de solventes orgânicos, mantêm sua atividades mesmo em condições extremas de temperatura e pH (GEOFFRY & ACHUR, 2018; THAKUR, 2012; DRIOUCH et al, 2011). Em literatura recente relatada, cerca de 90% das lipases produzidas foram obtidas de fontes microbianas (COSTA et al, 2017; SETH et al, 2014; SALIHU et al, 2012; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012). Entre os fungos, o gênero *Aspergillus* destaca-se na produção por sua robustez, sendo conhecido como um dos melhores produtores de enzimas extracelulares (TANI et al, 2014).

A fermentação em estado sólido (SSF) se refere ao cultivo de microorganismo sob ou dentro de partículas sólidas, sem apresentar o excesso de água livre. Esse processo tem demonstrado ser bem adequada para a produção de enzimas, especialmente por fungos filamentosos, pois serve como um meio rico para esses microorganismos crescerem semelhantes ao seu ambiente natural (OLIVEIRA et al, 2016; FERREIRA et al, 2017) e geralmente são utilizados *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*. O seu grande uso pode ser atribuído à sua simplicidade, baixo desperdício de água, melhor recuperação do produto e qualidade da lipase produzida. Além disso, lipases purificadas do sistema SSF tiveram maior estabilidade

térmica comparada com aquela produzida pela fermentação submersa (SETHI et al, 2016).

Apesar dos avanços feitos nos últimos anos, o custo da produção de lipase nos processos biotecnológicos permanece ainda alto e com eficiência moderada industrialmente (YONG et al, 2016; MATEO & MAICAS, 2015). Recentes pesquisas apontam que esses custos representem cerca de 10 a 30% dos custos totais (OSMA & TOCA-HERRERA, 2011). Assim, o sucesso no uso de lipases em aplicações industriais depende de processos mais eficientes e especialmente de fontes de carbono mais baratas para sua produção. Dessa forma, atualmente uma das principais áreas na pesquisa de lipases envolve também o estudo de diferentes substratos para obter as melhores condições para produção extracelular dessa enzima, tanto por motivos econômicos como ambientais (NEETHU et al, 2015; GEOFFRY & ACHUR, 2018; FERREIRA et al, 2017; TREICHEL et al, 2010).

Cereus jamacaru é uma cactácea espalhada por todo continente americano, em regiões tropicais e temperadas, com a maior diversidade de espécies ocorrendo no México (de LUCENA et al, 2013). No Brasil *C. jamacaru* é popularmente conhecida com "Mandacaru", sendo encontrada abundantemente em regiões semiáridas do Nordeste, altamente resistente ao calor por conter elevados teores de água (KAVAMURA et al, 2018). Devido ao seu baixo custo de produção e alto teor nutricional, é utilizada como complemento na alimentação animal, com o objetivo de engorda e produção de leite (LUCENA et al, 2007). Além disso, alguns produtos industrializados, como xampus, sabonetes e cosméticos, têm sido produzidos a partir de substratos oriundos de outras espécies da família (BIAVATTI et al, 2007).

Estudos científicos foram realizados para avaliar diversas atividades biológicas dessa cactácea: anti-helmínticas, antimicrobiana, anti-inflamatória e diurética, demonstrando seu potencial para aplicações biotecnológicas. Contudo, nenhum estudo foi encontrado sobre seu uso como única fonte de carbono para crescimento microbiano e assim produção de bioprodutos de alto valor industrial como as lipases (VATTA et al, 2009; YOUSIF et al, 2007; DAVET et al, 2009; ARAÚJO et al, 2008; AGRA et al, 2007).

Deste modo, dada a importância de se investigar substratos alternativos para produção de enzimas, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de *C. jamacaru*, como único meio de crescimento de *Aspergillus niger* para produção de lipase, através da fermentação em estado sólido. Além

disso, foi realizada a otimização da lipase produzida visando sua aplicabilidade industrial.

Metodologia

Substrato

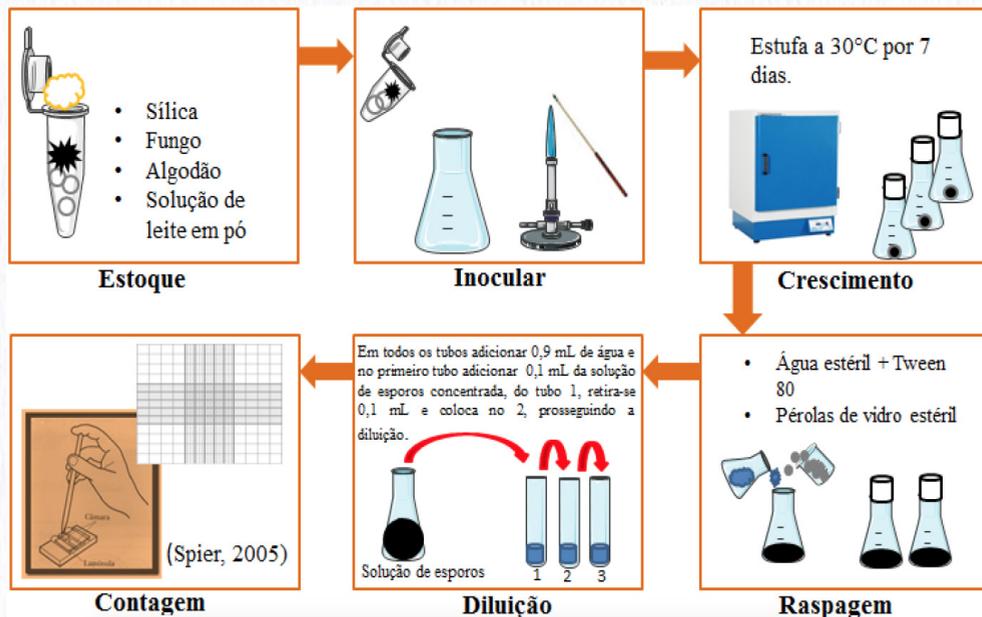
As espécimes de *C. jamaçaru* foram coletadas na cidade de Jequié-BA (13° 51' 28" S, 40° 5' 2" W), região sudoeste, em 20 de julho de 2016. A identificação taxonômica foi realizada pelo Dr. Guadalupe E. de Macedo, no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB, Jequié, Bahia, Brasil), onde foi depositado um exemplar com o número de referência HUESB 6494.

Após a colheita, a cactácea foi lavada, cortada, seca em estufa (SolabSL 102, Piracicaba, Brasil) a 65°C por 24 h e moída em um moinho de facas Wiley (ACB Labor, São Paulo, Brasil) até atingir o tamanho dos grânulos de 2 mm e armazenados a 4 °C até o momento da utilização.

Microorganismo e Inóculo

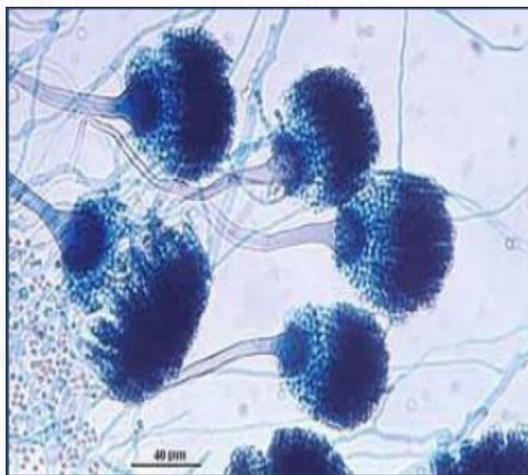
O *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizado neste trabalho foi doado pela Coleção de Microorganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). O cultivo dos microorganismos foram feitos em placas de Petri utilizando meio PDA (Potato dextrose Agar) (Himedia, Mumbai, Índia) a 30 °C. A solução estoque foi armazenada a 10 °C, o preparo da solução está ilustrado na figura 1.

Figura 1. Esquema ilustrado do inoculo do *Aspergillusniger* ATCC 1004 e obtenção da solução de esporos.



Fonte: Ribeiro, 2017

Figura 2. Conidióforos de *Aspergillus niger*.



Fonte: TAVARES, 2012.

Em seguida frascos erlenmeyer (250 mL) com 20 mL de meio PDA estéril foram inoculados com 0,5 mL da suspensão de esporos obtida a

partir da solução estoque por 7 dias em estufa (TE-317, Tecnal, São Paulo, Brazil) a 30 °C. A coleta de esporos foi realizada pela adição de 20 mL de uma solução aquosa de 0,01% (v/v) de Tween 80 (Vetec – Rio de Janeiro Brasil) e esferas de vidro estéreis aos frascos. A suspensão resultante foi então usada como inóculo, após o ajuste da quantidade de esporos para atingir uma concentração final de 10^7 esporos por grama de *C. jamacaru* seco, quantificada através da camera duplamente espelhada de NewBauer (Bioval L1000, São Paulo, Brazil).

Fermentação em estado sólido (SSF)

O substrato indutor utilizado em todos os experimentos foi somente o farelo seco de *C. jamacaru*, de um mesmo lote, submetido à esterilização em autoclave (Phonexi, São Paulo, Brasil) a 121 °C e 1,0 atm de pressão por 15 minutos. As fermentações foram realizadas com 10g, em frascos erlenmeyer (250 mL) recobertos com tecido hidrofóbico. A quantidade de massa seca do substrato determinada por meio de um analisador de umidade infravermelho (Moc63u, Shimadzu, São Paulo, Brasil) foi $98,0 \pm 0,9\%$.

Os processos de fermentação foram realizados em uma incubadora microbiológica (TE-317, Tecnal, São Paulo, Brasil) em diferentes temperaturas e tempos de fermentações, de acordo com o delineamento experimental adotado. O substrato foi umedecido com solução em tampão fosfato de sódio 50 mM (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (pH 7.0) nos volumes de 14,7mL, 22,8 mL e 39,2 mL para atingir as respectivas umidades de 60, 70 e 80%, determinadas por meio de um analisador de umidade infravermelho (MOC63u, Shimadzu, São Paulo, Brasil).

Após o processo de fermentação, em cada erlenmeyer foram adicionados 50 mL de solução tampão fosfato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (50 mM/pH 7,0) aos substratos fermentados. As misturas foram homogeneizadas em um shaker (Solab, SL 222, Piracicaba, Brasil) a 200 xg a 35 °C durante 20 min. Após esse período, as amostras foram mecanicamente prensadas e os líquidos extraídos foram centrifugados (CT-6000R; Cientec, Piracicaba, Brasil) a 5000xg a 4°C por 10 minutos para remoções de sólidos mais finos; em seguida foram feitas filtrações à vácuo utilizando-se filtros de tamanhos de poros de 0,22µm (Millipore® Stericup™ filterunit) e os sobrenadantes denominados extratos enzimáticos brutos foram utilizados para determinações das atividades enzimáticas. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Deste modo, a produção de lipase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 através da SSF foi avaliada inicialmente por meio da variação do tempo,

temperatura e umidade no processo fermentativo de acordo com o delineamento experimental adotado.

Planejamento experimental Doehlert para otimização da produção de lipase

Para prever inicialmente a produção de lipase sob quaisquer condições de tempo, temperatura e umidade no domínio experimental, utilizou-se o planejamento Doehlert com a metodologia de superfície de resposta (MSR). As variáveis, tempo de fermentação (cinco níveis: 48 - 144 h), temperatura (cinco níveis: 25 - 45 °C) e umidade (três níveis: 60 - 80%) foram avaliadas com três repetições no ponto central, levando a um total de 15 experimentos (Tabela 2). Todas as análises foram realizadas em triplicatas em uma ordem aleatória. A falta de ajuste do modelo aos dados experimentais foi avaliada utilizando software Statistica SAS versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) através da análise de variância (ANOVA).

Determinação da atividade da lipase

A atividade da lipase foi determinada de acordo com (FERREIRA et al, 2017) com pequenas modificações. Duas soluções, A e B, foram preparadas: a solução A foi composta por 60 mg de palmitato de p-nitrofenila (p-NPP) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em 20 mL de álcool isopropílico (Synth, São Paulo, Brasil); e solução B foi composta por 4 g de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e 0,4 g de goma arábica (Synth, São Paulo, Brasil) em 200 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (pH 7). Para o teste, foram utilizados 0,5 mL de solução A, 4,5 mL de solução B e 0,5 mL de extrato enzimático bruto. As amostras foram então incubadas em banho-maria (SL 50 / 4A, Solab, São Paulo, Brasil) a 40 ° C por 10 min, em seguida foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 1 M (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para parar a reação. A análise das amostras foi realizada em espectrofotômetro (UV-340 G, Gehaka, São Paulo, Brasil) a 410 nm. A atividade da lipase foi calculada dividindo a concentração de enzima encontrada na curva padrão pelo tempo de reação em minutos. A unidade de atividade enzimática (AU) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol mL⁻¹ min⁻¹ de p-NPP por minuto nas condições do ensaio.

Ensaio de proteína

As concentrações proteicas foram determinadas de acordo com o método descrito por (BRADFORD, 1976) utilizando albumina de soro bovino (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) como padrão.

Resultados e discussão

Prospecção de lipase no *C. Jamararu*

Antes do processo de fermentação foi realizada uma prospecção enzimática de lipase na *C. jamararu* in natura, no seu farelo seco e esterilizado. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação de lipase no *C. jamararu* in natura, farelo seco e esterilizado.

Enzima	UA		
	In natura	Farelo seco	Farelo esterilizado
Lipase	23.03 ± 0.001	15.03 ± 0.002	0.00 ± 0.0
Proteína Total	88,67 ± 0.002	88.62 ± 0.003	0.00 ± 0.0

A ocorrência de lipase em *C. jamararu* in natura aumenta sua potencialidade como biocatalizador para biotransformações lipídicas. Esta enzima é um importante biomarcador utilizado para diferenciar genótipos de várias espécies de plantas (BEVILAQUA et al, 2015).

A lipase degrada as reservas lipídicas armazenadas na forma de triglicérides (TAGs), produzindo uma fonte de carbono que estimula o crescimento do embrião durante o período pós-germinativo, dessa forma, pode estar realizando um importante papel também para propagação, preservação, sobrevivência e adaptação da *C. jamararu* em seu habitat (ALENCAR et al, 2012).

A secagem do *C. Jamararu* não provocou uma queda na atividade de proteína total. Entretanto foi notada uma queda de aproximadamente 35% na atividade da lipase no farelo seco. O tempo e a temperatura de secagem a qual foi submetida à cactácea pode ter inativado a enzima, demonstrando inicialmente a instabilidade da lipase para temperaturas a partir de 65 °C. No entanto, quando uma atividade de lipase é encontrada em um material vegetal cru que já é amplamente usado como complemento na alimentação animal, como é o caso do *C. jamararu*, torna-se uma alternativa de estudo muito promissora como fonte para lipases

microbianas. No farelo esterilizado para ser submetido ao processo de fermentação não foi encontrado proteína e nem lipase. Assim, nos parece interessante verificar o efeito da fermentação em estado sólido com o *Aspergillus niger* ATCC 1004 para produção de lipase utilizando *C. Jamacaru* como único indutor.

Avaliação do planejamento experimental Doehlert para otimização da produção de lipase

O Planejamento experimental Doehlert proposto para avaliar a produção de lipase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 através da fermentação em estado sólido em função da variação do tempo, temperatura e umidade no processo fermentativo de *C.jamacarué* apresentado na Tabela 2, com as respostas dadas pelas atividades da lipase em valores reais e estatisticamente previstos.

Tabela 2. Matriz Doehlert com os valores reais e codificados (em parêntese) para os fatores: Tempo (h), Temperatura (°C), Mistura (%) e a resposta: atividade de lipase (UA).

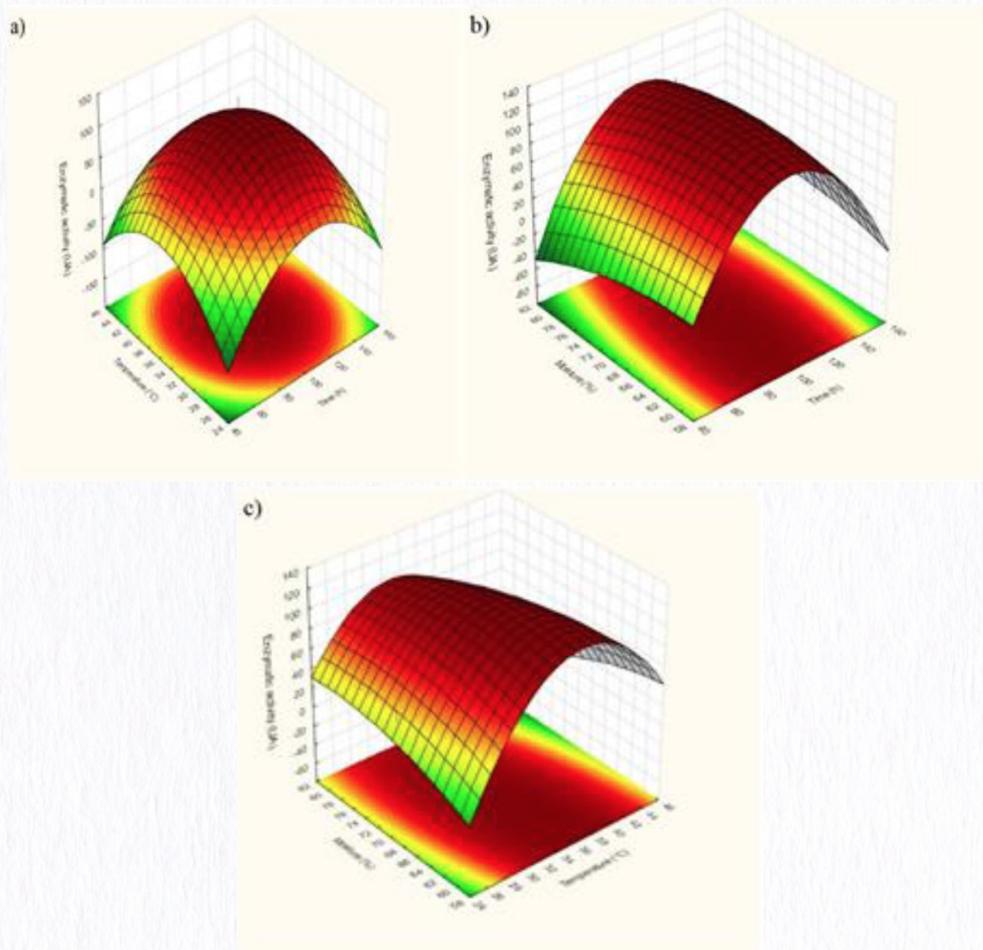
Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (° C)	Mistura (%)	UA	
				Reais	Preditos (Codificados)
1	48 (-1)	35(0)	70 (0)	30.34 ± 5.14	22.82
2	72 (-0.5)	30 (-0.289)	60 (-0.816)	63.31 ± 4.94	62.54
3	72(-0.5)	30(-0.289)	80(0.816)	41.28 ± 5.02	55.30
4	72(-0.5)	40 (0.289)	60(-0.816)	78.72 ± 5.07	87.03
5	72(-0.5)	40(0.289)	80(0.816)	41.28 ± 4.81	34.79
6	96 (0)	25 (-0.866)	70(0)	47.99 ± 4.94	42.28
7	96(0)	35(0)	70(0)	113.1 ± 5.13	118.16
8	96(0)	35(0)	70(0)	123.9 ± 5.00	118.16
9	96(0)	35(0)	70(0)	117.4 ± 5.51	118.16
10	96(0)	45 (0.866)	70(0)	27.53 ± 5.02	33.25
11	120 (0.5)	30(-0.289)	60(-0.816)	68.41 ± 4.98	74.91
12	120(0.5)	30(-0.289)	80(0.816)	99.30 ± 5.07	91.00
13	120(0.5)	40(0.289)	60(-0.816)	100.40 ± 5.07	86.38
14	120(0.5)	40(0.289)	80(0.816)	56.69 ± 5.00	57.47
15	144 (1)	35(0)	70(0)	50.34 ± 4.94	57.87

A relação entre as variáveis independentes, tempo (t), temperatura (T), umidade (M) e a variável dependente atividade da lipase (UA), é expressa em termos do modelo matemático (Equação1):

$$UA = 2099,4 + 6,10t - 0,03t^2 + 74,18C - 0,80T^2 + 18,54M - 0,10M^2 - 0,03tT + 0,02tM - 22MT \quad (1)$$

Baseado no modelo matemático contido na Equação (1) foi gerada a Figura 1 que representa os gráficos das superfícies de respostas para produção de lipase por *Aspergillus niger* ATCC 1004 na fermentação em estado sólido para o *C. jamaru*.

Figura 2. Superfície de resposta para produção de lipase por *Aspergillus niger* ATCC 1004 na fermentação em estado sólido com o *C. Jamaru*, variando: (a) Tempo e Temperatura, (b) Tempo e Mistura, (c) Temperatura e Mistura.



ANOVA (Tabela 3) foi aplicada utilizando os dados experimentais da Tabela 2 para avaliar o modelo quadrático ajustado. Um teste baseado na distribuição de Fisher (F-test) indicou que a equação ajustada é estatisticamente significativa ($F = 9,17 > 4,77$). A falta de ajuste da soma de

quadrados ($F = 8,74 < 19,16$) indica que há uma boa concordância entre a resposta prevista do modelo e os valores experimentais estudados para cada variável. O coeficiente de correlação R^2 foi de 0,94, mostrando que aproximadamente 94% dos resultados experimentais podem ser explicados pelo planejamento adotado.

Tabela 3. Análise de Variância (ANOVA) para produção de lipase por *Aspergillus niger* ATCC 1004 na fermentação em estado sólido com o *C. jamacaru* os fatores estudados foram: tempo (h), temperatura (°C) e mistura (%).

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F Calculado	F Tabelado
Regressão	14134,424	9	1570,49	9,17	4,77
Resíduo	855,461	5	171,092		
Falta de ajuste	794,850	3	264,95	8,74	19,16
Puro erro	60,610	2	30,306		
SQ total	14989,890	14			
R^2	0,94				

De acordo com o planejamento experimental adotado, tempos de fermentações superiores a 100 h e inferiores a 90 h, temperaturas maiores que 35°C e menores que 30°C e umidades superiores a 70% e inferiores a 60% diminuem a produção de lipase produzida por *Aspergillus niger* ATCC 1004. Desta forma, as condições ótimas para produção de lipase foram encontradas com um tempo de fermentação de 99 h, temperatura de 35 °C e umidade de 65%. Nestas condições, a atividade de lipase predita foi de 120,62. A atividade de lipase predita foi confirmada e validada através de um experimento (em triplicata), obtendo o valor experimental de $132,90 \pm 6,09$ UA, o qual é próximo do valor previsto, indicando que aproximadamente 90% de validade foi alcançada. Assim o planejamento experimental adotado exerceu uma predição adequada sobre a atividade da lipase, sendo confiável para descrever a atividade da lipase através da superfície de resposta.

O valor encontrado para a atividade da lipase por *Aspergillus niger* ATCC 1004 na fermentação em estado sólido com o *C. jamacaru* ($132,9 \pm 6,09$ UA) na fermentação em estado sólido com o *C. jamacaru* ($132,9 \pm 6,09$ UA) foi significativamente maior do que os resultados relatados anteriormente neste trabalho sem a fermentação, usando o *C. jamacaru* in natura ($23,03 \pm 0,001$ UA) e seco ($15,03 \pm 0,002$ UA), demonstrando assim o potencial que essa cactácea tem para aplicações em processos de fermentação em fase sólida.

Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que *C. jamacaru* é um substrato eficiente para síntese de lipase pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004 através da fermentação no estado sólido, uma vez que o mesmo demonstrou alto potencial como fonte nutritiva para o crescimento do microrganismo em estudo, pois através destes o microrganismo consegue iniciar a fermentação secretando a enzima. Desta forma, ter seu uso voltado para cultivo microbiano vez de sua subutilização como simples complementação animal, é uma alternativa para o uso dessa cactácea. Sua aplicação biotecnológica pode levar a processos potencialmente mais baratos e eficazes que os tradicionais, justificando assim a busca por possíveis aplicações desta enzima em biocatálise.

Referências

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **J. Ethnopharmacol.** 111, 2007, 383–Doi: 10.1016/j.jep.2006.12.007

ALENCAR, N. L. M.; INNECCO, R.; GOMES-FILHO, E.; GALLÃO, M. I.; ALVAREZ-PIZARRO, J. C.; PRISCO, J. T.; OLIVEIRA, A. B. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. ssp. *Jamacaru* (Cactaceae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 3, 84, 2012, 823-832. Doi: 10.1590/S0001-37652012000300024.

ARAÚJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P.A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **J. Ethnopharmacol.** 120, 2008.72–80. Doi: 10.1016/j.jep.2008.07.032

BEVILAQUA, M. R.R.; FILHO, A. P. S.; MANGOLINI, C. A.; OLIVEIRA, A. J.B.; MACHADO, M. DE F. P.S. Genetic and chemical diversity in seeds of cactus mandacaru (*Cereus* sp.) from two edaphoclimatic regions contrasting. **An. Acad. Bras. Ciênc.** [online]. 2015, vol.87, n.2, pp.765-776. ISSN 0001-3765. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140029>.

BIAVATTI, M.; MARENISI, V.; LEITE, S. N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Rev Bras Farmacogn** 17: 2007, 640-653. Doi: 10.1590/S0102-695X2007000400025

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microorganisms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72, 1976, 248–254. Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

COSTA, T. M.; HERMANN, K. L.; GARCIA-ROMAN, M.; VALLE, R DE C. S. C.; TAVARES, L. B. Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Vol, 34, No. 02, pp. 419 - 427, 2017. Doi:10.1590/0104-6632.20170342s20150477.

D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology** 97, 2006 1828–1833. Doi:10.1016/j.biortech.2005.09.001

DAVET, A.; VIRTUOSO, S.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; OLIVEIRA, A.B.; MIGUEL, O.G. Screening of the antimicrobial activity of *Cereus jamacaru* DC, Cactaceae. **Braz. J. Pharmacogn.** 19, 2009, 561–564. Doi: 10.1590/S0102-695X2009000400009

de LUCENA, C. M.; de LUCENA, R. F. P.; COSTA, G. M.; CARVALHO, T. K. N.; COSTA, G. G. DA S.; ALVES, R. R. DA N.; PEREIRA, D. D.; RIBEIRO, J. E. DA S.; ALVES, C. A. B.; QUIRINO, Z. G. M.; NUNES, E. N. Use and knowledge of Cactaceae in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 2013, 1-11, 9:62. Doi:10.1186/1746-4269-9-62.

DRIOUCH, H.; ROTH, A.; DERSCH, P.; WITTMAN, C. Filamentous fungi in good shape: microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. **Bioengineered bugs**. Vol, 2, 2011, P, 100-104. Doi:10.4161/bbug.2.2.13757

FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, D. DOS S.; SANTANA, R. A.; FELIX, A. C. S.; ALVAREZ, L. D. G.; LIMA, E. DE O.; DE FREITAS, J. S.; VALASQUES JUNIOR, G. L.; FRANCO, M. NASCIMENTO JUNIOR, B. B. Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera*. **Chemical Engineering Communications**, VOL. 204, NO. 10, 2017, 1167–1173. Doi: 10.1080/00986445.2017.1347567

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 14, 2018 ,241–253. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.03.009.

KAVAMURA, V. N.; TAKETANI, R. V.; FERREIRA, C.; DE MELO, I. S.; MENDES, R. The role of species turnover in structuring bacterial communities in a local scale in the cactus rhizosphere. **Plant and Soil**, Vol, 425. P, 2018, 101-112. Doi: 10.1007/s11104-018-3570-4

LIU, R.; JIANG, X.; MOU, H.; GUAN, H.; HWANG, H.; LI, X. A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain

Fusariumsolani N4–2 for detergent formulation. **Biochem. Eng. J.** 46, 2009, 265–270. Doi: 10.1016/j.bej.2009.05.016

LIU, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effects of alcohol and solvent on the performance of lipase from *Candida* sp. in enantioselective esterification of racemic ibuprofen. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2009, 56, 126-130. Doi:10.1016/j.molcatb.2008.03.003

LUCENA, R. F. P.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; ALMEIDA, C. F. C.B.; FLORENTINO, A. T. N.; FERRAZ, J. S. F. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil a look at their conservation and sustainable use. **Environ Monit Assess** 2007, 125:281–290. Doi: 10.1007/s10661-006-9521-1

MATEO, J. J.; MAICAS, S. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial Technologies. **Food research international**. Vol, 73, 2015, P, 13-25. Doi: 10.1016/j.foodres. 2015.03.007

NEETHU, C. S.; RAHIMAN, K. M. M.; ROSMINE, E.; SARAMMA, A. V.; HATHA, A. A. M. Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonasmaltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 4, 2015, 703–709. Doi: 10.1016/j.bcab.2015.09.002

OLIVEIRA, F.; MOREIRA, C.; SALGADO, J.M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation. **J. Sci. Food Agric.** 96, 2016, 3583–3589. Doi:10.1002/jsfa.7544

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRIGUEZ-COUTO, S. Cost analysis in laccase production, **J. Environ. Manage.**, 92, 2011, 2907–2912. Doi: 0.1016/j.jenvman.2011.06.052

PENHA, E, M; VIANA, L, A, N; GOTTSCHALK, L, M, F; TERZI, S, C; SOUZA, E, F; De FREITAS, S, C; SANTOS, J, O; SALUM, T, F, C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. **Ciência Rural**. Santa Maria. v.46. n.4. p.755-761. 2016.

RIBEIRO, D. dos S.; Obtenção de enzimas a partir da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*). **Trabalho de conclusão de curso, apresentado a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, p. 24 e 29, 2017.

SALIHU A.; ALAM M. Z.; ABDULKARIM M. I.; SALLEH H. M. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. **ResourConservRecyc** **I58**, 2012. 36–44. Doi:10.1016/j.resconrec.2011.10.007

SETH, S.; CHAKRAVORTY, D.; DUBEY, V. K.; PATRA, S. Review: An insight into plant lipase research – challenges encountered. **Protein Expression and Purification** **95**, 2014, 13–21. Doi:10.1016/j.pep.2013.11.006

SETHI, B.K.; NANDA, P.K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Braz. J. Microbiol.** **47**, 2016, 143– 149. Doi:10.1016/j.bjm.2015.11.026

SINGH, A. AND MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **ApplBiochemBiotechnol** **166**, 2012, 486–520. Doi:10.1007/s12010-011-9444-3

SIÓDMIK, T.; RUMINSKI, J. K.; MARSZALL, M. P. Application of Lipases from *Candida rugosa* in the Enantioselective Esterification of (*R,S*)-*Ibuprofen*. **Current Organic Chemistry**. Vol. 16, No. 8, 2012 972-977. Doi:10.2174/138527212800194728

SONG, S.; LI, S.; FAN, L.; HAYAT, K.; XIAO, Z.; CHEN, L.; TANG, Q. 2016. A novel method for beef bone protein extraction by lipase-pretreatment and its application in the Maillard reaction. **FoodChemistry**. **208**. 2016, 81-88. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.03.062.

TAVARES, I. M. DE C. Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos por fermentação em estado sólido, a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial. **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, Fevereiro de 2012.

TANI, S.; KAWAGUCHI, T.; KOBAYASHI, T. Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Vol, 98, 2014, P, 4829–4837. Doi:10.1007/s00253-014-5707-6

THAKUR, S. Lipases, its sources, properties and applications: a review. *Int. J. Sci. Eng. Res.* 3, 2012, 1–29.

TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.* 3, 2010, 182–196. Doi: 10.1007/s11947-009-0202-2

VATTA, A.F.; WALLER, P.J.; GITHIORI, J.B.; MEDLEY, G.F. The potential to control *Haemonchus contortus* in indigenous South African goats with copper oxide wire particles. *Vet. Parasitol.* 162, 2009, 306–313. Doi: 10.1016/j.vetpar.2009.03.005

YAN, J.; ZHENG, X.; LI, S. 2014. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: preparation, characterization and application in biodiesel production. *Bioresource Technology* 151, 2014, 43–48. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.10.037

YONG, S.K.; LIM, B.H.; SALEH, S.; TEY, L.H. Optimisation, purification and characterisation of extracellular lipase from *Botryococcus sudeticus* (UTEX 2629). *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 126, 2016, 99–105. Doi: 10.1016/j.molcatb.2016.02.004

YOUSIF, F.; HIFNAWY, M.S.; SOLIMAN, G.; GOULOS, L.; LABIB, T.; MAHMOUD, S.; MAMZY, F.; YOUSIF, M.; HASSAN, I.; MAHMOUD, K.; EI-HALLOUTY, S.M.; EL-GENDY, M.; GOHAR, L.; EL-MANAWATY, M.; FAYYAD, W.; EL-MENSHAWI, B.S. Large-scale in vitro screening of Egyptian native and cultivated plants for schistosomicidal activity. *Pharm. Biol.* 45, 2007, 501–510. Doi: 10.1080/13880200701389425.