



MARIA DANIELA ESPAÑA GUTIÉRREZ

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DO MESOCARPO
DE ACESSOS DE *Elaeis oleifera* (H.B.K.) ORIUNDOS DA
AMAZÔNIA BRASILEIRA E MAPEAMENTO *in silico* DE
LIPASES PUTATIVAS DAS CLASSES 3 (G_xS_xG) E GDSL NOS
GENOMAS DE PALMA DE ÓLEO**

LAVRAS – MG

2017

MARIA DANIELA ESPAÑA GUTIÉRREZ

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DO MESOCARPO DE ACESSOS DE
Elaeis oleifera (H.B.K.) ORIUNDOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA E
MAPEAMENTO *in silico* DE LIPASES PUTATIVAS DAS CLASSES 3 (GxSxG) E
GDSL NOS GENOMAS DE PALMA DE ÓLEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior
Orientador

Dr. Eduardo Fernandes Formighieri
Coorientador

LAVRAS – MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Gutiérrez, Maria Daniela España.

Caracterização química do óleo do mesocarpo de acessos de *Elaeis oleifera* (H.B.K.) oriundos da Amazônia Brasileira e mapeamento *in silico* de lipases putativas das classes 3 (GxSxG) e GDSL nos genomas de palma de óleo / Maria Daniela España Gutiérrez. - 2017.

82 p. : il.

Orientador: Manoel Teixeira Souza Júnior.

Coorientador: Eduardo Fernandes Formighieri.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Genoma. 2. *Elaeis* spp.. 3. Óleo de palma. 4. Caiuapé. 5. Acidez. I. Souza Júnior, Manoel Teixeira. II. Formighieri, Eduardo Fernandes. III. Título.

MARIA DANIELA ESPAÑA GUTIÉRREZ

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DO MESOCARPO DE ACESSOS DE
Elaeis oleifera (H.B.K.) ORIUNDOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA E
MAPEAMENTO *in silico* DE LIPASES PUTATIVAS DAS CLASSES 3 (GxSxG) E
GDSL NOS GENOMAS DE PALMA DE ÓLEO**

***CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE MESOCARP OIL OF ACCESSESIONS
OF *Elaeis oleifera* (H.B.K.) FROM THE BRAZILIAN AMAZON AND *in silico* MAPPING
OF PUTATIVE LIPASES CLASS 3 (GxSxG) AND GDSL IN PALM OIL GENOME***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de abril de 2017.

Dr. Eduardo Fernandes Formighieri EMBRAPA

Dra. Itania Pinheiro Soares EMBRAPA

Prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior
Orientador

LAVRAS – MG

2017

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus amado, a quem louvo com todo meu coração por ter-me permitido a realização deste sonho e ter cumprido suas promessas fieis.

Aos meus pais, Juan Felipe España Torres e Magdalena Gutiérrez Vela, que se doam inteiros cada dia para que eu possa alcançar os meus propósitos, pela espera e compreensão durante esta longa viagem.

Ao meu irmão, Juan Felipe España Gutiérrez, quem na distância foi minha motivação constante.

Ao meu orientador, Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior, por me abrir as portas desta grande oportunidade, por me exigir e me formar no caminho da ciência.

Ao meu coorientador, Dr. Eduardo Fernandes Formighieri pela paciência, apoio continuo e valiosos conselhos.

Ao Dr. Alexandre Alonso Alves e Dra. Simone Mendonça, pela colaboração nas várias dúvidas referentes aos trabalhos.

Os sinceros agradecimentos aos funcionários da Embrapa Agroenergia pelo bom recebimento, sempre prestativos em me ajudar, principalmente ao Dr. André Pereira Leão e Dr. Andrei Stecca Steindorff.

Ao meu professor e amigo Jorge William Arboleda pelo impulso continuo na minha formação profissional.

Aos amigos muito queridos dos quais sentirei falta: Luanny Tayllon, Flávia Soares, Rodrigo Melo e Lucas Soares de Britto.

RESUMO GERAL

A qualidade do óleo de palma é afetada pela acidificação resultante da atividade das lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3) que hidrolisam rapidamente os triglicerídeos liberando ácidos graxos livres (AGL) no mesocarpo de frutos maduros e/ou machucados. Objetivou-se neste trabalho, caracterizar o óleo extraído do mesocarpo dos frutos de diferentes acessos de Caiaué (*Elaeis oleifera*) oriundos da Amazônia Brasileira, do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa, por meio de análises químicas do tipo: teor de óleo *em base úmida*, teor de umidade, índice de acidez, teor de carotenoides totais, e perfil de ácidos graxos. Os frutos de Caiaué foram submetidos a diferentes tempos de estocagem. Essa abordagem permitiu verificar que existe variabilidade fenotípica entre os acessos mais representativos da coleção do BAG de Caiaué, assim como avaliar, indiretamente, a ação da lipase ao longo do armazenamento que ocorre antes do processamento. Neste estudo, também foi feita uma identificação *in silico* de lipases putativas das classes 3 e GDSL nas duas espécies do gênero *Elaeis* spp., como possíveis fontes responsáveis pela acidificação do óleo de palma. Essa busca foi feita utilizando os dados genômicos públicos de *E. guineensis* EG5 e os dados privados do Draft de *E. oleifera* “Manicoré” (versão 1.0 e 2.0); este último sequenciado pela Embrapa Agroenergia. Seis genes ortólogos da mesma linhagem evolutiva (três em *E. guineensis* e três em *E. oleifera*) foram detectados e caracterizados estruturalmente. Com isso, espera-se avançar nos trabalhos futuros de descoberta de marcadores (SNPs) nessas lipases candidatas para uso em seleção assistida de genótipos de baixa acidez. Adicionalmente, os resultados sugerem que existe uma grande diversidade de lipases putativas da classe GDSL e da classe 3 (GxSxG) presentes nas duas espécies de palma de óleo, que podem ser avaliadas para identificação de lipases relacionadas a acidificação do óleo de palma.

Palavras-chave: Genoma. *Elaeis* spp.. Óleo de palma. Caiaué. Acidez.

GENERAL ABSTRACT

The quality of oil palm is affected by the acidification resulting from the activity of the lipases (triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3), which hydrolyze the triglycerides rapidly liberating free fatty acids (FFA) in the mesocarp of ripe and / or bruised fruits. The objective of this work was to characterize the oil extracted from the mesocarp of fruits of different Caiaué (*Elaeis oleifera*) accesses from the Brazilian Amazon of the Embrapa Germplasm Active Bank (BAG), through chemical analyzes of the type of oil in base Moisture content, acidity, total carotenoid content, and fatty acid profile. The fruits of Caiaué were submitted to different storage times. This approach allowed to verify that there is phenotypic variability among the most representative accessions of the Caiaué BAG collection, as well as to indirectly assess the action of lipase throughout the storage that occurs before processing. In this study, it was also made an in silico identification of putative class 3 and GDSL lipases in the two species of the genus *Elaeis* spp., as possible sources responsible for the acidification of palm oil. This search was done using the public genomic data of *E. guineensis* EG5 and the private data of *E.oleifera* "Manicoré" draft (version 1.0 and 2.0) sequenced by Embrapa Agroenergia. Six genes orthologous of the same evolutionary lineage (three in *E. guineensis* and three in *E. oleifera*) were detected and characterized structurally. With this, we hope to advance in the future work of marker discovery (SNPs) in these lipases candidates for use in assisted selection of low acid genotypes. Additionally, the results suggest that there is a great diversity of putative lipases of the GDSL class and class 3 (GxSxG) present in the two oil palm species, which can be evaluated to identify lipases related to acidification of oil palm.

Key words: Genome. *Elaeis* spp.. Oil palm. Caiaué. Acidity.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	O gênero <i>Elaeis</i>	12
2.2	<i>Elaeis guineensis</i>. Jacq – Dendê	12
2.3	<i>Elaeis oleifera</i> (H. B. K) Cortés – Caiué	12
2.4	Bioinformática na prospecção de genes em <i>Elaeis</i>	13
2.5	Acidificação do óleo de palma	14
2.6	Genes associados com a acidificação de óleo de palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	15
	REFERÊNCIAS	18
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	21
	ARTIGO 1 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DO MESOCARPO DE CINCO ACESSOS DE <i>Elaeis oleifera</i> ORIUNDOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA	21
1	INTRODUÇÃO	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1	Coleta dos frutos de Caiué	25
2.2	Teor de umidade e teor de óleo	25
2.3	Extração de óleo para análises de qualidade do óleo	27
2.4	Determinação de carotenoides totais	27
2.5	Determinação do perfil de ácidos graxos	28
2.6	Determinação do índice de acidez	28
2.7	Análises estatísticas	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1	Teor de óleo em base seca, teor de óleo em base úmida	30
3.2	Carotenoides totais	31
3.3	Perfil de ácidos graxos	33
3.4	Índice de acidez	35
4	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45
	ARTIGO 2 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE LIPASES POTENCIALMENTE RESPONSÁVEIS PELA ACIDIFICAÇÃO DO ÓLEO DE PALMA (<i>Elaeis spp.</i>)	53
1	INTRODUÇÃO	56
2	MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1	Bancos de dados genômicos	58
2.2	Identificação <i>in silico</i> da lipase EgLip1 no genoma de <i>Elaeis oleifera</i>	58
2.3	Análise filogenética dos ortogrupos	58
2.4	Análise comparativa de genes sob seleção positiva	59
2.5	Identificação dos domínios funcionais das classes de lipases GDSL e classe 3 (GxSxG) nas duas espécies de <i>Elaeis</i>	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1	Mapeamento da lipase EgLip1 e identificação de ortólogos	60
3.2	Análise comparativa de genes sob seleção positiva	61
3.3	Caracterização estrutural dos genes ortólogos	61
3.4	Identificação das Lipases GDSL e classe 3 (GxSxG)	62

4	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de óleo de palma em 2014/2015 foi de cerca de 62 milhões de toneladas (Faostat 2016). A expectativa é que o consumo global de óleo de palma, em 2050, chegue a pelo menos 93 milhões de toneladas, podendo alcançar 120-156 milhões de toneladas (Corley 2009). O óleo de palma, produzido a partir da palma de óleo Africana (*Elaeis guineensis*, Jacq.), é responsável por, aproximadamente 30% de óleo vegetal comestível do mundo. A palma Africana apresenta uma produtividade de óleo por hectare próxima a dez vezes a produtividade da soja, outra importante oleaginosa (Carter, Finley et al. 2007).

O gênero *Elaeis* apresenta somente duas espécies de palma de óleo, a *Elaeis guineensis*, Jacq. e a *Elaeis oleifera* (Kunth, Cortés), originárias, respectivamente, da África Ocidental e da América Central e do Sul. Devido ao seu rendimento de óleo mais elevado, a palma de óleo Africana, *E. guineensis*, é a espécie, predominantemente, utilizada para cultivo comercial.

Embora não seja normalmente utilizada para estabelecimento de plantios comerciais, a palma de óleo Americana (*E. oleifera*), também conhecida como Caiaué, apresenta uma importância estratégica para os programas de melhoramento genético de palma de óleo. Caiaué contém uma variabilidade genética, quando comparada à palma de óleo Africana, que pode ser muito útil aos programas de melhoramento da palma de óleo Africana, tanto para a criação de variedades comerciais superiores de *E. guineensis*, como também na geração de híbridos interespecíficos de *E. oleifera* x *E. guineensis* (OxG) (Corley and Tinker 2003). A importância estratégica de *E. oleifera* decorre de esta ser resistente a certas pragas e doenças que afetam *E. guineensis*, em especial ao amarelecimento fatal (AF), que é o maior problema do cultivo da palma de óleo nas Américas (Bergamin Filho, Amorim et al. 1998). Outra característica importante é a resistência à *Fusarium* sp., doença que atinge a palma de óleo na África (Michielse and Rep 2009). Além da resistência a doenças, é de interesse para os melhoristas o porte reduzido de *E. oleifera* (Corley and Tinker 2003) e a qualidade do seu óleo, que possui maior teor de ácidos graxos insaturados, aproximadamente 78% contra 48% de *E. guineensis* (Ramos, Veiga et al. 2006). Sabe-se que o óleo de Caiaué também possui uma alta concentração de vitamina E (700-1500 ppm) e esteróis (3500-4000 ppm) (Choo, Yap et al. 1996). Por fim, Caiaué também é rico em tocotrienóis (Lubrano and Robin 1997).

A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) desenvolve um programa de pesquisa em *Elaeis* spp. que tem como ponto central um programa de melhoramento genético. Esse programa de melhoramento, coordenado pela Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, Estado do Amazonas, iniciou-se na década de 80, quando também foram estabelecidas coleções de germoplasma (BAG - Banco Ativo de Germoplasma) destas duas espécies do gênero *Elaeis*. O BAG de Caiaué conta com 328 acessos (Cunha and Lopes 2010), de 19 populações distintas, oriundas de seis diferentes regiões da Amazônia Brasileira (Figura 1).

Alguns acessos do BAG de Caiaué são utilizados para a geração de híbridos interespecíficos entre o Caiaué (*E. oleifera*) e o dendê (*E. guineensis*), que é um dos "braços" do programa de melhoramento genético dessa palma de óleo da Embrapa. O híbrido BRS Manicoré, cultivada quase tão produtiva quanto as cultivares comerciais de dendê, e com algumas das características do Caiaué, como a resistência ao AF, é um exemplo de híbrido interespecífico desenvolvido e lançado pela Embrapa no Brasil. Apesar de já utilizar acessos do BAG no programa de melhoramento genético de palma de óleo, pouco se fez no que diz respeito à caracterização fenotípica dos acessos do BAG Caiaué; caracterização esta necessária para melhor conhecer a diversidade genética de *E. oleifera* disponível, e, conseqüentemente, promover um uso mais eficiente desse recurso para a geração de variedades melhoradas de dendê e dos híbridos interespecíficos.

Um fator importante que afeta a qualidade do óleo de palma bruto é sua rápida acidificação, devido à atividade das lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3) que hidrolisam os triglicerídeos para liberar ácidos graxos livres (AGL) no mesocarpo de frutos maduros e machucados. Esses compostos são indesejados na indústria, devido à presença de AGL que geram um óleo ranço e precisam ser removidos durante o processo de refino (Henderson and Osborne 1991, Sambanthamurthi, Oo et al. 1995, Ebongue, Dhouib et al. 2006, Morcillo, Cros et al. 2013). Para inativar a atividade das lipases, é necessário aquecer os cachos imediatamente, de preferência no mesmo dia da colheita, o que demanda uma mão de obra intensiva e, conseqüentemente, gera um aumento nos custos da colheita (Corley and Tinker 2003). O teor de AGL é o principal parâmetro utilizado para avaliar a qualidade do óleo de palma, e para determinar seu valor comercial (Ebongue, Koono et al. 2008), e, ainda, a atividade das lipases muda dependendo do acesso, e mostra-se maior em *E. guineensis* (17-55% AGL) do que em *E. oleifera* (<7,5% AGL).

A fonte de atividade da lipase presente na palma de óleo Africana (*Elaeis guineensis*) foi identificada por Morcillo et al. (2013) os quais encontraram e caracterizaram um cDNA

denominado EgLip1 (*Elaeis guineensis* Lipase 1 - número de acesso GenBank JX556215) EgLip1 codifica uma lipase no mesocarpo dos frutos da palma de óleo. Nurniwalis et al. (2015) denominaram o gene que dá origem o cDNA EgLip1 de FLL1 (Full-length Lipase class 3) e fizeram uma caracterização detalhada da região promotora. No entanto, o/os gene (s) responsável (is) pela atividade das lipases no mesocarpo dos frutos da palma de óleo Americana ainda não foram identificados, e, ainda, estes podem ser os mesmos que ocorrem em dendê.

O lançamento público de versões dos genomas de *Elaeis guineensis* (WGS - Whole Genome Sequence) e de *E. oleifera* (Draft a partir de 25X de cobertura) (Singh, Ong-Abdullah et al. 2013), disponíveis na base de dados públicas NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, e a geração do draft (Versão 1.0 e 2.0) do genoma de *E. oleifera* (acesso Manicoré), de propriedade privada da Embrapa (130X de cobertura), permitem, pela primeira vez, uma caracterização detalhada dos genes potencialmente responsáveis pela acidificação do óleo de palma, viabilizando uma análise comparativa interespecífica. A caracterização dos genes ortólogos e parólogos desses genes presentes nos genomas destas duas espécies de palma de óleo será feita mediante o mapeamento e anotação do gene EgLip1 (ou FLL1) e dos genes das classes de lipases-like GDSL e GxSxG. Essa caracterização de genes associados com lipases, potencialmente responsáveis pela acidez do óleo de palma Americana, fornecerá informações para melhor entender as razões pelas quais a acidificação do óleo da palma Americana é menor que a do óleo da palma Africana, e, com isso, viabilizar o desenvolvimento de futuras abordagens diferenciadas para transferir essa característica para a palma Africana.

Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar o óleo extraído do mesocarpo dos frutos de diferentes acessos de Caiuê do BAG da Embrapa, por meio de análises químicas do tipo: teor de óleo *em base úmida*, teor de umidade, índice de acidez, teor de carotenoides totais, e perfil de ácidos graxos. Pretendeu-se, com isso, verificar se existe ou não variabilidade fenotípica entre esses acessos oriundos da Amazônia Brasileira; além de avaliar estas características químicas do óleo de Caiuê em frutos submetidos a diferentes tempos de estocagem. Essa abordagem permite avaliar, indiretamente, a ação da lipase ao longo do armazenamento que ocorre antes do processamento.

Adicionalmente, objetivou-se caracterizar, *in silico*, os genes relacionados com a acidificação do óleo em Caiuê. Pretendendo-se, neste estudo preliminar, avançar na identificação dos possíveis genes responsáveis por codificar lipases no genoma privado de *E. oleifera* (“Manicoré”) sequenciado pela Embrapa Agroenergia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Elaeis*

O gênero *Elaeis* pertence à classe *Liliopsida* (Monocotiledônea), ordem *Arecales* (Palmales), família *Arecaceae* (Palmaceae), subfamília *Arecoideae*, tribo *Cocoseae* (Cocoinaeae), subtribo *Elaeidinae* (Dransfield, Uhl et al. 2005). Esse gênero é composto por duas espécies: *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera* (Borém, Clement et al. 2009).

2.2 *Elaeis guineensis*. Jacq – Dendê

O Dendê, também conhecido como palma de óleo ou dendezeiro, tem origem no oeste Africano, concentrando-se em Guiné, Serra Leoa, Libéria, Costa do Marfim, Gana, Togo, Benim, Nigéria, Camarões, Gabão, República Democrática do Congo e Angola (Rajanaidu 1986). A palma de óleo Africana é a oleaginosa cultivada comercialmente com maior produtividade de óleo. Dois tipos de óleos podem ser extraídos, o óleo de palma, extraído industrialmente da polpa do fruto; e o óleo de palmiste, extraído da amêndoa (Boari 2008). O óleo de palma é, majoritariamente, composto pelos ácidos palmítico e oleico, enquanto que o óleo de palmiste é composto por ácidos láurico e mirístico (Atadashi, Aroua et al. 2012). Esses ácidos graxos diversos fazem do óleo de palma uma fonte versátil para muitas aplicações industriais. Embora o óleo de palma seja considerado, principalmente para ser utilizado como na indústria alimentícia, é também usado no sector não alimentar, principalmente como matéria prima em muitos processos industriais como nas indústrias de oleoquímicos e combustíveis (Sambanthamurthi, Sundram et al. 2000).

2.3 *Elaeis oleifera* (H. B. K) Cortés – Caiaué

As populações naturais de Caiaué podem ser encontradas desde a América Central até o norte da América do Sul (Suriname, Colômbia e extremo noroeste do Brasil) (Ghesquiere, Barcelos et al. 1987). Essa espécie tem sido, amplamente, incorporada em programas de melhoramento genético de palma de óleo (Meunier 1975). O interesse no germoplasma de Caiaué é devido a algumas características que poderiam ser valiosas para a produção comercial de óleo de palma, tais como: baixo porte que viabiliza um ciclo da cultura mais longo, aumentando, assim, o tempo de produção da cultura, possui também, melhor qualidade do óleo e resistência a doenças (Bergamin Filho, Amorim et al. 1998).

No Brasil, extensas coletas de germoplasma foram realizadas na região Amazônica desde o início dos anos 1980, pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil) e pelo CIRAD (Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o

Desenvolvimento, França), objetivando formar um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) que constitui, atualmente, uma valiosa fonte de material genético (Bergamin Filho, Amorim et al. 1998). Este BAG de Caiuá foi agrupado de acordo com o local de origem. Na Floresta Amazônica, as populações de Caiuá são, normalmente, encontradas perto de rios, em terras férteis e bem drenadas (Andrade 1983).

O cultivo do Caiuá apresenta um baixo rendimento de óleo, comparado com o rendimento de *E. guineensis* (Ooi, Da Silva et al. 1981). No entanto, as duas espécies se hibridizam com facilidade, e geram descendentes férteis, com rendimentos em torno de 90% daquele obtido com o dendê (Moretzsohn, Nunes et al. 2000); os quais se constituem em uma importante fonte de variabilidade genética a ser explorada pelos melhoristas (Hartley 1967, Barcelos 1986).

2.4 Bioinformática na prospecção de genes em *Elaeis*

Recentemente, os genomas de *Elaeis guineensis* e de *Elaeis oleifera* foram sequenciados (Singh, Ong-Abdullah et al. 2013). O genoma de *Elaeis guineensis* de um Acesso de AVROS (Algemene Vereniging van Rubberplanter ter Oostkust van Sumatra) com fruto tipo Pisífera. O tamanho final da versão do genoma publicado foi de, aproximadamente 877 Mb, menos que a metade do genoma total previsto de 1.8 Gb (genoma haplóide), e cobriu os 16 cromossomos das espécies; tendo sido preditos 34.802 genes. No que tange à espécie Americana, *E. oleifera*, Singh Ong-Abdullah et al. (2013) também relataram um draft do genoma dessa espécie, obtido a partir de 130 milhões de reads que representavam aproximadamente 25X de cobertura. A Embrapa também gerou um draft do genoma de *E. oleifera*, acesso Manicoré, a partir de reads gerados pela tecnologia Illumina HiSeq2000 que perfazem 130X de cobertura (Ferreira Filho 2015); esse draft foi denominado Versão 1.0. Uma segunda versão do Draft local do genoma de *E. oleifera* da Embrapa foi feita mediante emprego de montagem, anotada com o programa MAKER (Draft “Manicoré” Versão 2.0).

Com a disponibilidade de grande volume de dados genéticos, gerados dos projetos de sequenciamento de genomas, é preciso fazer uso das ferramentas da bioinformática que permitam a organização e interpretação adequada de tais informações. O procedimento mais comum para a análise de sequências é a utilização do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – www.blast.ncbi.nlm.nih.gov), trata-se de uma ferramenta de busca de similaridade entre sequências biológicas (nucleotídeos ou aminoácidos) para identificar, rapidamente, a similaridade e permitir a inferência de função baseada em homologia, ou seja,

por meio de similaridade identificada, pode-se inferir uma função à sequência direcionando a realização imediata de experimentos biológicos para validação da atribuição.

Uma busca utilizando BLAST compara a sequência de interesse (query ou sequência de entrada), conta um banco de dados (Subject). A origem da sequência de interesse, assim como a pergunta que se tenta responder, irão determinar o banco de dados a ser utilizado. Alguns dos bancos de dados públicos mais conhecidos em bioinformática são: National Center for Biotechnology Information (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov), European Bioinformatics Institute (EBI - www.ebi.ac.uk), DNA Data Bank of Japan (DDBJ - www.ddbj.nig.ac.jp), Protein Data Bank (PDB - www.wwpdb.org), Protein knowledgebase (SWISS-PROT - www.expasy.org) (Altschul, Madden et al. 1997).

No NCBI (National Center for Biotechnology Information), são encontrados os cinco tipos clássicos de BLAST (blastn, blastp, blastx, tblastn e tblastx). Cada comparação a ser solicitada ao algoritmo tem um objetivo e um programa do BLAST a ser utilizado, que é baseado na necessidade do usuário e natureza dos dados e do banco de referência. Serão descritos na Tabela 1 aqueles programas mais frequentemente utilizados e que permitem a comparação da sequência de entrada contra um banco de dados.

2.5 Acidificação do óleo de palma

O teor de ácidos graxos livres (AGL) é o principal parâmetro para medir a qualidade do óleo de palma e determinar seu valor comercial. A presença de AGL gera um óleo ranço que se deteriora rapidamente. Por essas razões, devem ser removidos durante o processo de refino. Esse problema aumenta, consideravelmente, o custo do processo de produção (Sambanthamurthi, Sundram et al. 2000, Corley, Celis et al. 2009, Torres, Sarria et al. 2010). Estudos têm demonstrado que a formação de AGL no mesocarpo dos frutos de palma de óleo é causada pela ação hidrolítica da lipase chamada triacilglicerol acilhidrolase, número EC 3.1.1.3 (Ebongue, Dhouib et al. 2006). As lipases hidrolisam o teor de triglicerídeos para liberar AGL no mesocarpo de frutos maduros e machucados (Henderson and Osborne 1991, Ebongue, Dhouib et al. 2006). Essa enzima tem sido associada com membranas de oleossomas ou corpos lipídicos e é ativada quando os frutos são coletados, transportados e armazenados (Mohankumar and Arumughan 1990). Em apenas 10 minutos, as lipases podem hidrolisar o 28% dos lipídios totais à temperatura ambiente (Ebongue et al. 2008).

As lipases são inativadas por tratamentos térmicos dos cachos colhidos. No entanto, as lipases presentes no mesocarpo dos frutos podem ser ativadas antes desse tratamento térmico, liberando AGL. A acidificação do óleo é, então, um problema de difícil controle que afeta a

todos os produtores e toda a indústria envolvida. Além disso, existe um conflito entre os requisitos exigidos na colheita e na pós-colheita com os procedimentos para inativar a atividade lipase, porque é necessário aquecer os cachos maduros imediatamente após a colheita, idealmente dentro do mesmo dia. No entanto, os cachos precisam ser coletados o mais tarde possível, para que um amadurecimento ótimo seja garantido, maximizando o rendimento do óleo. É por isso que os plantadores devem coletar os cachos a cada 7-10 dias, para que a palma produza, constantemente, frutos. Isso resulta em um incremento nos custos de produção pela mão de obra intensiva requerida (Corley and Tinker 2003).

2.6 Genes associados com a acidificação de óleo de palma (*Elaeis guineensis*)

Morcillo, Cros et al. (2013) identificaram e caracterizaram um cDNA, denominado EgLIP1, que codifica uma proteína com grande similaridade de 51,8% com a lipase de mamona (*Ricinus communis* L.). A imunolocalização de dados mostrou que a lipase putativa está localizada adjacente à superfície exterior dos dropletos lipídicos, sugerindo que EgLip1 codifica para uma lipase do mesocarpo dos frutos de palma de óleo. Além disso, foi feita uma análise quantitativa por RT-PCR dos transcritos em tecidos selecionados de palma, na qual o gene de EgLip1 é quase exclusivamente expresso no mesocarpo, durante o amadurecimento de frutos. Em outro estudo recente foi caracterizada a região promotora desse gene, que foi renomeado pelos autores como full-length lipase class 3 (FLL1) da palma de óleo Africana (*E. guineensis*) identificando as posições dos cis-elementos TATA-box, Y-Patch, Box 4, G-box entre outros, na região 3,0 Kb upstream do start códon, com o uso dos programas: PLANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) e MEME (<http://meme-suite.org/>) (Nurniwalis, Zubaidah et al. 2015).

A presença de duas classes de lipases no óleo palma, GxSxG e GDSL, foi confirmada, recentemente, por Wong, Kushairi et al. (2015). A lipase GxSxG é específica do mesocarpo dos frutos de óleo de palma, e expressa, apenas, na fase do desenvolvimento tardio do fruto, enquanto GDSL é expresso na folha, raiz e mesocarpo com maior expressão nas fases iniciais do desenvolvimento do fruto. Os resultados de Wong, Kushairi et al. (2015) sugerem que ambas classes de lipases estão envolvidas na liberação de AGL na palma de óleo. No entanto, a produção de AGL ocorre, quando os frutos estão feridos ou expostos a baixas temperaturas. Estes estresses físicos e abióticos desencadeiam a ativação dos genes que levam a uma resposta a esses estresses, neste caso, as lipases GDSL. Além disso, as feridas vão ativar as lipases, trazendo-as em contato com o substrato que são os triglicerídeos. Morcillo, Cros et al. (2013) relataram, recentemente, que a acidez do mesocarpo do óleo de palma é controlada por

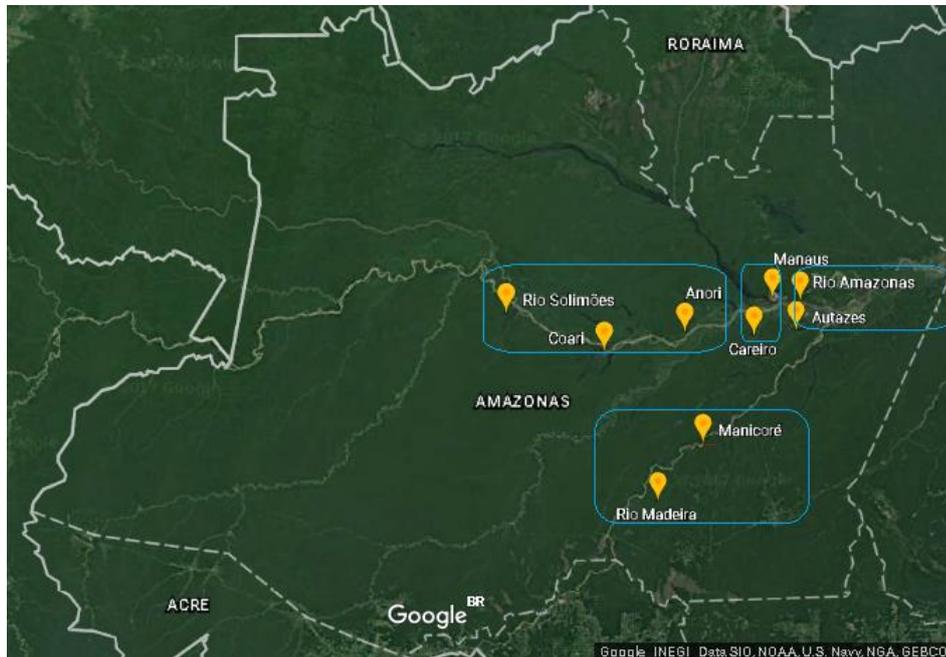
um único gene EgLip1. Wong, Kushairi et al. (2015) sugerem que tanto as lipases GDSL como as GxSxG estão envolvidas. Apesar da importância do Caiuá em termos da qualidade de óleo por ter uma baixa acidificação, a fonte da atividade da lipase nessa espécie, ainda, não tem sido identificada (Sambanthamurthi, Let et al. 1991).

Tabela 1 - Descrição dos programas presentes no algoritmo BLAST para comparação de sequências.

Programa	Descrição
Blastp	Compara a sequência de aminoácido de entrada (query) contra um banco de dados de sequências de proteínas (subject).
Blastn	Compara a sequência de nucleotídeos de entrada contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos.
Blastx	Compara a sequência de nucleotídeos de entrada traduzida para todas as sequências de leitura possíveis contra um banco de dados de sequências de proteínas. É o programa mais utilizado em grandes projetos de sequenciamento, pois permite identificar possíveis proteínas a partir de uma sequência de nucleotídeos desconhecida.
tBlastn	Compara a sequência de aminoácidos de entrada contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos traduzidas para todas as sequências de leitura possíveis.
tBlastx	Compara as seis sequências de leitura possíveis de um nucleotídeo contra um banco de dados de nucleotídeos traduzidos para todas as sequências de leitura possíveis.

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov (NCBI 2013).

Figura 1 – Localização das regiões de onde provêm as populações de acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Caiaué, mantidas na Estação Experimental do Rio Urubu – Embrapa Amazônia Ocidental (CPAA), utilizadas neste estudo.



Fonte: Do autor (2017).

REFERÊNCIAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Andrade, E. d. (1983). Relatório de expedição para coleta de germoplasma de caiaué [*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés] na Amazônia brasileira. EMBRAPA/CNPSD, Manaus.
- Official methods and recommended practices of the AOCS. (2005).
- Atadashi, I., Aroua, M., Aziz, A. A., & Sulaiman, N. (2012). Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 3275-3285.
- Barcelos, E. (1986). Características genético-ecológicas de populações naturais de caiaué (*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés) na Amazônia Brasileira.
- Bergamin Filho, A., Amorim, L., Laranjeira, F., Berger, R., & Hau, B. (1998). Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. *Fitopatologia brasileira*, 23(3), 391-396.
- Boari, A. d. J. (2008). Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil. Embrapa Amazônia Oriental. Documentos.
- Borém, A. G. L., Clement, M. T., & Charles, R. (2009). Domesticacao e melhoramento.: especies amazônicas. Retrieved from
- Carter, C., Finley, W., Fry, J., Jackson, D., & Willis, L. (2007). Palm oil markets and future supply. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(4), 307-314.
- Choo, Y.-M., Yap, S.-C., Ooi, C.-K., Ma, A.-N., Goh, S.-H., & Ong, A. S.-H. (1996). Recovered oil from palm-pressed fiber: a good source of natural carotenoids, vitamin E, and sterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), 599-602.
- Corley, R. (2009). How much palm oil do we need? *Environmental Science & Policy*, 12(2), 134-139.
- Corley, R., Celis, A., Luis, A., Sharofah, S. S., Ferreira, L., Dos Santos, J., . . . TA Van Scoyoc, S. (2009). La palma de aceite. Paper presented at the v. 31, no. Especial Tomo I (2010), p 278-290.
- Corley, R., & Tinker, P. (2003). The classification and morphology of the oil palm. *The Oil Palm* 4th Edn. BS Ltd. Blackwell Publishing, 27-51.
- Corley, R., & Tinker, P. (2003). Selection and breeding. *The oil palm*. 4th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd Blackwell Publishing, 133-200.

- Cunha, R., & Lopes, R. (2010). BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento-fatal. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental.
- Desassis, A. (1957). Palm oil acidification. *Oléagineux*, 12, 525-534.
- Dransfield, J., Uhl, N. W., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M., & Lewis, C. E. (2005). A new phylogenetic classification of the palm family, *Arecaceae*. *Kew Bulletin*, 559-569.
- Ebongue, G. F. N., Koon, P., Nouy, B., Zok, S., Carrière, F., Zollo, P. H. A., & Arondel, V. (2008). Identification of oil palm breeding lines producing oils with low acid values. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(6), 505-509.
- Ebongue, G. N., Dhoub, R., Carriere, F., Zollo, P.-H. A., & Arondel, V. (2006). Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(10), 611-617.
- Faostat, F. (2016). Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (2014). Production Available in: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> [Review date: April 2015].
- Ghesquiere, M., Barcelos, E., Santos de M, M., & Amblard, P. (1987). Enzymatic polymorphism in *Elaeis oleifera* HBK (*E. melanococca*). Analysis of populations in the Amazon Basin. *Oleagineux* (France).
- Gibon, V., De Greyt, W., & Kellens, M. (2007). Palm oil refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(4), 315-335.
- Hartley, C. W. S. (1967). The oil palm. The oil palm.
- Henderson, J., & Osborne, D. J. (1991). Lipase activity in ripening and mature fruit of the oil palm. Stability in vivo and in vitro. *Phytochemistry*, 30(4), 1073-1078.
- Lubrano, C., & Robin, J. (1997). Major compounds study in fruit pulp oils of 6 Guiana palms species. *Acta Botanica Gallica* (France).
- Meunier, J. (1975). Le " palmier a huile " americain *Elaeis melanococca*. (The American " oil palm " *Elaeis melanococca*). *Oléagineux*, 30(2), 51-61.
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 10(3), 311-324.
- Mohankumar, C., & Arumughan, C. (1990). Histological localization of oil palm fruit lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(10), 665-669.
- Morcillo, F., Cros, D., Billotte, N., Ngando-Ebongue, G.-F., Domonhédó, H., Pizot, M., Bourgis, F. (2013). Improving palm oil quality through identification and mapping of the lipase gene causing oil deterioration. *Nature communications*, 4.

- Moretzsohn, M. d. C., Ferreira, M., Amaral, Z., Coelho, P. J. d. A., Grattapaglia, D., & Ferreira, M. E. (2002). Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* HBK) germplasm collected in the Amazon Forest. *Euphytica*, 124(1), 35-45.
- Moretzsohn, M. d. C., Nunes, C. D. M., Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (2000). RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics*, 100(1), 63-70.
- NCBI, R. C. (2013). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D8.
- Nurniwalis, A., Zubaidah, R., Akmar, A. S. N., Zulkifli, H., Arif, M. M., Massawe, F., . . . Parveez, G. (2015). Genomic structure and characterization of a lipase class 3 gene and promoter from oil palm. *Biologia Plantarum*, 59(2), 227-236.
- Ooi, S., Da Silva, E., Muller, A., & Nascimento, J. (1981). Oil palm genetic resources native *Elaeis oleifera* populations in Brazil offer promising sources [African oil; Plant breeding; Cross-breeding; Hybrid progenie]. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira (Brazil)*.
- Rajanaidu, N. (1986). *Elaeis oleifera* collection in Central and South America. Paper presented at the International Workshop on Oil Palm Germplasm and Utilisation, Bangi, Selangor (Malaysia), 26-27 Mar 1985.
- Ramos, E., Veiga, A., & Furlan Júnior, J. (2006). Potencial produtivo de híbridos interespecíficos entre dendezeiro e caiauezeiro nas condições do nordeste paraense. *Embrapa Amazônia Oriental. Documentos*.
- Sambanthamurthi, R., Let, C. C., Cheang, O. K., Huat, Y. K., & Rajan, P. (1991). Chilling-induced lipid hydrolysis in the oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. *Journal of experimental botany*, 42(9), 1199-1205.
- Sambanthamurthi, R., Oo, K.-C., & Parman, S.-H. (1995). Factors affecting lipase activity in *Elaeis guineensis* mesocarp. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)*, 33(3), 353-359.
- Sambanthamurthi, R., Sundram, K., & Tan, Y.-A. (2000). Chemistry and biochemistry of palm oil. *Progress in lipid research*, 39(6), 507-558.
- Singh, R., Ong-Abdullah, M., Low, E.-T. L., Manaf, M. A. A., Rosli, R., Nookiah, R., . . . Halim, M. A. (2013). Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. *Nature*, 500(7462), 335-339.
- Torres, G., Sarria, G., Varon, F., Coffey, M., Elliott, M., & Martinez, G. (2010). First report of bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on African oil palm in Colombia. *Plant Disease*, 94(9), 1163-1163.
- Wong, Y., Kushairi, A., Rajanaidu, N., Osman, M., Wickneswari, R., & Sambanthamurthi, R. (2015). Screening of wild oil palm (*Elaeis guineensis*) germplasm for lipase activity. *The Journal of Agricultural Science*, 1-12.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1- CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DO MESOCARPO DE CINCO ACESSOS DE *Elaeis oleifera* ORIUNDOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Maria Daniela España¹, Paula A. O. Carmona², Raimundo Nonato Vieira da Cunha³, Alexandre Alonso Alves⁴, Simone Mendonça⁵, Manoel Teixeira Souza Junior⁶

Formatação do artigo baseada na NBR 6022 (ABNT, 2003).

¹ Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: maria.espana.g@gmail.com

² Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901, Brasília, DF. E-mail: paula.carmona@colaborador.embrapa.br

³ Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural, Caixa Postal 319, CEP: 69010-970 Manaus, AM. E-mail: raimundo.vieira@embrapa.br

⁴ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901, Brasília, DF. E-mail: alexandre.alonso@embrapa.br

⁵ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901, Brasília, DF. E-mail: simone.mendonca@embrapa.br

⁶ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901, Brasília, DF. E-mail: manoel.souza@embrapa.br

RESUMO

O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Caiaué (*Elaeis oleifera*), composto quase que exclusivamente de acessos oriundos de diferentes regiões da Amazônia Brasileira, tem sido utilizado como doador de parentais para o desenvolvimento de híbridos interespecíficos (com *Elaeis guineensis*) no Programa de Melhoramento Genético de Palma de Óleo da Embrapa. Apesar da importância do Caiaué para este programa de melhoramento, pouco se fez até o momento no que tange à caracterização química do óleo dos acessos deste BAG. Decorrente disso, não se sabe se existe ou não variabilidade fenotípica entre acessos de Caiaué deste BAG para as principais características químicas do óleo dessa palma Americana. Um melhor conhecimento sobre a existência ou não dessa variabilidade é importante para promover um uso mais eficiente desses recursos genéticos para a geração de híbridos interespecíficos superiores. Este estudo teve por objetivo caracterizar a diversidade fenotípica do óleo extraído do mesocarpo dos frutos de cinco acessos do BAG de Caiaué, por meio da análise química do teor de óleo em base seca, teor de óleo *em base úmida*, teor de umidade, índice de acidez, teor de carotenoides totais, e perfil de ácidos graxos. Os frutos foram coletados e esterilizados após diferentes tempos de estocagem (1, 7 e 14 dias). Como resultados, determinou-se que existe uma variabilidade, estatisticamente, significativa entre as amostras dos diferentes acessos submetidos aos três tempos de estocagem em quanto as variáveis: índice de acidez, perfil de ácidos graxos (AG), teor de carotenoides totais ($p < 0,05$). Essas análises foram confirmadas com o teste de comparação de medias Scott-Knott com um nível de significância de 5%. Todos os acessos estudados apresentaram um comportamento uniforme para a variável teor de óleo em base seca para os três tempos de estocagem, indicando que não houve síntese ou degradação de óleo durante o período pós-colheita para todos os acessos.

Palavras-chave: Caiaué. Palma de óleo. Dendê. *Elaeis guineensis*. Fenotipagem. Acidez.

ABSTRACT

The Active Germplasm Banks (BAG) of Caiaué (*Elaeis oleifera*), composed almost exclusively of accesses from different regions of the Brazilian Amazon, has been used as a donor of parental for the development of interspecific hybrids (with *Elaeis guineensis*) in the Program of Genetic Improvement of Embrapa Palm. Despite the importance of Caiaué for this breeding program, little has been done so far regarding the chemical characterization of the oil from the accesses of this BAG. From this, it is not known whether or not there is phenotypic variability between Caiaué accessions of this BAG to the main chemical characteristics of the oil of this American palm. Better understanding about the existence or not of this variability is important to promote an efficient use of these genetic resources for the generation of superior interspecific hybrids. The objective of this study was to characterize the phenotypic diversity of the oil extracted from the mesocarp of the fruits of five Caiaué BAG accessions, through chemical analysis of the oil content in dry basis, in oil content, moisture content, acidity content, total carotenoid content, and fatty acid profile. The fruits were collected and sterilized after different storage times (1, 7 and 14 days). As results, it was obtained that there is a statistically significant variability between the samples of the different accesses submitted to the three storage times in relation to the variables: acidity, fatty acids composition, total carotenoid content ($p < 0,05$). These analyzes were confirmed with the Scott-Knott Means Comparison Test with a significance level of 5%. All accesses studied showed a uniform behavior for the dry oil content variable for the three storage times, indicating that there was no oil synthesis or degradation during the post-harvest period for all accessions.

Keywords: Caiaué. Oil palm. Dendê. *Elaeis guineenses*. Phenotyping. Acidity.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Elaeis* compreende duas espécies principais de Palma de óleo, *Elaeis guineensis*, Jacq. e *Elaeis oleifera* (Kunth, Cortés), originários, respectivamente, da África Ocidental e da América Central e do Sul. Devido ao seu rendimento mais elevado, a palma de óleo Africana, *E. guineensis*, também conhecida por Dendê, é a espécie, predominantemente, utilizada comercialmente.

Apesar da menor produção de óleo da palma de óleo Americana (*E. oleifera*) em relação ao Dendê, também conhecida por Caiaué, tornar essa espécie menos adequada para a produção comercial, sabe-se que ela é resistente a certas pragas comumente encontradas na palma de óleo Africana, é o amarelecimento fatal a doença mais destacada. Além disso, o óleo por ela produzido é de melhor qualidade em termos de acidez, apresenta maiores teores de ácido graxo oleico e linoleico, e de compostos como esteróis e vitaminas (Sambanthamurthi, Sundram et al. 2000). Com isto, o Caiaué tem sido incorporado a programas de melhoramento para a geração de híbridos *E. oleifera* × *E. guineensis* (O×G) (Corley and Tinker 2003). A Embrapa, fazendo uso da hibridação interespecífica entre o Dendê e o Caiaué, desenvolveu o híbrido BRS Manicoré, cultivar tão produtiva quanto o primeiro e com características adicionais do segundo progenitor, como baixo porte e resistência à anomalia amarelecimento-fatal. O óleo desse híbrido também apresenta diferenças composicionais com relação ao de *E. guineensis*.

O programa de melhoramento genético de *Elaeis* spp. da Embrapa iniciou-se na década de 80, quando foi criado o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Caiaué, que conta, hoje, com 328 acessos, e está sob a responsabilidade da Embrapa Amazônia Ocidental (Rios, Cunha et al. 2012). Apesar dos avanços na avaliação agrônômica desses acessos ao longo dos anos, pouco tem sido feito em relação à caracterização do teor de óleo no período pós-colheita. Neste estudo pretende-se avançar na fenotipagem de alguns dos acessos mais promissores de *E. oleifera* utilizados nos cruzamentos em andamento na Embrapa. Além disso, o presente trabalho permite avaliar se existe ou não variabilidade nas características químicas do óleo extraído de frutos de Caiaué provenientes de diversos acessos, ao longo do período de armazenamento do cacho de até 14 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Embrapa Agroenergia, em Brasília - DF, no Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis (LQB). O material de estudo foi coletado no BAG de Caiuá da Estação Experimental do Rio Urubu - da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada a 140 km de Manaus, no município de Rio Preto da Eva/AM, com latitude 2°35' S, longitude 59°28' W e altitude 200 m. O clima de acordo com a classificação de Köppen é do tipo Am: quente úmido, tropical chuvoso, com variação anual de temperatura inferior a 5°C, sem definição de estações verão e inverno. A temperatura média anual é de 27°C, com temperatura média máxima de 32°C e mínima de 21 °C. A umidade relativa média anual é de 85% e a insolação média total anual é de 1.940 horas. A pluviosidade anual média é de aproximadamente 2.100 mm. Segundo a classificação brasileira de solos, o tipo de solo é do tipo Latossolo amarelo de textura muito argilosa 2:1 (Miranda 2001).

2.1 Coleta dos frutos de Caiuá

Dez cachos da palma de óleo Americana (*Elaeis oleifera*) foram coletados de cinco acessos diferentes (Careiro, Anori, Manicoré, Coari e Autazes) e de duas árvores por cada acesso (um cacho por árvore). Os cachos foram espiguetados e os frutos foram coletados das espiguetas em base, meia e ponta para ter uma amostra representativa do cacho. A colheita foi feita em triplicata. Os frutos foram submetidos a diferentes tempos de estocagem em condições ambientais, cada tempo de estocagem (1, 7 e 14 dias após a coleta), finalizado por uma esterilização para inativação enzimática em autoclave a 120 °C e 1 atm., durante 20 min. Na indústria, os cachos são processados no período de até 48 horas após a colheita, por isso foi escolhido um momento dentro (24 horas) e dois fora (7 e 14 dias) do intervalo normalmente utilizado (Figura 1).

2.2 Teor de umidade e teor de óleo

Os frutos esterilizados foram despulpados e pré-secos durante 72 h a 60°C para a determinação do teor umidade, expresso como porcentagem de amostra seca ao ar (ASA), conforme a equação (1) reportada por (Nogueira, Machado et al. 1998):

$$ASA = (M_{\text{polpaseca}} - M_{\text{placa}}) / M_{\text{polpaúmida}} * 100 \quad (1)$$

Tal parâmetro é importante por possibilitar o cálculo de teor de óleo *em base úmida*. Posteriormente, os frutos pré-secos foram moídos em moinho de facas tipo Willye para a

determinação de matéria seca em estufa com circulação e renovação de ar a 105°C (Nogueira, Machado et al. 1998). A análise de matéria seca (MS) consiste em um método gravimétrico, baseado na evaporação da água presente na amostra pela ação do calor, e esta é calculada pela diferença das pesagens entre o recipiente com a amostra úmida e o recipiente com a amostra seca a 105°C. Para cálculo da MS utilizou-se a seguinte equação (2) (Sluiter and Sluiter 2010):

$$\%MS = \left(\frac{Cadinho_{MS} - Cadinho_{inicial}}{Massa_{amostra}} \right) * 100 \quad (2)$$

Com o teor de MS realizou-se a quantificação de óleo em base seca. O teor de matéria seca de uma amostra é usado para converter os resultados analíticos obtidos em base úmida para base seca. O valor de MS foi determinado em triplicata.

O teor de extrato etéreo foi determinado conforme o método Am 5-04 da (AOCS 2005) em equipamento tipo Ankon. Os compostos extraídos são, predominantemente, triglicerídeos. Pequenas quantidades de outros lipídeos junto a menores compostos com alguma solubilidade em éter de petróleo também são extraídas. Essa análise foi feita em triplicata. O teor de extrato etéreo foi calculado pela diferença do peso do saquinho contendo 1-2 gramas de amostra, antes e após a extração com éter de petróleo, conforme demonstrado na seguinte equação (3):

$$\%TeordeExtratoEtéreo = \left(\frac{(M_2 - M_3) * 100}{M_1} \right) \quad (3)$$

Onde:

M_1 = Peso da amostra.

M_2 = Peso da amostra + saquinho após secagem.

M_3 = Peso da amostra seca + saquinho após a extração

Com os dados das análises anteriores foi calculado o teor de óleo em base seca, teor de óleo em base úmida e teor de óleo *em base úmida*, com as seguintes equações (4-6):

$$\%TeordeÓleoemBaseSeca = \left(\frac{TeordeExtratoEtéreo * 100}{\%MS} \right) \quad (4)$$

$$\%TeordeÓleoemBaseÚmida = \left(\frac{TeordeExtratoEtéreo * \%MS}{100} \right) \quad (5)$$

$$\%TeordeÓleoemBaseÚmida = \left(\frac{\%ASA * TeordeÓleoemBaseÚmida}{100} \right) \quad (6)$$

2.3 Extração de óleo para análises de qualidade do óleo

Para realizar a determinação dos ensaios de qualidade do óleo (índice de acidez, teor de carotenoides e perfil de ácidos graxos), o óleo precisa ser, primeiramente, extraído do mesocarpo dos frutos secos. O óleo foi extraído empregando-se um Extrator por Solvente Acelerado marca: Dionex (Thermo Scientific), modelo: ASE350. Foi utilizando éter de petróleo como solvente. Os parâmetros do equipamento foram ajustados na seguinte configuração: 70°C, aquecimento por 5 minutos, 5 ciclos, enxaguar com volume de 100%, purgar 60 segundos. Após a extração, a evaporação do éter foi finalizada em rotaevaporador. O óleo foi mantido em freezer a -20°C, antes da determinação de perfil de ácidos graxos e carotenoides totais. A análise de índice de acidez foi feita no mesmo dia da extração do óleo.

2.4 Determinação de carotenoides totais

Após a extração do óleo do mesocarpo dos frutos de Caiué, foram pesados aproximadamente 20 mg de óleo em um balão volumétrico de 25 mL, e adicionados 10 mL de acetona (Achir, Randrianatoandro et al. 2010), levando-se para homogeneizar por um minuto em um agitador tipo vortex (Biehler, Mayer et al. 2010). O volume do balão foi completado com acetona, e a leitura foi feita, imediatamente, em espectrofotômetro ultravioleta/visível marca: Perkin Elmer, modelo: Lambda 35, a um comprimento de onda de 450 nm. Essa análise foi feita em duplicata técnica, e em sextuplicata biológica (a colheita foi feita em triplicata para cada uma das duas árvores por acesso) para as amostras de Caiué, esterilizadas um dia após a coleta. A concentração de carotenoides totais foi determinada conforme a seguinte equação (7):

$$CarotenoidesTotais \left(\frac{\mu g}{g} \right) = \left(\frac{(A_{450nm} * Y * 10^4)}{A_{1cm}^{1\%} * M} \right) \quad (7)$$

Onde:

A = Absorbância no pico máximo de absorção;

Y = Volume da solução que deu uma absorbância a 450 nm;

$A^{1\%}_{1\text{cm}}$ = Coeficiente de absorção do β -caroteno em acetona (2620);

M = Peso da amostra

2.5 Determinação do perfil de ácidos graxos

Os triglicerídeos presentes nas amostras de óleo extraído do mesocarpo dos frutos de Caiuaú foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), a tomada de amostra de 20 mg e a metilação foram realizadas com BF_3 , e, subsequentemente, foram analisados com o uso do Cromatógrafo a gás com detector FID Marca: Shimadzu, modelo GC-2010 Plus AF. O resultado foi expresso em porcentual relativo de ácidos graxos presentes na amostra, conforme a metodologia reportada pela American Oil Chemists' Society nos métodos 58-17.01 e 58-18.01 (AOCS 2005).

2.6 Determinação do índice de acidez

A determinação do índice de acidez, expresso em mg KOH por g de óleo das amostras de óleo de frutos de Caiuaú, foi feita por titulação potenciométrica seguindo a metodologia reportada pela American Oil Chemists' Society no método Cd 3d-63, em titulador automático Marca: Metrohm, modelo: Titrand 907. As análises de acidez foram realizadas no período de, no máximo, 24h após a extração do óleo. Os valores foram expressos como porcentagem de ácido oleico, o principal ácido graxo presente no óleo de palma Americana, dividindo por dois o valor total do índice de acidez (mg KOH/g de óleo) (AOCS 2005).

2.7 Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando o programa *Statistics* versão 5.0 (1995) (Tulsa, OK, EUA). Para a análise das variáveis perfil de ácidos graxos, carotenoides totais e ASA, foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições biológicas. Para a análise das variáveis acidez, teor de óleo em base seca e teor de óleo *em base úmida*, foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial, com 18 repetições para a acidez e 6 repetições para as variáveis de teor de óleo em base seca e *em base úmida*. Avaliaram-se os efeitos dos 5 acessos e do tempo de estocagem dos frutos até a inativação enzimática (1, 7 e 14 dias). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR 5.6. As tendências foram consideradas significativas quando as médias dos grupos comparados diferiram em $p < 0,05$. Finalmente, foi feita uma correlação entre o índice de acidez e outras variáveis analisadas, utilizando o teste de correlação de Pearson. A partir dos componentes da variância, foram estimados os parâmetros genéticos de herdabilidade no

sentido amplo (h^2), os coeficientes de variação genética (CV_g), ambiental (CV_e) e a razão entre os coeficientes de variação genética e ambiental (CV_g/CV_e) para os caracteres estudados, utilizando-se o programa GENES.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de óleo em base seca, teor de óleo em base úmida

Para a análise de teor de óleo em base seca, verificou-se que a produção de óleo dos acessos manteve-se constante ao longo do armazenamento (Tabela 1. Letras maiúsculas), indicando que não houve síntese ou degradação de óleo durante o período pós-colheita para todos os acessos (Tabela 1. Letras minúsculas). Adicionalmente, o teor de óleo em base seca foi estatisticamente equivalente entre a maioria dos acessos, independentemente do tempo de armazenamento, indicando uniformidade fenotípica para esta variável, com exceção de Anorí (no dia 1 e 7 de estocagem) e Autazes (no dia 7).

Quanto ao teor de óleo em base úmida, variável que se relaciona com o rendimento industrial da extração, este variou entre 19,77% e 39,79% (Tabela 2). De acordo com a análise de variância, foi observado que houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os materiais genéticos avaliados e o número de dias após a coleta (Tabela Suplementar 1). Foi verificado que o acesso Anorí apresentou a menor quantidade, independentemente do tempo transcorrido para a esterilização dos frutos. O acesso Coarí apresentou o maior teor de óleo, sete dias após a coleta. Entretanto, esse teor foi estatisticamente equivalente ao observado no Acesso Manicoré e também no acesso Careiro sete dias após a coleta.

Todos os acessos estudados apresentaram comportamento uniforme para a variável amostra seca ao ar ($p > 0,05$) (Tabela Suplementar 1). Contudo, esses valores foram superiores nas amostras autoclavadas sete dias após a coleta. Isso ocorreu, devido à perda de umidade para o ambiente, durante o período de armazenamento. Esse comportamento pode ser explicado pela mudança na composição do fruto durante o período de armazenamento.

Os valores da herdabilidade entre as médias dos acessos estudados evidenciam possibilidade de sucesso na seleção para a variável ASA (83,15%). Esse valor reflete presença do componente genético na expressão desse caráter. De acordo com Falconer (1975), é necessário o mínimo de 80,0% para obter ganhos genéticos satisfatórios com a seleção. Os resultados alcançados a partir dos parâmetros genéticos indicam que a razão CV_g/CV_e é inferior a 1,0 nos parâmetros estudados (Tabela Suplementar 2), indicando que há uma menor contribuição dos fatores genéticos que dos ambientais nas estimativas das correlações fenotípicas entre os caracteres estudados.

O teor de óleo do mesocarpo dos frutos em base seca e em base úmida são parâmetros importantes na avaliação do material genético da palma de óleo, devido à relação com o rendimento de óleo. No ensaio aqui descrito, o teor de óleo em base úmida e em base seca

para os cinco acessos de *E. oleifera* estudados variaram entre 19,77-33,60% e 31,36-48,54%, respectivamente. Cadena, Prada et al. (2013) reportaram os teores de óleo em base seca e em base úmida para uma coleção genética de *E. oleifera* de diferentes locais da zona central Colombiana (Figura 2). Os valores médios do teor de óleo em base úmida foram menores ($13,6\pm 2,3\%$) do que os valores reportados nesse estudo da coleção de germoplasma oriunda da Amazônia Brasileira. Observou-se o mesmo comportamento no teor de óleo em base seca ($26,3\pm 4,0\%$); que pode ser atribuído às diferenças nas condições climatológicas e geográficas existentes. Esses autores também reportaram os teores de óleo em base úmida e base seca para as variedades comerciais de *E. guineensis* var. tenera e palmeiras de uma coleção de germoplasma de Angola. Os resultados de teor de óleo em base úmida apresentaram maior média ($54,7\pm 2,1\%$) do que os híbridos OxG ($47,0\pm 1,6\%$) e do que as palmas de *E. oleifera* tanto para o germoplasma Brasileiro quanto para o Colombiano. Resultados semelhantes foram observados para o teor de óleo em base seca, que apresentou valores médios de $78,0\pm 1,9\%$ para *E. guineensis* e $71,5\pm 0,8\%$ para híbridos OxG e para *E. oleifera* 21,4-30,9% (Figura 2). Esses resultados indicam que as palmas de *E. oleifera* contêm menor teor de óleo tanto em base seca quanto em base úmida, apesar do fato de que *E. oleifera* apresenta melhor qualidade de óleo. O baixo teor de óleo no mesocarpo dessas plantas é considerado uma característica negativa em termos de rendimento de óleo.

3.2 Carotenoides totais

Os carotenoides, cujo nome é derivado do fato de que constituem o principal pigmento na raiz da cenoura, *Daucus carota*, são sem dúvida, os pigmentos mais importantes em organismos vivos. Eles estão presentes em vários óleos vegetais, incluindo o óleo de milho, de amendoim, de soja, de linhaça, de oliva, de cevada, de girassol, de algodão, entre outros. A concentração de carotenoides nesses óleos vegetais é, geralmente baixa, inferior a 100 ppm (Ong and Tee 1992). O óleo de palma contém a maior concentração de carotenoides entre os óleos vegetais mais amplamente consumidos (Tan 1989). De fato, o óleo de palma bruto é a fonte natural mais rica de carotenos no mundo, em termos de retinol equivalente (provitamina A). Esse óleo contém cerca de 15 a 300 vezes mais do que o retinol equivalente proveniente de cenouras, vegetais de folhas verdes e tomates, que são considerados por ter quantidades significativas de provitamina A (Ng and Tan 1988). São esses carotenoides os que conferem essa cor vermelho-alaranjada ao óleo de palma bruto.

O teor de carotenoides totais do óleo extraído a partir do mesocarpo dos frutos dos diferentes acessos de Caiuá esterilizados, após 24h da colheita, variou entre 1526,68 e

3343,56 ppm, como se apresenta na Tabela 3. A Anova mostrou que existe diferença altamente significativa entre os acessos de Caiuá para a variável teor de carotenoides totais ($p < 0,05$), essa informação foi confirmada com o teste de comparação de médias Scott-Knott com um nível de 5% de significância (Tabela Suplementar 1).

Os valores da herdabilidade entre as médias dos acessos estudados evidenciam grandes possibilidades de sucesso na seleção para a variável carotenoides totais (97,79%). Esse valor de alta magnitude reflete considerável presença do componente genético, na expressão desse caráter. Os resultados alcançados, a partir dos parâmetros genéticos, indicam que a razão CV_g/CV_e é superior a 1,0 nos parâmetros estudados (Tabela Suplementar 2), indicando que há uma maior contribuição dos fatores genéticos que das ambientais nas estimativas das correlações fenotípicas entre os caracteres estudados. Essas informações serão de grande valia para os programas de melhoramento da palma de óleo.

O acesso Anorí contém a concentração mais elevada de carotenoides (3343,56 ppm) entre os cinco acessos estudados. Os acessos Manicoré, Coarí e Autazes apresentaram valores do teor de carotenoides estatisticamente similares, de 1526,68, 1694,93 e 1737,43 ppm, respectivamente. Estudos com o óleo da palma Americana mostram que essa espécie contém uma maior concentração de carotenos de 4.600 ppm do que a palma Africana (Yap, Choo et al. 1991).

Estudos do óleo de palma extraído de frutos provenientes do extremo oriente da África e da República Democrática do Congo contém 500-800 ppm de carotenos, enquanto o óleo de palma da Costa do Marfim e Benin contém 1,000-1,600 ppm, mas o rendimento de óleo é menor (May 1994). Óleo extraído a partir da variedade Tenera, que é amplamente plantada na Malásia, tem um teor de carotenoides de 500-700 ppm (Choo, Yap et al. 1992). Híbridos de *E. oleifera* x *E. guineensis* também produzem óleos com altas concentrações de carotenoides. Os seguintes valores têm sido encontrados para o teor total de carotenoides presentes no óleo de diferentes espécies, variedades e híbridos: *E. guineensis* var. Pisifera (P), 428 ppm; var. Dura (D), 997 ppm; *E. oleifera* (O), 4592 ppm; híbrido O X P. 1430 ppm; O x D, 2.324 ppm (Choo, Yap et al. 1992). Estudos da composição do óleo de palma da Malásia determinados com HPLC reportam que os principais carotenos presentes no óleo de *E. guineensis* proveniente da variedade Tenera (dura x pisifera) são α -carotenos e β -carotenos, que compreendem cerca de 90% dos carotenos totais presentes. Contudo, existem outros carotenos presentes em menores quantidades, tais como: fitoeno, licopeno, ζ -caroteno, δ -caroteno, γ -caroteno, neurosporeno, fitoflueno, α -zeacaroteno e β -zeacaroteno. Além disso, esses estudos reportam que o teor de carotenoides totais do óleo extraído de fibras residuais de palma da variedade Tenera contém

entre 3600 e 5050 ppm (Chooet al. 1996). Estudos da composição do óleo de Caiaué reportam que os principais carotenos presentes são α -carotenos e β -carotenos, participando com 40,38 e 54,08 ppm da composição total de carotenoides respectivamente, seguidos de Licopeno (7,81 ppm), Fitoeno (2,49 ppm), fitoflueno (1,24 ppm), cis- β -caroteno (0,15 ppm), cis- α -caroteno (0,86 ppm), z-caroteno (2,00 ppm), d-caroteno (2,00 ppm) g-caroteno (1,16 ppm), Neurosopreno (0,77 ppm), β -zeacaroteno (0,56 ppm), α -zeacaroteno (0,30 ppm) (Yap, Choo et al. 1991).

Os carotenos da classe C40 de hidrocarbonetos poli-insaturados, que conferem uma cor característica laranja-vermelho ao óleo de palma, são importantes para a fisiologia humana. Em particular, os α -carotenos e β -carotenos são conhecidos pela atividade da sua provitamina A porque podem ser transformados em vitamina A *in vivo*; além disso, o composto licopeno é um efetivo antioxidante. Estudos epidemiológicos, realizados na década de 1980, associaram fortemente o β -caroteno com a prevenção de certos tipos de câncer, como o câncer oral, faríngeo, pulmonar e estomacal (Suda, Schwartz et al. 1986, Temple and Basu 1988, Murakoshi, Takayasu et al. 1989). Além disso, um estudo também indicou que o β -caroteno possui um efeito antiaterosclerótico, porque é capaz de baixar os níveis de plaquetas nas artérias (Gaziano, Manson et al. 1990). Esses compostos presentes no óleo de palma Americana são, portanto, potentes ativos para uso nas indústrias de fármacos com amplas propriedades medicinais e nutricionais.

3.3 Perfil de ácidos graxos

Os principais ácidos graxos (AG) encontrados no mesocarpo dos frutos de cinco acessos de *E. oleifera* foram os seguintes (Tabela 4): ácido oleico C18:1 (os acessos apresentaram valores entre 45,91 e 53,56%), ácido palmítico C16:0 (25,73-29,26%), ácido linoleico C18:2 (13,45-18,26%), seguido por ácido esteárico C18:0 (1,40-3,63%) e ácido cis-vacênico C18:1 (1,32-3,18%). Os outros ácidos graxos (C14:0, C16:1 e C18:3) foram encontrados em traços (concentração <1% dos ácidos graxos totais). A análise de variância (Tabela Suplementar 3) mostrou que existe uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a composição de AG dos acessos de *E. oleifera*. Além disso, a análise de parâmetros genéticos indicou que a maioria dos AG (C18:3, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2) encontrados no óleo de Caiaué apresentaram valores da razão CVg/CVe, superiores a 1,0 (Tabela Suplementar 4), sugerindo que há uma maior contribuição dos fatores genéticos que das ambientais nas estimativas das correlações fenotípicas entre os caracteres estudados.

Os AG saturados mirístico (encontrado apenas no acesso Manicoré), esteárico e palmítico, respondem em conjunto por 28,26% a 30,09% dos AG totais no óleo de todos os acessos de Caiuá avaliados. Os AG monoinsaturados detectados em todos os acessos foram: palmitoleico, oleico e cis-vacênico, variando entre 49,86% e 57,31% dos AG totais; além de dois AG poli-insaturados com 18 carbonos, que são: linoleico (14,35-19,24%) e linolênico (em traços). Esses resultados coincidem com o perfil de AG do óleo da polpa de frutos de *E. oleifera* descritos na literatura (Montoya, Lopes et al. 2013) (Figura 3) onde os teores totais de AG saturados (27,00%), AG monoinsaturados (57,3%) e AG poli-insaturados (15,7%) foram próximos aos valores reportados neste estudo (Tabela 4). Bora, Rocha et al. (2003), em um estudo do óleo da polpa de frutos de *E. guineensis*, obtidos de palmeiras do Estado da Paraíba, da região Nordeste do Brasil, apresentaram concentrações diferentes no perfil de AG comparadas com o perfil de *E. oleifera* descritas neste estudo, indicando que o teor total de AG monoinsaturados (45,73%) é próximo ao teor total dos AG saturados (42,79%), sendo o ácido palmítico (36,9%) (Bora, Rocha et al. 2003), o composto principal. No presente estudo, o AG monoinsaturado oleico (valor médio dos acessos é de 49,56%) é o composto predominante em *E. oleifera* (Figura 3). Outros estudos reportaram que a composição de AG do óleo de frutos de palma Africana coletados na Malásia é, aproximadamente de 50% AG saturados, 40%, mono-insaturados e 10% poli-insaturados (Tan and Oh 1981).

O padrão de identidade da composição de AG do óleo de palma estabelecido pelo Codex Alimentarius é reportado na Tabela 4 (FAO/WHO 1999), indicando que o teor do ácido monoinsaturado oleico que foi o AG predominante em frutos de Caiuá pode ser achado em valores entre 36 e 44%. Neste estudo, os valores do teor do ácido oleico foram superiores a este valor padrão (45,91-53,56%). O Codex também estabelece que o teor de ácido palmítico pode ser encontrado em valores entre 39,3 e 47,5; neste estudo o teor deste AG foi encontrado em valores inferiores (25,73-29,26%). Uma das grandes questões sobre a introdução de uma nova espécie na produção mundial de óleo de palma é o diferente perfil de ácidos graxos, e isso é um fator negativo para a espécie *E. oleifera* por não cumprir com os parâmetros internacionais exigidos para óleos vegetais.

Entre os AG poliinsaturados, a concentração de ácido linoléico (C18:2) no óleo da polpa foi maior no acesso Autazes (18,26%) quando comparada com Careiro (13,45%). No entanto, o acesso Careiro apresentou a maior concentração total de AG insaturados (71,66%), seguido de Coarí com 70,58%. Esses óleos também continham pequenas quantidades de ácido linolênico (C18:3) (0,53%-0,98%). O ácido linoleico é sensível à oxidação e à deterioração térmica (Bora, Rocha et al. 2003). Em relação à razão de ácido oleico-linoleico, o óleo que

apresentou melhor estabilidade e vida útil foi o óleo do acesso Careiro (aprox. 4). Os AG saturados com 12, 14 e 16 átomos de carbono são conhecidos por serem os principais responsáveis por elevar o colesterol no sangue e, assim, causar doenças cardiovasculares, o C14 (Ácido mirístico) o principal responsável (Grundy 1989). Por outro lado, o alto teor de AG monoinsaturados, especialmente o ácido oleico (18:1), está associado a uma baixa incidência de doença arterial coronariana, porque diminui o colesterol total (10%) e a lipoproteína de baixa densidade (Grundy 1989, Cintra, Costa et al. 2006).

Os resultados do óleo de polpa de Caiuê em todos os acessos mostraram um maior teor de ácidos graxos insaturados conferindo estado líquido à temperatura ambiente. Esses resultados da composição do perfil dos AG determinarão o destino final do óleo na indústria. O óleo de palma pode ser fracionado em dois componentes, após o refino: a oleína (60%) e a estearina (40%). A oleína é um óleo líquido, composto, principalmente, por ácidos graxos e tem propriedades emolientes e lubrificantes. Após processamento para purificação dos ácidos graxos, sobretudo por destilação, possui aplicações na indústria de tintas e diluentes, alimentos, cosméticos e oleoquímicos em geral. A estearina por seu maior grau de saturação pode ser utilizada como gordura na indústria de bolos e biscoitos, serve, também, como matéria prima para a fabricação de margarinas, maioneses e sorvetes. Além disso, pode substituir o sebo na produção de sabões e sabonetes (Mba, Dumont et al. 2015).

3.4 Índice de acidez

Neste estudo, foi avaliada a formação de AGL nas amostras de óleo de palma Americana de diferentes acessos do BAG de Caiuê da Embrapa, coletados na Amazônia Brasileira, em diferentes tempos de estocagem dos frutos a temperatura ambiente. Os resultados estão ilustrados na Tabela 5. Há uma variabilidade importante entre as amostras dos diferentes acessos submetidos aos três tempos de estocagem quanto ao índice de acidez avaliado. Além disso, a interrelação acesso x tempo apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Tabela Suplementar 1). Essas análises foram confirmadas com o teste de comparação de médias Scott-Knott com um nível de significância de 5%. Os valores mais elevados para o teor de AGL foram registrados para amostras do acesso Anorí (Tabela 5), em todos os tempos de estocagem avaliados. O acesso Manicoré mostrou o menor valor de AGL para todos os tempos avaliados.

O efeito do tempo de estocagem no teor de AGL é apresentado na Tabela 6. Um aumento contínuo do teor de AGL foi registrado para todos os acessos, durante as primeiras duas semanas de armazenamento. A maior taxa de incremento foi atribuída às amostras de

Careiro que aumentaram 258% no período de 1 a 14 dias de estocagem, passando de 0,53 para 1,33%; no entanto o maior aumento na formação de AGL ocorreu entre o primeiro e o sétimo dia de estocagem (taxa de aumento: 111%). Esse comportamento foi observado em todos os acessos (Tabela 6). Variações estatisticamente significativas aconteceram durante o primeiro e o último dia de armazenamento para as amostras de todos os acessos avaliados.

O teor de AGL é o critério mais utilizado para determinar a qualidade do óleo de palma, o qual não deve exceder o 5% expresso como ácido palmítico no caso de *E. guineensis*; e, no caso de *E. oleifera*, expresso como ácido oleico (por serem os AG maioritários), de acordo com as normas estabelecidas no Codex Alimentarius (FAO/OMS 2005). Os ácidos graxos estão presentes, geralmente, no óleo como parte das moléculas de triacilgliceróis. A presença de ácidos graxos livres no óleo de palma é indicativo da deterioração da qualidade do óleo. Esse processo é essencialmente atribuído à atividade das lipases presentes no mesocarpo dos frutos do óleo de palma, as quais são responsáveis pela hidrólise dos triacilglicerídeos (Henderson and Osborne 1991, Sambanthamurthi, Let et al. 1991, Ebongue, Dhoub et al. 2006). A lipase é ativada na maturidade dos frutos, ou decorrente de ferimentos ou contusões.

Estudos têm verificado que a atividade das lipases endógenas pode variar entre diferentes linhagens, identificando-se algumas com atividade lipolítica muito baixa. O óleo de palma bruto extraído dos frutos de linhagens com baixa atividade lipolítica também mostrou uma baixa taxa de AGL/Teor de acidez de óleo (Ebongue, Koona et al. 2008). Os AGL também podem ser gerados por lipases contaminantes de microrganismos (Hiol, Jonzo et al. 2000, Abbas, Hiol et al. 2002). No sentido de limitar a atividade das lipases, os cachos de frutos frescos devem ser processados rapidamente após a colheita. Para todos os acessos de Caiuê utilizados neste estudo, os valores de acidez das amostras estavam abaixo do limite de 5%. Esses resultados confirmam a teoria que estabelece que o óleo de Caiuê possui uma melhor qualidade do óleo (Cadena, Prada et al. 2013). A esterilização rápida dos cachos a altas temperaturas inativa rapidamente as lipases, limitando assim a acumulação subsequente de AGL no óleo de palma. Em alguns casos, os cachos coletados podem ser mantidos à temperatura ambiente, durante uma semana ou mais, antes de serem processados.

Outros autores estudaram a formação de AGL no óleo de frutos provenientes de diversos Acessos de *E. guineensis*, *E. oleifera* e híbridos OxG submetidos a temperaturas baixas (5 e -20°C), e observaram que a máxima formação de AGL ocorreu a 5°C, com formação de 47% e 29% em *E. guineensis* e no híbrido OxG, respectivamente. No caso de *E. oleifera*, esses autores reportaram a formação de AGL<1%, não observando mudanças nas

diferentes temperaturas avaliadas, estes resultados coincidem com os dados reportados neste estudo para os frutos de Caiuá submetidos à esterilização, após as 24 horas da coleta (Cadena, Prada et al. 2013). Esses autores também identificaram os maiores níveis de AGL em *E. guineensis* após o armazenamento dos frutos a 5°C (70%). Além disso, Ebongue, Dhoub et al. (2006) mostraram a produção de 55% de AGL, após a submissão dos frutos a ciclos de congelamento/descongelamento. Esses autores sugerem que o efeito pode ser causado pelo dano que geram as temperaturas de congelamento nos tecidos do mesocarpo dos frutos. A ruptura de oleosomas libera as enzimas associadas à membrana e aumenta a disponibilidade dos triacilglicerídeos (substrato) armazenados nas mesmas organelas (Ebongue, Dhoub et al. 2006). No presente trabalho, foi testado um protocolo de coleta e conservação pré-análise, para garantir que a temperatura de conservação não interferisse na representação do valor real dos ácidos graxos livres presentes. As amostras só foram congeladas após a autoclavagem, e foi verificado que, nesse caso, as amostras não sofriam alteração no teor de acidez, uma vez que as lipases já tinham sido inativadas.

O efeito nocivo da fermentação é a contínua produção de AGL no mesocarpo do fruto sob a ação da lipase. Uma vez que os frutos são processados, a lipase não é mais ativa, mas o teor dos AGL do óleo de palma resultante também pode aumentar durante o armazenamento como resultado da hidrólise autocatalítica. Nesse caso, os AGL atuam como catalisadores para a reação entre triacilgliceróis e água para gerar mais AGL (Albert, Laverdure et al. 2011). A Tabela 6 descreve claramente o processo de aumento do teor de AGL das amostras de óleo de palma Americana nas duas primeiras semanas de armazenamento onde pode ter ocorrido a reação de hidrólise autocatalítica. Os estudos de (Albert, Laverdure et al. 2011) reportam que existe uma correlação positiva ($r=0,76$) entre o teor de AGL e o teor de umidade em óleo de frutos de *E. guineensis*, sugerindo limitar o teor de AGL e de umidade do óleo de palma bruto antes do armazenamento em longo prazo. É pouco provável que a hidrólise autocatalítica ocorra abaixo do nível de 0,1% de umidade recomendado pelas normas do Codex Alimentarius (FAO/OMS 2005).

Os resultados apresentados mostraram que o teor de AGL tem diferenças estatisticamente significativas entre os acessos de Caiuá estudados, indicando que não existe uniformidade fenotípica para essa característica entre os acessos mais representativos da diversidade genética no BAG de Caiuá da Embrapa. Manicoré foi o acesso que apresentou o teor de AGL mais baixo para todos os tempos de estocagem avaliados. Por outro lado, observou-se que o teor de AGL aumentou continuamente durante as duas semanas (em taxas superiores a 100%) de armazenamento dos frutos, para uma subsequente esterilização.

Na produção de óleo em grande escala, os cachos são processados no período de até 48 horas após a colheita e o conteúdo de AGL varia de 3-4%, por outro lado, na produção em pequena escala proveniente dos pequenos agricultores, esse conteúdo pode chegar a 9-15% (Gibon, De Greyt et al. 2007). Considerando que só os produtores em grande escala podem ter acesso aos processos de refino e que o óleo de palma dos pequenos produtores pode tardar várias semanas para chegar ao local de extração, gerando um óleo com altos níveis de AGL inadequado para o consumo humano, isso faz com que o óleo de palma produzido por pequenos agricultores não possa ser competitivo, especialmente em mercados internacionais. Na figura 4, foi ilustrada uma comparação do teor de acidez (%AGL) da coleção de acessos de *E. oleifera* oriundos da Amazônia Brasileira caracterizados neste estudo, com uma coleção Africana de *Elaeis guineensis* reportada na literatura (Morcillo, Cros et al. 2013). Observou-se que o teor de acidez do óleo extraído, a partir de cachos maduros processados após os 12 dias da colheita, é, consideravelmente, maior nos acessos de *E. guineensis* (%AGL \approx 6,5%). Esses resultados indicam, claramente, que os acessos de *E. oleifera* permitirão tempos mais prolongados para o processamento dos cachos.

Tabela 1 - Comparação das médias pelo teste de Scott-Knott no nível de 5% de significância do teor de óleo em base seca (%) dos acessos de *Elaeis oleifera* do BAG de Caiuá da Embrapa.

Teor de óleo em base seca (%)		
Acesso	Dia 1	Dia 7
Careiro	47,25 \pm 8,00 Aa	45,67 \pm 5,77 Aa
Anorí	31,36 \pm 2,90 Ba	34,59 \pm 2,39 Ca
Manicoré	46,82 \pm 4,60 Aa	45,62 \pm 1,67 Aa
Coarí	48,54 \pm 2,18 Aa	50,34 \pm 8,07 Aa
Autazes	42,96 \pm 2,74 Aa	41,46 \pm 1,99 Ba

Fonte: Do autor (2017).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação entre o tempo (linha), fixados os níveis do fator Acesso, empregaram-se letras minúsculas e para a comparação entre os acessos (coluna), fixados os níveis do fator tempo, utilizaram-se letras maiúsculas.

Tabela 2 - Comparação das médias pelo teste de Scott-Knott no nível de 5% de significância do teor de óleo *em base úmida* (%) dos acessos de *Elaeis oleifera* do BAG de Caiuê da Embrapa.

Teor de óleo em base úmida (%)		
Acesso	Dia 1	Dia 7
Careiro	33,60 ± 6,69 Aa	35,49 ± 3,48 Aa
Anorí	19,77 ± 2,57 Cb	29,21 ± 3,11 Ba
Manicoré	31,79 ± 4,33 Ab	37,68 ± 2,30 Aa
Coarí	31,51 ± 2,01 Ab	39,79 ± 3,38 Aa
Autazes	26,47 ± 3,93 Bb	31,78 ± 3,47 Ba

Fonte: Do autor (2017).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação entre o tempo (linha), fixados os níveis do fator Acesso, empregaram-se letras minúsculas e para a comparação entre os acessos (coluna), fixados os níveis do fator tempo, utilizaram-se letras maiúsculas.

Tabela 3 - Teor de carotenoides ($\mu\text{g/g}$ de óleo ou ppm) do óleo extraído a partir do mesocarpo de frutos coletados de diferentes acessos de *Elaeis oleifera* do BAG de Caiuê da Embrapa.

Acessos	Teor de carotenoides totais (ppm)
Careiro	2200,63 ± 242,67 b
Anori	3343,56 ± 411,61 a
Manicoré	1694,93 ± 202,85 c
Coarí	1526,68 ± 225,25 c
Autazes	1737,43 ± 202,11 c

Fonte: Do autor (2017).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância.

Tabela 4 - Perfil de AG do óleo da polpa dos frutos de diferentes acessos de *Elaeis oleifera* do BAG de Caiuá da Embrapa.

Ácidos graxos (AG)	Porcentagem do total de ácidos graxos					Padrão Codex
	Careiro	Anorí	Manicoré	Coarí	Autazes	
AG Saturados	28,26	30,66	30,08	29,43	30,9	
Mirístico	A. Tetradecanoico (C14:0) Tr	Nd	0,14±0,18a	Nd	Nd	0,5-2,0
Estearíco	A. Octadecanoico (C18:0) 2,53±0,46b	1,40±0,12c	1,65±0,05c	1,48±0,03c	3,63±0,28a	3,5-6,0
Palmitíco	A. Hexadecanoico (C16:0) 25,73± 3,38a	29,26±2,12a	28,29±1,18a	27,95±0,56a	27,27±0,24a	39,3-47,5
AG Monoinsaturados	57,31	50,25	54,16	53,64	49,86	
Palmitoleico	A. Hexadecenoico (C16:1) 1,27±0,22a	1,16±0,38a	0,78±0,02b	1,29±0,24a	0,64±0,25b	Nd-0,6
Oleico	A. 9-Octadecenoico (C18:1) 53,56±6,73a	45,91±0,72b	50,91±2,64a	49,56±0,29b	47,90±0,48b	36,0-44,0
Cis-vacênico	A. (E)-11-Octadecenoico (C18:1) 2,48±0,23c	3,18±0,13a	2,47±0,04c	2,79±0,20b	1,32±0,04d	Nd
AG Poliinsaturados	14,35	18,79	15,75	16,94	19,24	
Linoléico	A. 9,12-Octadecadienoico (C18:2) 13,45±3,21b	17,81±1,11a	15,00±1,35b	16,41±0,40a	18,26±0,69a	9,0-12,0
Linolênico	A. 9,12,15-Octadecatrienoico (C18:3) 0,90±0,28b	0,98±0,06b	0,75±0,02c	0,53±0,18d	0,98±0,04b	Nd-0,5

Tr: Traços (concentração <0,06% dos ácidos graxos totais)

Nd: Não detectado definido como 0,05%

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância.

Fonte: Do autor (2017).

Tabela 5 - Teor de ácidos graxos livres (AGL) (Medias ± DS, n=18), expresso como porcentagem de ácido oleico, dos diferentes acessos de *Elaeis oleifera* do BAG de Caiuá da Embrapa, submetidos a diferentes tempos de estocagem após a coleta.

Teor de Ácidos graxos livres (%)			
Acessos	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Careiro	0,53 ± 0,11 Bc	1,12 ± 0,18 Ab	1,90 ± 0,62 Ba
Anorí	0,88 ± 0,14 Ac	1,31 ± 0,21 Ab	2,66 ± 1,09 Aa
Manicoré	0,52 ± 0,03 Bc	0,86 ± 0,11 Bb	1,33 ± 0,35 Ca
Coarí	0,53 ± 0,10 Bc	0,88 ± 0,18 Bb	1,55 ± 0,55 Ca
Autazes	0,63 ± 0,10 Bc	1,14 ± 0,29 Ab	1,93± 0,92 Ba

Fonte: Do autor (2017).

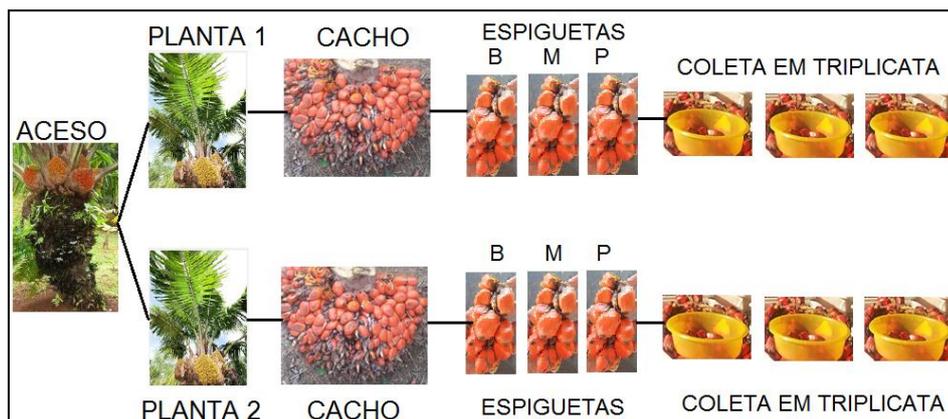
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação entre o tempo (linha), fixados os níveis do fator Acesso, empregaram-se letras minúsculas e para a comparação entre os acessos (coluna), fixados os níveis do fator tempo, utilizaram-se letras maiúsculas.

Tabela 6 - Taxa de incremento (%) da formação de AGL nos diferentes tempos de estocagem avaliados para os cinco diferentes acessos de *Elaeis oleifera* do BAG de Caiaué da Embrapa.

Taxa de incremento de % AGL			
Acessos	1 - 7 Dias	7 - 14 Dias	1 - 14 Dias
Careiro	111%	70%	258%
Anorí	49%	103%	202%
Manicoré	65%	55%	156%
Coarí	66%	76%	192%
Autazes	81%	69%	206%

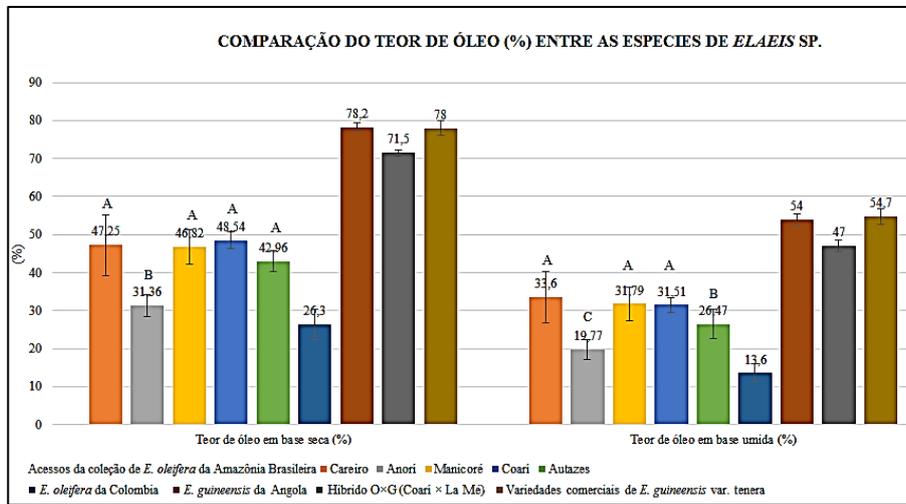
Fonte: Do autor (2017).

Figura 1 - Desenho experimental da colheita de frutos de Caiaué coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Estação Experimental do Rio Urubu - EMBRAPA/CPAA



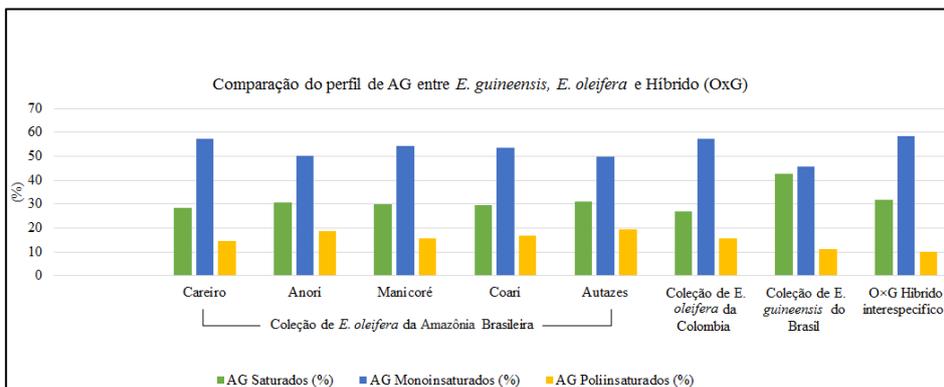
Fonte: Do autor (2017).

Figura 2 - Comparação do teor de óleo em base seca e base úmida (%) dos acessos de *E. oleifera* com os valores reportados na literatura das duas espécies do género *Elaeis* (*Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera*) e o híbrido interespecífico O×G (Coarí × La Mé) (Cadena *et al.* 2013).



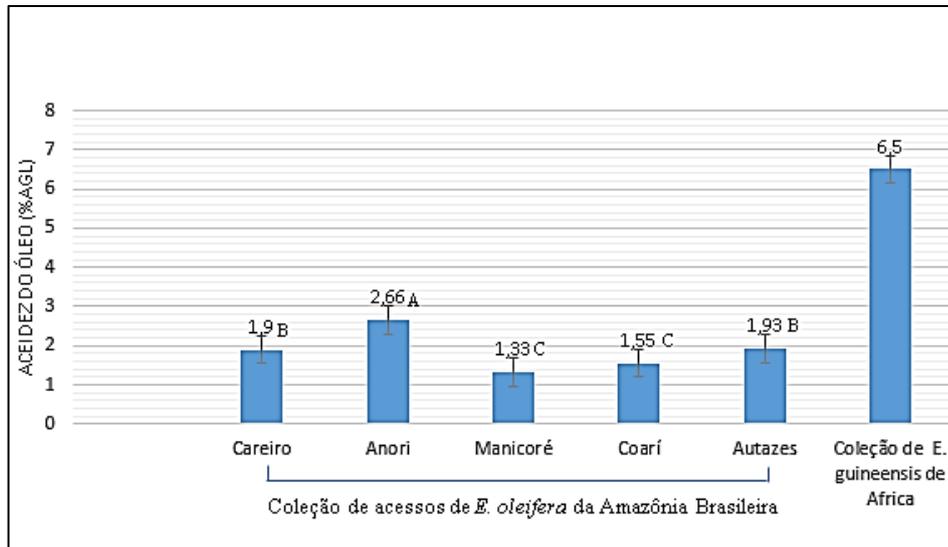
*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância ± o desvio padrão. Todos os valores reportados correspondem ao dia 1 de estocagem e esterilização dos frutos.
 Fonte: Do autor (2017).

Figura 3 - Comparação do perfil de AG dos acessos de *E. oleifera* com os valores reportados na literatura das duas espécies do género *Elaeis* (*Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera*) e o híbrido interespecífico O×G (Bora, Rocha *et al.* 2003, Montoya, Lopes *et al.* 2013).



Fonte: Do autor (2017).

Figura 4 - Comparação do teor de acidez (%AGL) dos acessos de *E. oleifera* com os valores reportados na literatura das duas espécies do género *Elaeis* (*Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera*).



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância \pm o desvio padrão. Os valores de %AGL do óleo foram reportados quando os cachos maduros foram processados após os 12 dias de colheita (Morcillo, Cros et al. 2013).

Fonte: Do autor (2017).

4 CONCLUSÃO

Neste estudo avançou-se na fenotipagem de alguns dos acessos mais promissores de *Elaeis oleifera* utilizados nos cruzamentos em andamento na Embrapa, com o fim de promover um uso mais eficiente desse recurso genético para a geração de híbridos interespecíficos superiores.

O óleo extraído do mesocarpo dos frutos de cinco acessos de Caiaué do BAG da Embrapa, submetidos a diferentes tempos de estocagem, foi caracterizado, por meio de análises químicas, do tipo: teor de óleo *em base úmida*, teor de umidade, índice de acidez, teor de carotenoides totais, e perfil de ácidos graxos. Verificou-se, com isso, que existe variabilidade estatística fenotípica entre esses acessos oriundos da Amazônia Brasileira para a maioria das variáveis analisadas: teor de óleo em base úmida, índice de acidez, perfil de ácidos graxos e teor de carotenoides totais. No entanto, os resultados apresentaram uniformidade fenotípica para as variáveis: teor de óleo em base seca (independentemente do tempo de armazenamento), e teor de umidade (amostra seca ao ar), são estes valores superiores nas amostras autoclavadas sete dias após a coleta, devido à perda de umidade para o ambiente durante o período de armazenamento.

Os acessos que apresentaram melhores características em termos de alto rendimento foram Coarí e Careiro, e, em termos de baixa acidez, foram Manicoré e Coarí, essas duas características são as mais importantes, na hora de selecionar os melhores genótipos para futuros trabalhos de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- Abbas, H., et al. (2002). "Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit." Enzyme and microbial technology **31**(7): 968-975.
- Achir, N., et al. (2010). "Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment." European Journal of Lipid Science and Technology **112**(3): 349-361.
- Albert, M. M. E., et al. (2011). "Assessment of the quality of crude palm oil from smallholders in Cameroon." Journal of Stored Products and Postharvest Research **2**(3): 52-58.
- Altschul, S. F., et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic acids research **25**(17): 3389-3402.
- Andrade, E. d. (1983). "Relatório de expedição para coleta de germoplasma de caiaué [*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés] na Amazônia brasileira." EMBRAPA/CNPDS, Manaus.
- AOCS, A. O. C. S. (2005). Official methods and recommended practices of the AOCS. .
- Atadashi, I., et al. (2012). "Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks." Renewable and Sustainable Energy Reviews **16**(5): 3275-3285.
- Barcelos, E. (1986). Características genético-ecológicas de populações naturais de caiaué (*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés) na Amazônia Brasileira.
- Bergamin Filho, A., et al. (1998). "Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia." Fitopatologia brasileira **23**(3): 391-396.
- Biehler, E., et al. (2010). "Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables." Journal of food science **75**(1): C55-C61.
- Boari, A. d. J. (2008). "Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil." Embrapa Amazônia Oriental. Documentos.
- Bora, P. S., et al. (2003). "Characterization of principal nutritional components of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis*) fruits." Bioresource technology **87**(1): 1-5.
- Borém, A. G. L., et al. (2009). Domesticacao e melhoramento.: especies amazônicas.
- Cadena, T., et al. (2013). "Lipase activity, mesocarp oil content, and iodine value in oil palm fruits of *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, and the interspecific hybrid O \times G (*E. oleifera* \times *E. guineensis*)." Journal of the science of food and agriculture **93**(3): 674-680.
- Carter, C., et al. (2007). "Palm oil markets and future supply." European Journal of Lipid Science and Technology **109**(4): 307-314.
- Cintra, D. E., et al. (2006). "Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin." Nutrition **22**(2): 197-205.

- Corley, R. (2009). "How much palm oil do we need?" Environmental Science & Policy **12**(2): 134-139.
- Corley, R., et al. (2009). La palma de aceite. v. 31, no. Especial Tomo I (2010), p 278-290, Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite, Fedepalma [Colombia].
- Corley, R. and P. Tinker (2003). "The classification and morphology of the oil palm." The Oil Palm 4th Edn. BS Ltd. Blackwell Publishing: 27-51.
- Corley, R. and P. Tinker (2003). "Selection and breeding." The oil palm. 4th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd Blackwell Publishing: 133-200.
- Cunha, R. and R. Lopes (2010). "BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento-fatal." Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental.
- Choo, Y.-M., et al. (1996). "Recovered oil from palm-pressed fiber: a good source of natural carotenoids, vitamin E, and sterols." Journal of the American Oil Chemists' Society **73**(5): 599-602.
- Choo, Y., et al. (1992). Production of palm oil carotenoid concentrate and its potential application in nutrition. Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications, Springer: 243-254.
- Dransfield, J., et al. (2005). "A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae." Kew Bulletin: 559-569.
- Ebongue, G. F. N., et al. (2008). "Identification of oil palm breeding lines producing oils with low acid values." European Journal of Lipid Science and Technology **110**(6): 505-509.
- Ebongue, G. N., et al. (2006). "Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp." Plant Physiology and Biochemistry **44**(10): 611-617.
- Falconer, D. S. (1975). Introduction to quantitative genetics, Pearson Education India.
- FAO/OMS, C. A. C. (2005). Normes alimentaires pour huiles et graisses. . F. O. CODEX-STAN 210.
- FAO/WHO, C. A. C. C. a. R. F. a. A. O. o. t. U. N. J. (1999). "Codex standard for named vegetable oils." Codex Stan **210**: 1999.
- Faostat, F. (2016). "Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (2014)." Production Available in: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> [Review date: April 2015].
- Ferreira Filho, J. A. (2015). "Caracterização de sítios polimórficos e sequências repetitivas, e estabelecimento de coleção nuclear de caiaué [*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés]."
- Gaziano, J., et al. (1990). Beta-carotene therapy for chronic stable angina. Circulation, AMER HEART ASSOC 7272 GREENVILLE AVENUE, DALLAS, TX 75231-4596.

- Ghesquiere, M., et al. (1987). "Enzymatic polymorphism in *Elaeis oleifera* HBK (*E. melanococca*). Analysis of populations in the Amazon Basin." Oleagineux (France).
- Gibon, V., et al. (2007). "Palm oil refining." European Journal of Lipid Science and Technology **109**(4): 315-335.
- Grundy, S. M. (1989). "Monounsaturated fatty acids and cholesterol metabolism: implications for dietary recommendations." The Journal of nutrition **119**(4): 529-533.
- Hartley, C. W. S. (1967). "The oil palm." The oil palm.
- Henderson, J. and D. J. Osborne (1991). "Lipase activity in ripening and mature fruit of the oil palm. Stability in vivo and in vitro." Phytochemistry **30**(4): 1073-1078.
- Hiol, A., et al. (2000). "Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit." Enzyme and microbial technology **26**(5): 421-430.
- Lubrano, C. and J. Robin (1997). "Major compounds study in fruit pulp oils of 6 Guiana palms species." Acta Botanica Gallica (France).
- May, C. Y. (1994). "Palm oil carotenoids." Food Nutr Bull **15**(2).
- Mba, O. I., et al. (2015). "Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry—A review." Food bioscience **10**: 26-41.
- Meunier, J. (1975). "Le" palmier a huile" americain *Elaeis melanococca*.(The American" oil palm" *Elaeis melanococca*)." Oléagineux **30**(2): 51-61.
- Michielse, C. B. and M. Rep (2009). "Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*." Molecular plant pathology **10**(3): 311-324.
- Miranda, I. P. (2001). Frutos de palmeiras da Amazônia, Presidência da República, Ministério da Ciência e Tecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Mohankumar, C. and C. Arumughan (1990). "Histological localization of oil palm fruit lipase." Journal of the American Oil Chemists' Society **67**(10): 665-669.
- Montoya, C., et al. (2013). "Quantitative trait loci (QTLs) analysis of palm oil fatty acid composition in an interspecific pseudo-backcross from *Elaeis oleifera* (HBK) Cortés and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)." Tree genetics & genomes **9**(5): 1207-1225.
- Morcillo, F., et al. (2013). "Improving palm oil quality through identification and mapping of the lipase gene causing oil deterioration." Nature communications **4**.
- Moretzsohn, M. d. C., et al. (2000). "RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)." Theoretical and Applied Genetics **100**(1): 63-70.

- Murakoshi, M., et al. (1989). "Inhibitory effects of α -carotene on proliferation of the human neuroblastoma cell line GOTO." Journal of the National Cancer Institute **81**(21): 1649-1652.
- NCBI, R. C. (2013). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information." Nucleic acids research **41**(Database issue): D8.
- Ng, J. and B. Tan (1988). "Analysis of palm oil carotenoids by HPLC with diode-array detection." Journal of chromatographic science **26**(9): 463-469.
- Nogueira, A. d. A., et al. (1998). Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos, EMBRAPA-CPPSE.
- Nurniwalis, A., et al. (2015). "Genomic structure and characterization of a lipase class 3 gene and promoter from oil palm." Biologia Plantarum **59**(2): 227-236.
- Ong, A. S. and E. Tee (1992). "[14] Natural sources of carotenoids from plants and oils." Methods in enzymology **213**: 142-167.
- Ooi, S., et al. (1981). "Oil palm genetic resources native *Elaeis oleifera* populations in Brazil offer promising sources [African oil; Plant breeding; Cross-breeding; Hybrid progenie]." Pesquisa Agropecuaria Brasileira (Brazil).
- Rajanaidu, N. (1986). *Elaeis oleifera* collection in Central and South America. International Workshop on Oil Palm Germplasm and Utilisation, Bangi, Selangor (Malaysia), 26-27 Mar 1985, IPMKSM.
- Ramos, E., et al. (2006). "Potencial produtivo de híbridos interespecíficos entre dendezeiro e caiauezeiro nas condições do nordeste paraense." Embrapa Amazônia Oriental. Documentos.
- Rios, S. d. A., et al. (2012). "Recursos genéticos da palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caiaué (*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés)." Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental.
- Sambanthamurthi, R., et al. (1991). "Chilling-induced lipid hydrolysis in the oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp." Journal of experimental botany **42**(9): 1199-1205.
- Sambanthamurthi, R., et al. (1995). "Factors affecting lipase activity in *Elaeis guineensis* mesocarp." Plant Physiology and Biochemistry (Paris) **33**(3): 353-359.
- Sambanthamurthi, R., et al. (2000). "Chemistry and biochemistry of palm oil." Progress in lipid research **39**(6): 507-558.
- Singh, R., et al. (2013). "Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds." Nature **500**(7462): 335-339.
- Sluiter, J. and A. Sluiter (2010). "Summative mass closure—LAP review and integration: feedstocks (NREL/TP-510-48087)." National Renewable Energy Laboratory, Golden.
- Suda, D., et al. (1986). "Inhibition of experimental oral carcinogenesis by topical beta carotene." Carcinogenesis **7**(5): 711-715.

Tan, B. (1989). Palm carotenoids, tocopherols and tocotrienols, AMER OIL CHEMISTS SOC 1608 BROADMOOR DRIVE, CHAMPAIGN, IL 61821-0489.

Tan, B. and C. Oh (1981). "Oleins and stearins from Malaysian palm oil-chemical and physical characteristics." Palm Oil Research Institute of Malaysia Technology.

Temple, N. J. and T. K. Basu (1988). "Does beta-carotene prevent cancer? A critical appraisal." Nutrition research **8**(6): 685-701.

Torres, G., et al. (2010). "First report of bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on African oil palm in Colombia." Plant Disease **94**(9): 1163-1163.

Wong, Y., et al. (2015). "Screening of wild oil palm (*Elaeis guineensis*) germplasm for lipase activity." The Journal of Agricultural Science: 1-12.

Yap, S., et al. (1991). "Quantitative analysis of carotenes in the oil from different palm species." Elaeis.

Tabela Suplementar 1 - Análises de variância das variáveis: teor de óleo em base seca, teor de óleo em base úmida, amostra seca ao ar (ASA), teor de carotenoides totais e teor de acidez.

Teor de óleo em base seca (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Tempo	1	0,3362	0,3362	0,016	0,9013
Genótipo	4	1966,6712	491,6678	22,72	9,7E-11***
Tempo*Genótipo	4	59,0402	14,76	0,682	0,6077
Resíduo	50	1081,9966	21,6399		
Total	59	3108,0442			
Teor de óleo em base úmida (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Tempo	1	569,091	569,091	40,612	5,8E-08***
Genótipo	4	1098,1453	274,5363	19,592	9,4E-10***
Tempo*Genótipo	4	103,0271	25,7568	1,838	0,1362
Resíduo	50	700,6408	14,0128		
Total	59	2470,9042			
ASA (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	312,1	78,04	5,935	0,0017**
Resíduo	25	328,7	13,15		
Total	29	640,8			
Teor de carotenoides totais (µg/g de óleo)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	13084769	3271192	45,3	4,2E-11***
Resíduo	25	1805245	72210		
Total	29	14890014			
Teores de acidez (mg KOH/g de óleo)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Tempo	2	72,2806	36,1403	191,923	<2E-16***
Genótipo	4	16,2408	4,0602	21,562	2,5E-15***
Tempo*Genótipo	8	6,4282	0,8035	4,267	7,9E-05***
Resíduo	255	48,0182	0,1883		
Total	269	142,9677			

***: Diferença estatisticamente significativa a 0,1%.

Fonte: Do autor (2017).

Tabela Suplementar 2 - Parâmetros populacionais do teor de carotenoides totais e ASA de óleo de acessos de Caiaué.

Parâmetros	Teor de carotenoides totais (ppm)	ASA (%)
h_a^2 (%)	97,79	83,15
CV_g (%)	34,76	4,8
CV_e (%)	12,79	5,3
CV_g/CV_e	2,72	0,91

h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo; CV_g : coeficiente de variação genético e CV_e : coeficiente de variação ambiental.

Fonte: Do autor (2017).

Tabela Suplementar 3 - Análises de variância d variável perfil de ácidos graxos.

Ácido graxo mirístico (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	0,0915	0,0229	2,951	0,0398*
Resíduo	25	0,1938	0,0078		
Total	29	0,2853			
Ácido graxo palmítico (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	41,45	10,363	2,93	0,0408*
Resíduo	25	88,42	3,537		
Total	29	129,87			
Ácido graxo palmitoleico (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	2,138	0,5345	8,464	0,0002***
Resíduo	25	1,579	0,0632		
Total	29	3,717			
Ácido graxo esteárico (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	21,627	5,407	87,87	2,4E-14***
Resíduo	25	1,538	0,062		
Total	29	23,165			
Ácido graxo oléico (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	203,7	50,94	4,799	0,0052**
Resíduo	25	265,3	10,61		
Total	29	469			
Ácido graxo cis-vacênico (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	11,56	2,8894	129	2,6E-16***
Resíduo	25	0,56	0,0224		
Total	29	12,12			
Ácido graxo linoléico (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	95,5	23,875	8,548	0,0002***
Resíduo	25	69,82	2,793		
Total	29	165,32			
Ácido graxo linolênico (%)					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Genótipos	4	1,8241	0,456	20,05	1,7E-07***
Resíduo	25	0,5686	0,0227		
Total	29	2,3927			

***; ** e *: Diferença estatisticamente significativa a 0,1; 1 e 5%, respectivamente.

Fonte: Do autor (2017).

Tabela Suplementar 4 - Parâmetros populacionais do perfil de ácidos graxos do óleo de Caiué

Parâmetros	C14:0	C18:3	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C16:0	C18:1Δ
h_a^2 (%)	66,12	95,01	88,18	98,86	99,23	88,3	65,87	79,16
CV_g (%)	140,04	30,26	27,3	44,16	28,24	11,58	3,85	5,23
CV_e (%)	245,55	16,98	24,47	11,61	6,11	10,32	6,79	6,57
CV_g/CV_e	0,57	1,78	1,12	3,8	4,62	1,12	0,57	0,8

h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo; CV_g : coeficiente de variação genético e CV_e : coeficiente de variação ambiental. C14:0: Mirístico; C18:3: linolênico; C16:1: palmitoleico; C18:0: esteárico; C18:1: cis-vacênico; C18:2: linoléico; C16:0: palmítico e C18:1 Δ: oleico.

Fonte: Do autor (2017).

**ARTIGO 2 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE LIPASES
POTENCIALMENTE RESPONSÁVEIS PELA ACIDIFICAÇÃO DO ÓLEO DE
PALMA (*Elaeis* SPP.)**

**Maria Daniela España¹, Andrei Stecca Steindorff², Alexandre Alonso Alves³, Eduardo
Fernandes Formighieri⁴, Manoel Teixeira Souza Junior⁵**

Formatação do artigo baseada na NBR 6022 (ABNT, 2003).

-
- 1 Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: maria.espana.g@gmail.com
 - 2 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901, Brasília, DF. E-mail: andreistecca@gmail.com
 - 3 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901, Brasília, DF. E-mail: alexandre.alonso@embrapa.br
 - 4 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901, Brasília, DF. E-mail: eduardo.formighieri@embrapa.br
 - 5 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº - W3 Norte (final), CEP 70770-901, Brasília, DF. E-mail: manoel.souza@embrapa.br

RESUMO

A qualidade do óleo de palma é afetada pela acidificação. A acidificação é resultante da atividade das lipases (triacilglicerol acilhidrolases número EC 3.1.1.3), que hidrolisam rapidamente os triglicerídeos liberando ácidos graxos livres (AGL) no mesocarpo de frutos maduros e/ou machucados. Os AGLs levam ao enraçamento do óleo, o que é rejeitado pela indústria. Por isso, há a necessidade de removê-los, durante o processo de refino; o que aumenta, conseqüentemente, os custos de produção. Por isso, é preciso identificar e caracterizar as possíveis fontes responsáveis pela atividade das lipases no mesocarpo dos frutos da palma de óleo, uma vez que na palma de óleo Americana ainda não foi feita essa identificação. Neste estudo, objetivou-se avançar na identificação e caracterização *in silico* de lipases putativas relacionadas com a acidificação do óleo da palma Americana (*Elaeis oleifera*) e da palma Africana (*E. guineensis*). Para isso, foram identificadas nos genomas dessas palmeiras as lipases contendo o domínio Pfam PF017 (TAG classe 3) ou o domínio Pfam PF00657 (classe GDSL), que apresentam, respectivamente, o motivo Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly (situado na região central) ou o motivo Gly-Asp-Ser-Leu-Ser (localizado próximo à região N-terminal da proteína). Essa busca foi feita utilizando os dados genômicos públicos de *E. guineensis* EG5 e os dados privados do Draft de *Elaeis oleifera* “Manicoré” (versão 1.0 e 2.0); este último sequenciado pela Embrapa Agroenergia. Foram detectados seis genes ortólogos (três em *E. guineensis* e três em *E. oleifera*), e foi feita uma análise filogenética agrupando-os pela ancestralidade. Foi também realizada uma caracterização do tamanho, posição, número de éxons e íntrons dos genes para distinguir as principais diferenças entre eles. Em suma, foi predita a existência *in silico* de duas classes de lipases (classe 3 e GDSL) nas duas espécies do gênero *Elaeis*, sugere-se que estes são os possíveis responsáveis pela acidificação do óleo de palma; o que permitirá, no futuro, a identificação e validação de marcadores moleculares específicos para a seleção precoce de genótipos de baixa acidez.

Palavras-chave: Lipases putativas. EgLip1. GDSL. GxSxG. *Elaeis oleifera*.

ABSTRACT

The quality of palm oil is affected by acidification. Acidification is the result of lipase activity (triacylglycerol acylhydrolases EC number 3.1.1.3), which rapidly hydrolyze the triglycerides releasing free fatty acids (FFA) in the mesocarp of ripe and/or bruised fruits. The FFAs lead to oil rancidity, which is rejected by the industry. Therefore, there is a need to remove them during the refining process; thus increasing production costs. For that it is necessary to identify and characterize the source responsible for lipase activity in the palm oil fruit mesocarp, and in the American palm oil this identification has not been made yet. The objective of this study was to identify and characterize *in silico* putative lipases related to acidification of American palm oil (*Elaeis oleifera*) and African palm oil (*E. guineensis*). For this, the lipases containing the Pfam PF017 domain (TAG class 3) or the Pfam domain PF00657 (GDSL class), which have the Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly motif in the central region) or the Gly-Asp-Ser-Leu-Ser motif (located near the N-terminal region of the protein). This search was done using the public genomic data of *E. guineensis* EG5 and the private data of the *Elaeis oleifera* "Manicoré" draft (version 2.0); the latter sequenced by Embrapa Agroenergia. Six orthologous genes were detected (three in *E. guineensis* and three in *E. oleifera*), and a phylogenetic analysis was done grouping them by ancestry. A characterization of size, position, number of exons and introns of the genes was also performed to distinguish the main differences between them. In summary, it was predicted the *in silico* existence of two classes of lipases (class 3 and GDSL) in the two species of the genus *Elaeis*, suggesting that these are the possible responsible for the acidification of oil palm; which will allow in the future the identification and validation of specific molecular markers for the early selection of low acidity genotypes.

Keywords: Putative lipases. EgLip1. GDSL. GxSxG. *Elaeis oleifera*.

1 INTRODUÇÃO

Elaeis oleifera, também conhecida como palma de óleo Americana ou Caiaué, possui algumas características agronômicas de grande interesse para o melhoramento genético de *E. guineensis*; esta última conhecida como palma de óleo Africana ou Dendê. O Caiaué se caracteriza por ter crescimento mais lento, melhor qualidade do óleo (principalmente pelo elevado teor de ácidos graxos insaturados), resistência a doenças e menor acidez do óleo, quando comparado com o Dendê (Barcelos 1986, Moretzsohn, Ferreira et al. 2002). Sabe-se que *E. oleifera* apresenta menor rendimento de óleo. No entanto, uma vez que as duas espécies hibridizam facilmente, podem ser obtidos híbridos interespecíficos OxG com rendimentos em torno de 90% das produções comerciais de *E. guineensis*; mas estes híbridos, geralmente, apresentam esterilidade parcial (Amblard, Noiret et al. 1995). Os trabalhos de melhoramento genético realizados na Embrapa são focados, essencialmente, na produção de híbridos entre essas duas espécies. Nesses híbridos, deseja-se combinar, principalmente, a alta produtividade da palma de óleo Africana com a resistência ao principal problema limitante dessa cultura, que é o amarelecimento fatal (AF); esta última característica proveniente do Caiaué (Cunha e Lopes 2010). Além da resistência a doenças, é de interesse dos melhoristas de plantas o porte reduzido de *E. oleifera* (Corley and Tinker 2003) e a qualidade do seu óleo, pois é sabido que este apresenta uma baixa taxa de acidez (% ácidos graxos livres AGL) quando comparado com o óleo de Dendê (Cadena, Prada et al. 2013).

O índice de acidez é o parâmetro principal para medir a qualidade do óleo, pois a presença de AGL no óleo de palma é um indicativo da deterioração da qualidade do mesmo, tornando-o inadequado para o consumo humano. Esse processo é essencialmente atribuído à atividade das lipases (triacilglicerol acilhidrolases número EC 3.1.1.3) presentes no mesocarpo dos frutos do óleo de palma, as quais são responsáveis pela hidrólise dos triacilglicerídeos; são ativas na maturidade dos frutos ou decorrente de fermentos ou contusões (Henderson and Osborne 1991, Sambanthamurthi, Let et al. 1991, Ebongue, Dhouib et al. 2006).

Morcillo, Cros et al. (2013) identificaram no mesocarpo dos frutos de *E. guineensis* um cDNA, denominado EgLIP1 (número de acesso no GenBank JX556215), que codifica uma proteína com forte indício de homologia com a lipase de mamona (*Ricinus communis* L.); isto é, com 34,6% de identidade e 51,8% de similaridade. Consequentemente, foi sugerido que EgLip1 codifica para uma lipase do mesocarpo dos frutos da palma de óleo Africana. Em outros estudos, Nurniwalis, Zubaidah et al. (2015) caracterizaram, mais

amplamente, essa lipase, em termos de expressão e da região promotora, denominando-a, ao final do estudo de FLL1 (Full-length Lipase class 3). No entanto, os genes responsáveis pela atividade das lipases no mesocarpo dos frutos de *E. oleifera* ainda não foram identificados ou caracterizados.

Neste estudo, buscou-se identificar e caracterizar lipases putativas presentes nestas duas espécies de palma de óleo, mediante o mapeamento da lipase EgLip1 no Draft “Manicoré” (Versão 1.0 e 2.0 - sequenciado pela Embrapa Agroenergia, não publicado), com o uso das ferramentas de alinhamento do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Também foram mapeados os domínios funcionais de duas classes de lipases putativas Pfam PF017 (TAG classe 3) e Pfam PF00657 (classe GDSSL) nos genomas de *E. guineensis* (Singh, Low et al. 2013) e de *E. oleifera*. A partir desta informação, foi construída uma análise filogenética, agrupando as proteínas de acordo com sua similaridade por meio do Blastp bi-direcional com o programa OrthoFinder, seguido de uma clusterização e alinhamento das proteínas com o programa Muscle, para detectar ortólogos putativos. As árvores filogenéticas foram feitas utilizando o programa FastTreeMP. Por fim, estes genes ortólogos foram caracterizados estruturalmente em termos de: tamanho, posição, número de éxons e íntrons dos genes e comparação da posição dos motivos conservados na região promotora com o uso do programa MEME (<http://meme-suite.org/>), isso foi feito para distinguir as principais diferenças entre os genes que correspondem ao ortogrupo que contém a lipase EgLip1 do mesocarpo de frutos da palma de óleo Africana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bancos de dados genômicos

Foram utilizados dados genômicos do banco de dados público de *E. guineensis* EG5 sequenciado por Singh et al. (2013); e uma montagem local (Versão 1.0 e 2.0) do Draft do genoma de *Elaeis oleifera* do acesso da Amazônia Brasileira “Manicoré”, que pertence ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa (Illumina Hiseq2000, montadas com AllPaths-LG, dados não publicados), sequenciado pela Embrapa Agroenergia.

2.2 Identificação *in silico* da lipase EgLip1 no genoma de *Elaeis oleifera*

Inicialmente, foram usados os dados genômicos do Draft “Manicoré” (Versão 1.0), para mapear o gene EgLip1 que codifica para uma lipase em *Elaeis guineensis*; para isso foi feito um alinhamento com as ferramentas do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (salvo descrição contrária, foram utilizados os parâmetros padrão dos programas) (Altschul, Madden et al. 1997). Foi utilizada a análise TBLASTN, alinhando a sequência de aminoácidos da lipase EgLip1 (query), contra o banco de dados privado do Draft do genoma de *E. oleifera* (subject). Esse procedimento gerou três hits com os melhores resultados de identidade (>70%), E-value (<1e⁻⁵), e cobertura do alinhamento (Qcovs >70%). Subsequentemente, foi feita uma análise BLASTX para todas as regiões candidatas selecionadas como possíveis homólogos do gene EgLip1 contra as bases de dados públicas de proteína: Swissprot (www.expasy.org), Non redundant protein sequences (nr) (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/about/nonredundantproteins), Representative genomes (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/representative/), para localizar o número de correspondências de lipases putativas anotadas dentro da montagem de *E. oleifera*. Os melhores resultados do algoritmo BLASTX foram levados em consideração para selecionar a região do genoma e delimitar a estrutura dos genes potencialmente homólogos ao EgLIP1 em *Elaeis oleifera*.

2.3 Análise filogenética dos ortogrupos

A inferência do agrupamento dos ortólogos por ancestralidade entre as duas espécies de *Elaeis* foi feita com o uso do programa OrthoFinder (Versão 0.6.1) (Emms e Kelly. 2015), que agrupa as proteínas de acordo com sua similaridade (Blastp bi-direcional), seguido de uma clusterização, utilizando cadeias de Markov (MCL), detectando, assim, genes potencialmente ortólogos e parálogos. As proteínas contidas no *cluster* (ortogrupo), no qual

foi identificado o gene EgLip1 de *E. guineensis*, foram utilizadas para a construção do alinhamento com o programa Muscle v.3.8.31, e a árvore filogenética foi construída utilizando o programa FastTreeMP (Versão 2.1.7) (Price, Dehal et al. 2010). Finalmente, foi feita uma caracterização destes genes ortólogos das duas espécies quanto à localização e ao tamanho do gene, à posição e ao número de éxons e íntrons, e o alinhamento da região promotora entre os pares ortólogos, utilizando neste caso o programa MEME (<http://meme-suite.org/>).

2.4 Análise comparativa de genes sob seleção positiva

O alinhamento das sequências que codificam para lipases no cluster de EgLip1 foi utilizado para avaliar o tipo de seleção que está agindo sobre esses genes. O programa codeml in PAML v4.8 (Yang 2007) foi utilizado para o cálculo da dN/dS entre cada par de genes, e, também, para analisar se e quais sítios estavam sob seleção positiva, para isso foram utilizados os modelos M0 (uma taxa de seleção), M3 (discreto), M7 (beta), and M8 (beta& ω), seguidos de um teste de máxima verossimilhança (LTR).

2.5 Identificação dos domínios funcionais das classes de lipases GDSL e classe 3 (GxSxG) nas duas espécies de *Elaeis*

Uma segunda abordagem foi utilizada para confirmar os dados obtidos, mediante emprego de montagem, anotada com o programa MAKER, do Draft local (Versão 2.0) do genoma de *E. oleifera* da Embrapa. Os proteomas oriundos dos genomas de *E. guineensis* (EG5) e *E. oleifera* (Versão 2.0 do Draft) foram utilizados para identificar todas as lipases, potencialmente relacionadas com a acidificação do óleo nessas espécies, e que pertencem à classe contendo o domínio Pfam PF01764 (TAG classe 3), com o motivo Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly situado na região central, ou as que pertencem à classe PF00657 (GDSL), com o motivo Gly-Asp-Ser-Leu-Ser localizado próximo à região N-terminal da proteína. A identificação desses domínios foi feita utilizando o programa interProScan v5, com o banco de dados PFAM 29.0. As sequências desses domínios funcionais foram recortadas e utilizadas para reconstrução da filogenia de cada classe de lipases (alinhamento com Muscle v.3.8.31), e, por fim, foi construída a árvore filogenética utilizando o programa FastTreeMP (Versão 2.1.7) (Price, Dehal & Arkin, 201).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Mapeamento da lipase EgLip1 e identificação de ortólogos

O cDNA denominado EgLip1 (Número de acesso GenBank: JX556215), que codifica para uma lipase responsável pela acidificação do óleo de palma Africana (*Elaeis guineensis*) (Morcillo, Cros et al. 2013), foi alinhado mediante uma análise Tblastn contra o genoma privado de *E. oleifera* (Versão 1.0, sem anotar). Esses resultados apresentaram três hits com os melhores resultados: scaffold_13030 (70% identidade, 93% positivos que indicam similaridade), scaffold_4142 (78% identidade, 86% positivos) scaffold_518 (60% identidade, 76% positivos). Subsequentemente, os resultados da análise Blastx para os melhores hits mostraram que existe similaridade entre três pares de genes ortólogos das duas espécies de *Elaeis* correspondentes a lipases putativas.

Essa informação preliminar, obtida com o uso da versão 1.0 do draft do genoma de *E. oleifera*, foi confirmada com a versão 2.0 anotada do draft desse genoma. Os resultados do alinhamento da montagem anotada indicaram que existe grande similaridade (98% identidade, 98% positivos) entre a lipase do mesocarpo de *E. guineensis* (cDNA da EgLip1) e a sua homóloga (nominada EoLip1) encontrada em *E. oleifera* (ID Local: *manico_050454-RA*), no entanto, na Figura Suplementar S1, observou-se que há uma região ao início do gene altamente não conservada, inferindo que pode ter ocorrido uma inserção de 45 aminoácidos no gene EoLip1 (ou deleção no gene EgLip1) após a especiação, isso é uma possível fonte de variação na expressão gênica dessa lipase putativa na palma de óleo Americana. Outra possível explicação a essa região que não está presente em EgLip1 pode ser atribuída a um erro na montagem anotada do Draft “Manicore” da versão 2.0 feita de forma totalmente automatizada com o programa MAKER. Além disso, esses resultados confirmaram que existe homologia entre os ortólogos de lipases putativas encontrados nas duas espécies de *Elaeis*. O ortólogo 1 (nominado EoOrtoLip1_1) de *E. oleifera* (ID Local: *manico_050454-RA*) apresentou 97% de identidade e 97% de positivos, indicando forte similaridade com o cDNA LOC105041960 traduzido (nominado EgOrtoLip1_1) de *E. guineensis* (Número de acesso GenBank: XM_010919035) (Fig. Suplementar. S2). Enquanto que o ortólogo 2 (nominado EoOrtoLip1_2) de *E. oleifera* (ID Local: *manico_031553-RA*) apresentou 98% de identidade e 98% de positivos (similaridade) com o cDNA LOC105041962 traduzido (nominado EgOrtoLip1_2) de *E. guineensis* (Número de acesso GenBank: XM_010919037) (Fig. Suplementar. S3).

3.2 Análise comparativa de genes sob seleção positiva

Os três pares de ortólogos das duas espécies de *Elaeis* foram agrupados de acordo com sua homologia (blastp bi-direcional). A análise filogenética (Figura 1) das proteínas do ortogrupo (*cluster*) que contem EgLip1 permitiu analisar a ancestralidade deles, evidenciando que os genes ortólogos de *E. oleifera* e *E. guineensis* vêm de um ancestral em comum e que pertencem à mesma linhagem evolutiva, sugerindo que esses homólogos putativos podem apresentar funções conservadas. Para confirmar essa informação, foi feita uma análise de seleção (Tabela 1) exibindo que todos esses ortólogos de espécies divergentes estão sob pressão negativa $dN/dS < 1$, pois é esperado que quando essa razão é menor do que a unidade, a seleção natural suprime as mutações na proteína. Essa interpretação intuitiva de dN/dS é suportada por um estudo teórico sobre a relação entre a estatística dN/dS e a pressão de seleção subjacente no modelo Wright-Fisher (Kryazhimskiy and Plotkin 2008).

3.3 Caracterização estrutural dos genes ortólogos

Uma vez selecionada a região do genoma e delimitada a estrutura dos genes potencialmente homólogos ao EgLip1 em *Elaeis oleifera*, foi feita uma caracterização desses genes correspondentes ao ortogrupo (*cluster* apresentado na Figura 1), quanto à localização, tamanho do gene, tamanho do mRNA, número e tamanho de éxons e íntrons, e posição da região 5' UTR e 3' UTR (somente para os genes de *E. guineensis*, pois ainda não se tem dados do transcriptoma de *E. oleifera*). Também foi feita uma análise comparativa do tamanho das proteínas e as posições do motivo conservado “GxSxG” próprio das lipases classe 3. Além disso, foram identificados os resíduos de aminoácidos do sítio ativo das enzimas putativas e sua posição na proteína. Esses resultados são apresentados na Tabela 2. Na figura 3, apresenta-se a posição dos genes parálogos no cromossomo 3 (NC_025995.1) de *E. guineensis* e a distância entre seus éxons e íntrons. Por outro lado, na figura 4, apresenta-se o tamanho dos genes ortólogos de lipases putativas identificadas em *E. oleifera*.

Na Tabela 2, exibe-se a predição da posição do domínio funcional conservado, da superfamília funcionalmente diversa das α/β hidrolases (Número de Acesso: c121494) da base de dados “*Conserved Domains Database (CDD)*” do NCBI (Marchler-Bauer, Bo et al. 2016) para o ortogrupo que contém ao gene EgLip1. Esses resultados indicam que o gene EoLip1, e os outros genes ortólogos do mesmo cluster contêm a sequência consenso própria das lipases [LIV]X[LIVAFY][LIAMVST]G[HYWV]SXG[GSTAC], sugerindo que correspondem a lipases putativas homólogas ao gene EgLip1 que codifica para uma lipase altamente conservada da classe 3 com o domínio Pfam ID: PF10764. Esse domínio conservado das α/β

hidrolases contém as proteases, lipases, peroxidases, esterases, epóxido hidrolases e deshalogenases, apresenta em comum uma tríade catalítica dos seguintes resíduos: uma serina (S), um glutamato (E) ou aspartato (D) e uma histidina (H), na qual, muitas vezes, o mecanismo envolve um ataque nucleofílico sobre o átomo de carbono carbonilo.

Neste estudo, foram detectadas similaridades nas regiões envolvidas na atividade catalítica das lipases entre os pares de genes homólogos, como nos três resíduos de aminoácidos potenciais que constituem a tríade catalítica, e, também, na sequência consenso do sítio ativo das lipases. Os genes homólogos EoLip1 e EgLip1 apresentaram as mesmas posições para a tríada catalítica. O resíduo da serina (S) foi detectado na posição 353, o resíduo do ácido aspártico (D) na posição 414, e a posição do resíduo da histidina (H) foi predito na locação 509; assim, como houve semelhança na posição do sítio ativo para os genes homólogos EoLip1 e EgLip1 [TE]P[F]NA[QDWSTDVD], baseado nos alinhamentos das sequências consenso (Figura Suplementar 1). Essas similaridades, nessas regiões, também ocorreram para os dois pares de ortólogos do mesmo cluster onde foi identificado o gene EgLip1 (Figuras Suplementares 2 e 3).

O alinhamento da região promotora (3,0 Kb upstream ao ATG) dos possíveis genes homólogos permitiu distinguir as principais diferenças entre os genes ortólogos (Figuras Suplementares 4, 5 e 6). Observou-se que há uma grande diferença na posição inicial dos motivos conservados na região promotora dos genes EgLip1 e EoLip1 (Figura Suplementar 1); essa diferença pode, fundamentalmente resultar, em variação na regulação da expressão desses genes que são, potencialmente, responsáveis pela acidificação do óleo de palma.

Como reportado no Capítulo 2 deste estudo, existe uma grande diferença fenotípica quanto à acidificação do óleo entre as duas espécies de *Elaeis* sp. A caracterização *in silico* permitiu comparar os seis ortólogos encontrados, que foram agrupados e clusterizados dentro do domínio funcional próprio das lipases da classe 3, onde foi identificado o gene EgLip1, para detectar as principais diferenças estruturais entre eles. Essa é uma informação útil a futuros estudos de regulação da expressão gênica e de fenotipagem (para correlacionar esses genes com a diferença na acidificação do óleo das duas espécies de palma).

3.4 Identificação das Lipases GDSL e classe 3 (GxSxG)

Foram identificados os domínios funcionais Pfam das duas classes de lipases (GDSL e classe 3), relacionadas com a acidificação do óleo de palma reportados na literatura (Morcillo, Cros et al. 2013, Nurniwalis, Zubaidah et al. 2015, Wong, Kushairi et al. 2016), nos proteomas oriundos dos genomas de *E. guineensis* e *E. oleifera* estudados. Tanto em *E.*

guineensis como em *E. oleifera* foram detectadas lipases da classe 3 (PF01764) e da classe GDSL (PF00657).

Utilizando a sequência dos domínios funcionais, foram construídas árvores filogenéticas para cada uma das classes de lipases. Morcillo et al. (2013) relataram que a acidificação do mesocarpo da palma de óleo é controlada por um único gene (EgLip1); contudo, os dados reportados neste estudo sugerem que existe a possibilidade de ser avaliada de que tanto as lipases GDSL como as GxSxG estejam também envolvidas nesse processo. Além disso, esses resultados mostram que existe uma grande diversidade de lipases putativas presentes nas duas espécies de *Elaeis* que podem ser avaliadas para futuros trabalhos de mapeamento de lipases em palma de óleo. Utilizando o programa InterProScan, foram detectadas 70 lipases da classe GDSL e 48 lipases da classe 3 no genoma de *E. oleifera* (Versão 2.0 do Draft), e no de *E. guineensis* (EG5) (Singh et al. 2013) foram identificadas 101 lipases da classe GDSL e 65 lipases da classe 3 (Fig. Suplementares. S7 e S8).

Nurniwalis et al. (2015) reportaram que as lipases da classe 3 estão envolvidas na degradação lipídica, esterificação e transesterificação em plantas, e que o gene full-length lipase class 3 (FLL1), identificado em *E. guineensis* e que codifica para uma lipase de 483 aminoácidos idêntico a lipase EgLip1 caracterizada por Morcillo et al. (2013), contém a sequência consenso de lipase 3, GxSxG, e a tríade catalítica (S, E/D, H). Neste estudo confirmou-se que o EgLip1 e os seus ortólogos pertencem a essa classe de lipases (Fig. Suplementar. S7).

Por outro lado, Wong et al. (2015) reportaram a presença de lipases da classe GDSL no óleo de palma Africana, expresas na folha, raiz e mesocarpo dos frutos, apresentando maior expressão nos estágios iniciais de desenvolvimento do fruto. Sugere-se, com isso, que essas lipases (GDSL) estão igualmente envolvidas na liberação de AGL na palma de óleo, aumentando a expressão quando os frutos são submetidos a baixas temperaturas e danos na pós-colheita, colocando-os em contato com o substrato (triglicerídeos).

Figura 1 - Ávore filogenetica ortogrupo de lipases (classe 3). EgOrtoLip1_2: corresponde a proteina de *E. guineensis* LOC105041962; EgOrtoLip1_1: proteina de *E. guineensis* LOC105041960; EgLip1: corresponde a proteina de *E. guineensis* LOC10504196. EoOrtoLip1_1 e

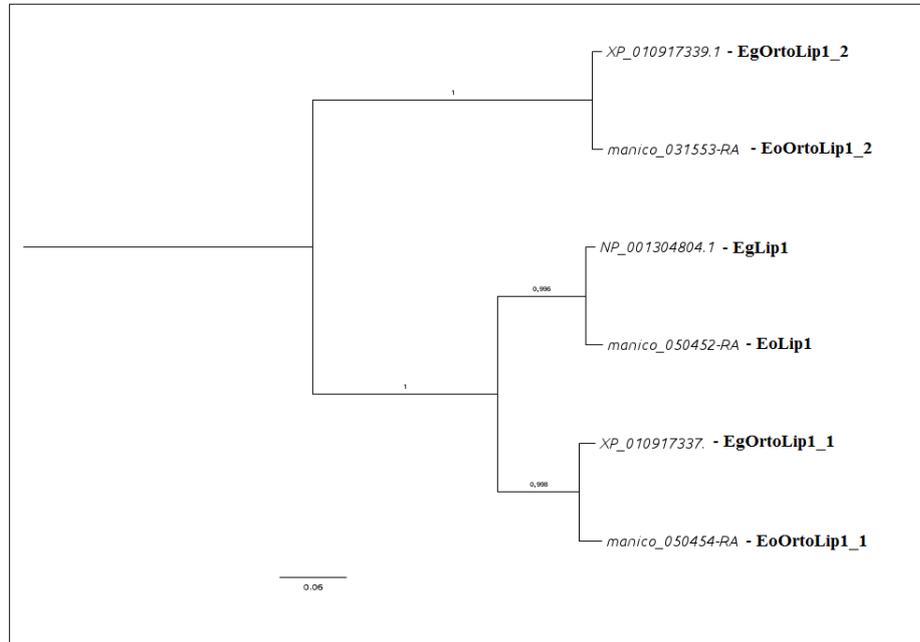


Figura 2 - Posição dos genes parálogos de *E. guineensis*. Identificados no cromossomo 3 (NC_025995.1) EgLip1, EgOrtoLip1_1, EgOrtoLip1_2 e a posição dos seus éxons íntrons (Dados públicos adaptados do Genbank).

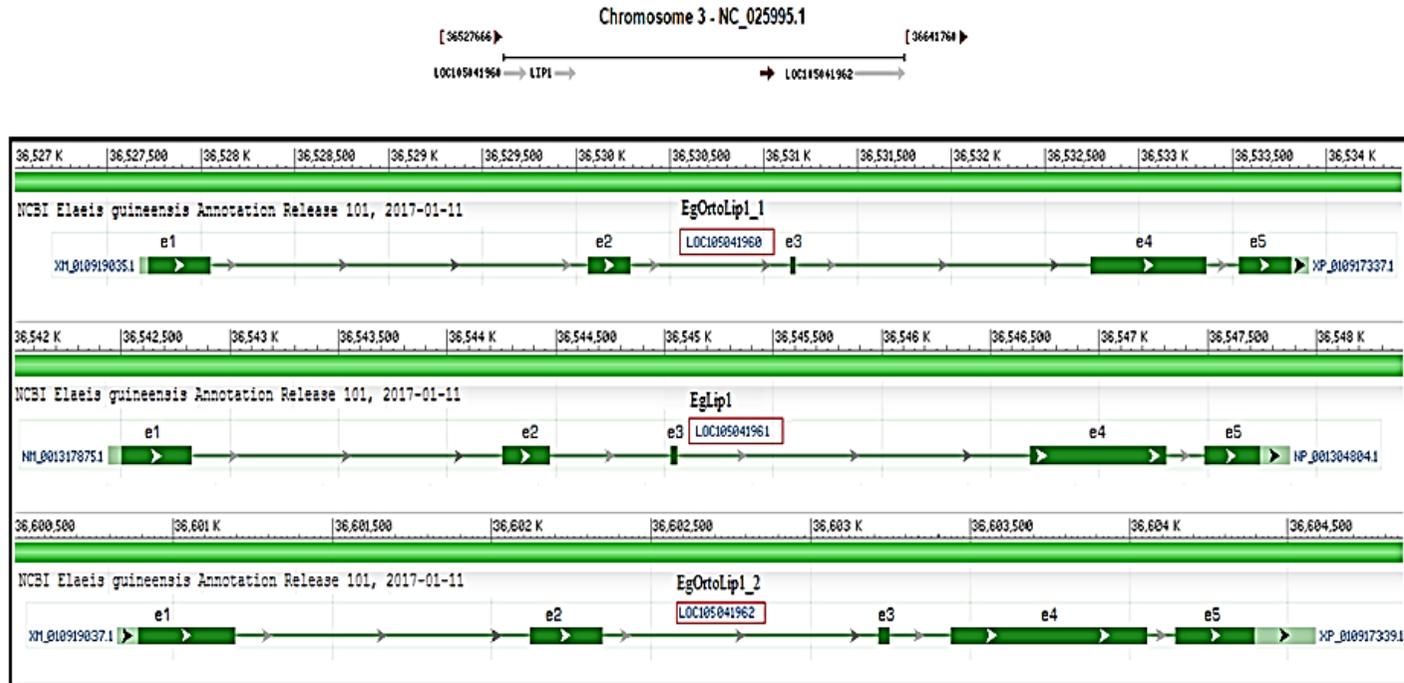
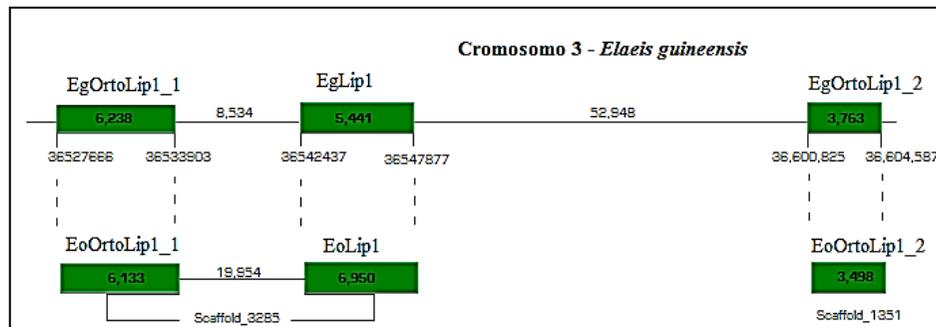


Figura 3 - Distância dos parálogos de lipases putativas. Genes identificados no genoma EG5 de *E. guineensis* no cromossomo 3 (NC_025995.1) e tamanho dos seus genes homólogos identificados no genoma de *E. oleifera* (Draft versão 2.0).



Fonte: Do autor (2017).

Tabela 1 - Análise de seleção comparativa dos genes ortólogos de lipases putativas (classe 3) identificados nos genomas de *Elaeis* spp. sobre pressão negativa.

dN/dS	EgOrtoLip1_2	EoOrtoLip1_2	EgLip1	EoLip1	EgOrtoLip1_1	EoOrtoLip1_1
EgOrtoLip1_2	XXX					
EoOrtoLip1_2	0.2530	XXX				
EgLip1	0.1421	0.1411	XXX			
EoLip1	0.1413	0.1457	0.2412	XXX		
EgOrtoLip1_1	0.1749	0.1743	0.2737	0.2729	XXX	
EoOrtoLip1_1	0.1783	0.1804	0.2978	0.3089	0.4579	XXX

Os valores da razão dN/dS < 1, sugerem que os genes ortólogos de lipases putativas (classe 3) identificados nos genomas de *Elaeis* spp. estão sobre pressão negativa.

Tabela 2 - Caracterização estrutural de lipases putativas (classe 3) identificados nos genomas de *Elaeis* spp.

	Ortólogos Lipases Classe 3					
	<i>Elaeis guineensis</i>			<i>Elaeis oleifera</i>		
Nome do gene	EgOrtoLip1_1	EgLip1	EgOrtoLip1_2	EoOrtoLip1_1	EoLip1	EoOrtoLip1_2
Id. gene	LOC105041960	LOC105041961	LOC105041962	Manico_050454	Manico_050452	Manico_031553
Tamanho do gene	6238 pb	5441 pb	3763 pb	6133 pb	6950 pb	3498 pb
Exon 1	50 - 386	1 - 389	66 - 372	1 - 251	1 - 251	1 - 306
Intron 1	387 - 2393	390 - 1813	373 - 1293	252 - 427	252 - 423	307 - 1425
Exon 2	2394 - 2623	1814 - 2037	1294 - 1523	428 - 1047	424 - 1043	1426 - 1460
Intron 2	2624 - 3471	2038 - 2591	1524 - 2389	1048 - 2627	1044 - 2702	1461 - 2318
Exon 3	3472 - 3505	2592 - 2625	2390 - 2423	2628 - 2661	2703 - 2736	2319 - 2352
Intron 3	3506 - 5073	2626 - 4250	2424 - 2614	2662 - 3519	2737 - 3293	2353 - 2543
Exon 4	5074 - 5693	4251 - 4870	2615 - 3231	3520 - 3749	3294 - 3517	2544 - 3160
Intron 4	5694 - 5864	4871 - 5048	3232 - 3319	3750 - 5799	3518 - 4961	3161 - 3249
Exon 5	5865 - 6143	5049 - 5441	3320 - 3571	5800 - 6136	4962 - 5366	3250 - 3501
Intron 5	-	-	-	-	5367 - 6902	-
Exon 6	-	-	-	-	6903 - 6954	-
Região	36527666-36533903	36542437-36547877	36600825-36604587	-	-	-
Tamanho mRNA	1644 pb	1679 pb	1697 pb	1473 pb	1587 pb	1245 pb
5' UTR	1 - 49	1 - 67	1 - 65	-	-	-
Start códon	50	68	66	-	-	-
CDS	50 - 1549	68 - 1519	66 - 1505	-	-	-
Stop códon	1549	1519	1505	-	-	-
3' UTR	1550 - 1644	1520 - 1679	1506 - 1697	-	-	-
Tamanho da proteína	499 aa	482 aa	479 aa	490 aa	528 aa	414 aa
Motivo GHSLG	313 - 317	306-310	302 - 306	313 - 317	351 - 355	237 - 241
Sítio Ativo	TEAFNAHDWSTDVD	TEPFNAQDWSTDVD	TEPFNAQDWSTDVD	TEAFNAHDWSTDVD	TEPFNAQDWSTDVD	TEPFNAQDWSTDVD
Posição Sítio Ativo	(230-231,233-234,237-243)	(223-224,226,229-236)	(220-221,223,226-233)	(230-231,233-234,237-243)	(268-269,271,274-281)	(155-156,158,161-168)
CD hidrolases α/β	45 - 493	41 - 477	54 - 472	45 - 484	86 - 522	54 - 407

4 CONCLUSÕES

Neste estudo, foram detectadas 70 lipases da classe GDSL e 48 da classe 3 no genoma de *E. oleifera* (Versão 2.0 do Draft, dados não publicados), e 101 lipases da classe GDSL e 65 da classe 3 no genoma de *E. guineensis* (EG5) (Singh et al. 2013). Existe, portanto, uma grande diversidade de lipases putativas presentes nas duas espécies de palma de óleo, e que podem ser avaliadas em futuros estudos de mapeamento e caracterização de lipases nos genomas de espécies de *Elaeis*, como possíveis responsáveis pela acidificação do óleo.

Este estudo mostrou que existe grande similaridade entre EgLip1, de *E. guineensis*, com a uma lipase putativa encontrada de *E. oleifera*, aqui denominada EoLip1. Além disso, foram encontrados dois pares de genes ortólogos de lipases putativas nos genomas das duas espécies de *Elaeis* (EoOrtoLip1_1 com EgOrtoLip1_1, e EoOrtoLip1_2 com EgOrtoLip1_2). Esses genes foram caracterizados, foi possível compará-los e detectar as principais diferenças estruturais entre eles. A análise filogenética desses ortólogos expõe que pertencem à mesma linhagem evolutiva, e a análise de seleção indicou que estão sob pressão negativa $dN/dS < 1$, sugerindo que esses homólogos putativos podem apresentar funções conservadas, pois a seleção natural suprime as mutações na proteína.

A busca e a caracterização de lipases *in silico* aqui realizada disponibiliza informação útil para futuros estudos de regulação da expressão gênica, como também de fenotipagem, com vistas a correlacionar esses genes putativos com a diferença na acidificação do óleo das duas espécies de palma. Além disso, proporciona informação para a futura definição e validação de marcadores para a seleção precoce de genótipos de baixa acidez, característica esta desejada para dar mais flexibilidade no processamento de frutas pós-colheita, com amadurecimento estendido para aumentar o rendimento.

REFERÊNCIAS

- Abbas, H., et al. (2002). "Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit." Enzyme and microbial technology **31**(7): 968-975.
- Achir, N., et al. (2010). "Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment." European Journal of Lipid Science and Technology **112**(3): 349-361.
- Albert, M. M. E., et al. (2011). "Assessment of the quality of crude palm oil from smallholders in Cameroon." Journal of Stored Products and Postharvest Research **2**(3): 52-58.
- Altschul, S. F., et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Research **25**(17): 3389-3402.
- Andrade, E. d. (1983). "Relatório de expedição para coleta de germoplasma de caiaué [*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés] na Amazônia brasileira." EMBRAPA/CNPDS, Manaus.
- AOCS, A. O. C. S. (2005). Official methods and recommended practices of the AOCS. .
- Atadashi, I., et al. (2012). "Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks." Renewable and Sustainable Energy Reviews **16**(5): 3275-3285.
- Barcelos, E. (1986). Características genético-ecológicas de populações naturais de caiaué (*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés) na Amazônia Brasileira.
- Bergamin Filho, A., et al. (1998). "Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia." Fitopatologia brasileira **23**(3): 391-396.
- Biehler, E., et al. (2010). "Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables." Journal of food science **75**(1): C55-C61.
- Boari, A. d. J. (2008). "Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil." Embrapa Amazônia Oriental. Documentos.
- Bora, P. S., et al. (2003). "Characterization of principal nutritional components of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis*) fruits." Bioresource technology **87**(1): 1-5.
- Borém, A. G. L., et al. (2009). Domesticacao e melhoramento.: especies amazônicas.
- Cadena, T., et al. (2013). "Lipase activity, mesocarp oil content, and iodine value in oil palm fruits of *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, and the interspecific hybrid O× G (*E. oleifera*× *E. guineensis*)." Journal of the science of food and agriculture **93**(3): 674-680.
- Carter, C., et al. (2007). "Palm oil markets and future supply." European Journal of Lipid Science and Technology **109**(4): 307-314.
- Cintra, D. E., et al. (2006). "Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin." Nutrition **22**(2): 197-205.

- Corley, R. (2009). "How much palm oil do we need?" Environmental Science & Policy **12**(2): 134-139.
- Corley, R., et al. (2009). La palma de aceite. v. 31, no. Especial Tomo I (2010), p 278-290, Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite, Fedepalma [Colombia].
- Corley, R. and P. Tinker (2003). "The classification and morphology of the oil palm." The Oil Palm 4th Edn. BS Ltd. Blackwell Publishing: 27-51.
- Corley, R. and P. Tinker (2003). "Selection and breeding." The oil palm. 4th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd Blackwell Publishing: 133-200.
- Cunha, R. and R. Lopes (2010). "BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento-fatal." Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental.
- Choo, Y.-M., et al. (1996). "Recovered oil from palm-pressed fiber: a good source of natural carotenoids, vitamin E, and sterols." Journal of the American Oil Chemists' Society **73**(5): 599-602.
- Choo, Y., et al. (1992). Production of palm oil carotenoid concentrate and its potential application in nutrition. Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications, Springer: 243-254.
- Dransfield, J., et al. (2005). "A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae." Kew Bulletin: 559-569.
- Ebongue, G. F. N., et al. (2008). "Identification of oil palm breeding lines producing oils with low acid values." European Journal of Lipid Science and Technology **110**(6): 505-509.
- Ebongue, G. N., et al. (2006). "Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp." Plant Physiology and Biochemistry **44**(10): 611-617.
- FAO/OMS, C. A. C. (2005). Normes alimentaires pour huiles et graisses. . F. O. CODEX-STAN 210.
- FAO/WHO, C. A. C. C. a. R. F. a. A. O. o. t. U. N. J. (1999). "Codex standard for named vegetable oils." Codex Stan **210**: 1999.
- Faostat, F. (2016). "Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (2014)." Production Available in: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> [Review date: April 2015].
- Ferreira Filho, J. A. (2015). "Caracterização de sítios polimórficos e sequências repetitivas, e estabelecimento de coleção nuclear de caiaué [*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés]."
- Gaziano, J., et al. (1990). Beta-carotene therapy for chronic stable angina. Circulation, AMER HEART ASSOC 7272 GREENVILLE AVENUE, DALLAS, TX 75231-4596.

- Ghesquiere, M., et al. (1987). "Enzymatic polymorphism in *Elaeis oleifera* HBK (*E. melanococca*). Analysis of populations in the Amazon Basin." Oleagineux (France).
- Gibon, V., et al. (2007). "Palm oil refining." European Journal of Lipid Science and Technology **109**(4): 315-335.
- Grundy, S. M. (1989). "Monounsaturated fatty acids and cholesterol metabolism: implications for dietary recommendations." The Journal of nutrition **119**(4): 529-533.
- Hartley, C. W. S. (1967). "The oil palm." The oil palm.
- Henderson, J. and D. J. Osborne (1991). "Lipase activity in ripening and mature fruit of the oil palm. Stability in vivo and in vitro." Phytochemistry **30**(4): 1073-1078.
- Hiol, A., et al. (2000). "Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit." Enzyme and microbial technology **26**(5): 421-430.
- Kryazhimskiy, S. and J. B. Plotkin (2008). "The population genetics of dN/dS." PLoS Genet **4**(12): e1000304.
- Lubrano, C. and J. Robin (1997). "Major compounds study in fruit pulp oils of 6 Guiana palms species." Acta Botanica Gallica (France).
- Marchler-Bauer, A., et al. (2016). "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures." Nucleic Acids Research: gkw1129.
- May, C. Y. (1994). "Palm oil carotenoids." Food Nutr Bull **15**(2).
- Mba, O. I., et al. (2015). "Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry—A review." Food bioscience **10**: 26-41.
- Meunier, J. (1975). "Le" palmier a huile" americain *Elaeis melanococca*.(The American" oil palm" *Elaeis melanococca*)." Oléagineux **30**(2): 51-61.
- Michielse, C. B. and M. Rep (2009). "Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*." Molecular plant pathology **10**(3): 311-324.
- Miranda, I. P. (2001). Frutos de palmeiras da Amazônia, Presidência da República, Ministério da Ciência e Tecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Mohankumar, C. and C. Arumugan (1990). "Histological localization of oil palm fruit lipase." Journal of the American Oil Chemists' Society **67**(10): 665-669.
- Montoya, C., et al. (2013). "Quantitative trait loci (QTLs) analysis of palm oil fatty acid composition in an interspecific pseudo-backcross from *Elaeis oleifera* (HBK) Cortés and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)." Tree genetics & genomes **9**(5): 1207-1225.
- Morcillo, F., et al. (2013). "Improving palm oil quality through identification and mapping of the lipase gene causing oil deterioration." Nature communications **4**.

Moretzsohn, M. d. C., et al. (2000). "RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)." Theoretical and Applied Genetics **100**(1): 63-70.

Murakoshi, M., et al. (1989). "Inhibitory effects of α -carotene on proliferation of the human neuroblastoma cell line GOTO." Journal of the National Cancer Institute **81**(21): 1649-1652.

NCBI, R. C. (2013). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information." Nucleic acids research **41**(Database issue): D8.

Ng, J. and B. Tan (1988). "Analysis of palm oil carotenoids by HPLC with diode-array detection." Journal of chromatographic science **26**(9): 463-469.

Nogueira, A. d. A., et al. (1998). Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos, EMBRAPA-CPPSE.

Nurniwalis, A., et al. (2015). "Genomic structure and characterization of a lipase class 3 gene and promoter from oil palm." Biologia Plantarum **59**(2): 227-236.

Ong, A. S. and E. Tee (1992). "[14] Natural sources of carotenoids from plants and oils." Methods in enzymology **213**: 142-167.

Ooi, S., et al. (1981). "Oil palm genetic resources native *Elaeis oleifera* populations in Brazil offer promising sources [African oil; Plant breeding; Cross-breeding; Hybrid progenie]." Pesquisa Agropecuaria Brasileira (Brazil).

Price, M. N., et al. (2010). "FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments." PloS one **5**(3): e9490.

Rajanaidu, N. (1986). *Elaeis oleifera* collection in Central and South America. International Workshop on Oil Palm Germplasm and Utilisation, Bangi, Selangor (Malaysia), 26-27 Mar 1985, IPMKSM.

Ramos, E., et al. (2006). "Potencial produtivo de híbridos interespecíficos entre dendezeiro e caiauezeiro nas condições do nordeste paraense." Embrapa Amazônia Oriental. Documentos.

Rios, S. d. A., et al. (2012). "Recursos genéticos da palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caiaué (*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés)." Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental.

Sambanthamurthi, R., et al. (1991). "Chilling-induced lipid hydrolysis in the oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp." Journal of experimental botany **42**(9): 1199-1205.

Sambanthamurthi, R., et al. (1995). "Factors affecting lipase activity in *Elaeis guineensis* mesocarp." Plant Physiology and Biochemistry (Paris) **33**(3): 353-359.

Sambanthamurthi, R., et al. (2000). "Chemistry and biochemistry of palm oil." Progress in lipid research **39**(6): 507-558.

Singh, R., et al. (2013). "The oil palm SHELL gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK." Nature **500**(7462): 340-344.

- Singh, R., et al. (2013). "Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds." Nature **500**(7462): 335-339.
- Sluiter, J. and A. Sluiter (2010). "Summative mass closure—LAP review and integration: feedstocks (NREL/TP-510-48087)." National Renewable Energy Laboratory, Golden.
- Suda, D., et al. (1986). "Inhibition of experimental oral carcinogenesis by topical beta carotene." Carcinogenesis **7**(5): 711-715.
- Tan, B. (1989). Palm carotenoids, tocopherols and tocotrienols, AMER OIL CHEMISTS SOC 1608 BROADMOOR DRIVE, CHAMPAIGN, IL 61821-0489.
- Tan, B. and C. Oh (1981). "Oleins and stearins from Malaysian palm oil-chemical and physical characteristics." Palm Oil Research Institute of Malaysia Technology.
- Temple, N. J. and T. K. Basu (1988). "Does beta-carotene prevent cancer? A critical appraisal." Nutrition research **8**(6): 685-701.
- Torres, G., et al. (2010). "First report of bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on African oil palm in Colombia." Plant Disease **94**(9): 1163-1163.
- Wong, Y., et al. (2016). "Screening of wild oil palm (*Elaeis guineensis*) germplasm for lipase activity." The Journal of Agricultural Science **154**(07): 1241-1252.
- Yang, Z. (2007). "PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood." Molecular biology and evolution **24**(8): 1586-1591.
- Yap, S., et al. (1991). "Quantitative analysis of carotenes in the oil from different palm species." Elaeis.

Figura Suplementar 1 - Análises das sequências EgLip1 e EoLip1. Alinhamento da sequência proteica da lipase EgLip1 (*E. guineensis*) com a lipase putativa EoLip1 identificada em *E. oleifera* usando PRALINE. Os resíduos conservados (91,4%) estão em vermelho. Os resíduos putativos da triada catalítica (S, D, H) estão indicados com um asterisco rosa (*). O motivo conservado das lipases classe 3 (GxSxG) (prosite PS00120) está em quadro amarelo e o sítio ativo da enzima em quadro branco.

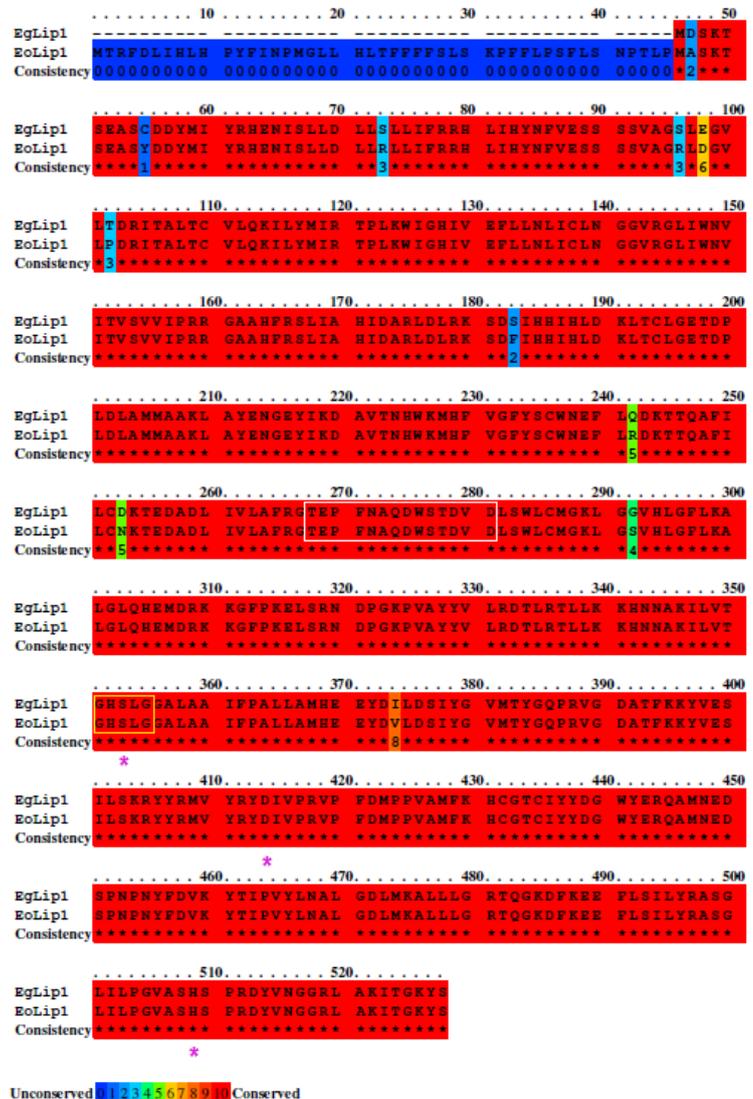


Figura Suplementar 2 - Análises das sequências EgOrtoLip1_1 e EoOrtoLip1_1. Alinhamento das sequências proteicas dos ortólogos de lipases putativas EgOrtoLip1_1 (*E. guineensis*) com EoOrtoLip1_1 (*E. oleifera*) usando PRALINE. Os resíduos conservados (98,5%) estão em vermelho. Os resíduos putativos da triada catalítica (S, D, H) estão indicados com um asterisco rosa (*). O motivo conservado das lipases classe 3 (GxSxG) (prosite PS00120) está em quadro amarelo e o sítio ativo da enzima em quadro branco.

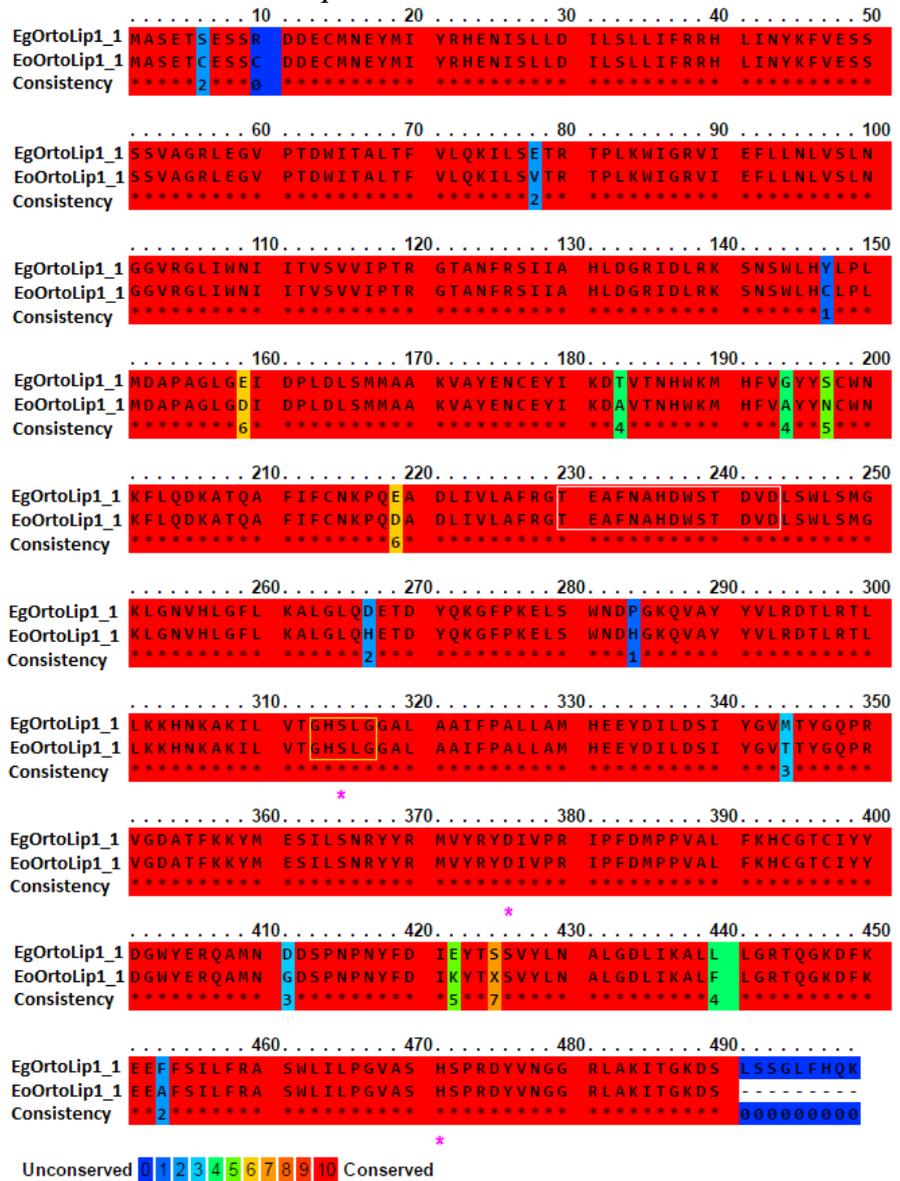


Figura Suplementar 3 - Análises das sequências EgOrtoLip1_2 e EoOrtoLip1_2. Alinhamento das sequências proteicas dos ortólogos de lipases putativas EgOrtoLip1_2 (*E. guineensis*) com EoOrtoLip1_2 (*E. oleifera*) usando PRALINE. Os resíduos conservados (85,3%) estão em vermelho. Os resíduos putativos da triada catalítica (S, D, H) estão indicados com um asterisco rosa (*). O motivo conservado das lipases classe 3 (GxSxG) (prosite PS00120) está em quadro amarelo e o sítio ativo da enzima em quadro branco.

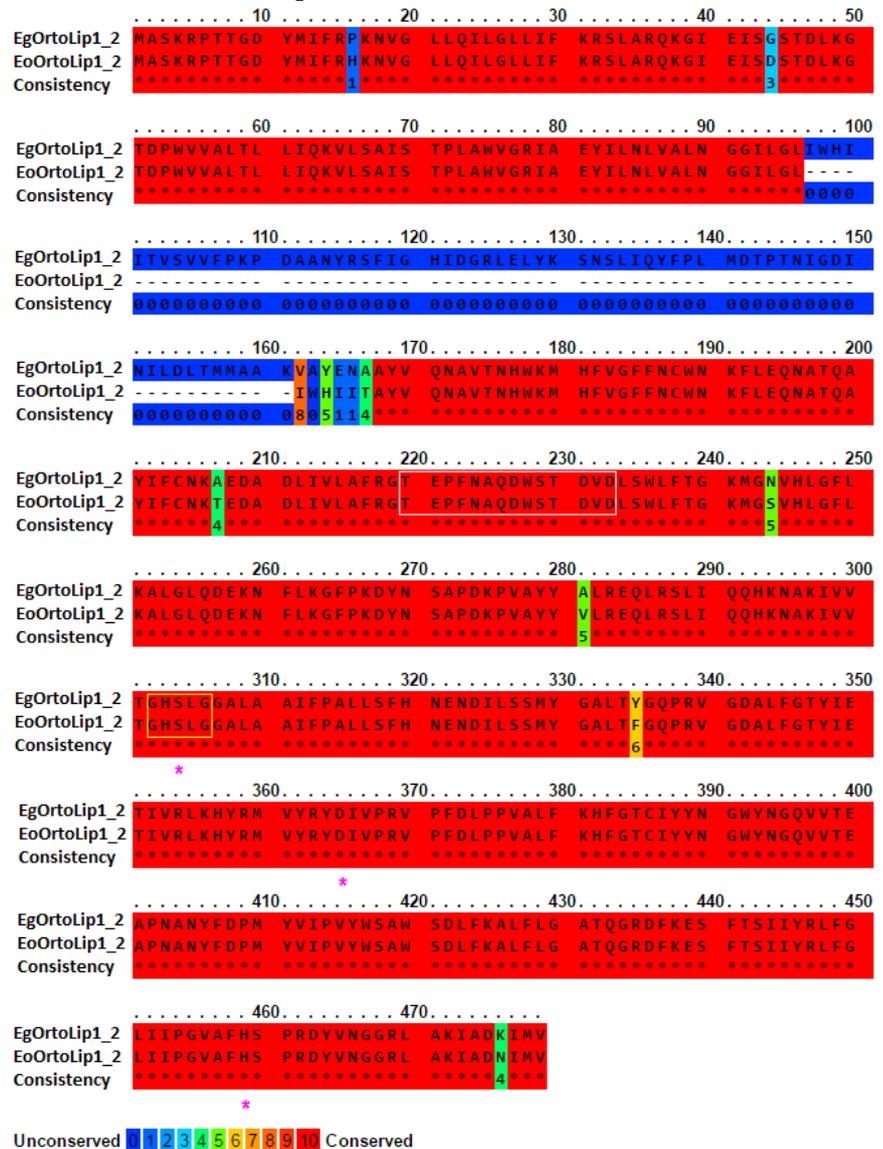


Figura Suplementar 4 - Alinhamento dos motivos conservados da região promotora das sequências EgLip1 e EoLip1. Comparação entre os pares de lipases putativas homólogas entre as duas espécies de *Elaeis* spp. com o programa MEME (3,0 Kb upstream).



Figura Suplementar 5 - Alinhamento dos motivos conservados da região promotora das sequências EgOrtoLip1_1 e EoOrtoLip1_1. Comparação entre os pares de lipases putativas homólogas entre as duas espécies de *Elaeis* spp. com o programa MEME (3,0 Kb upstream).

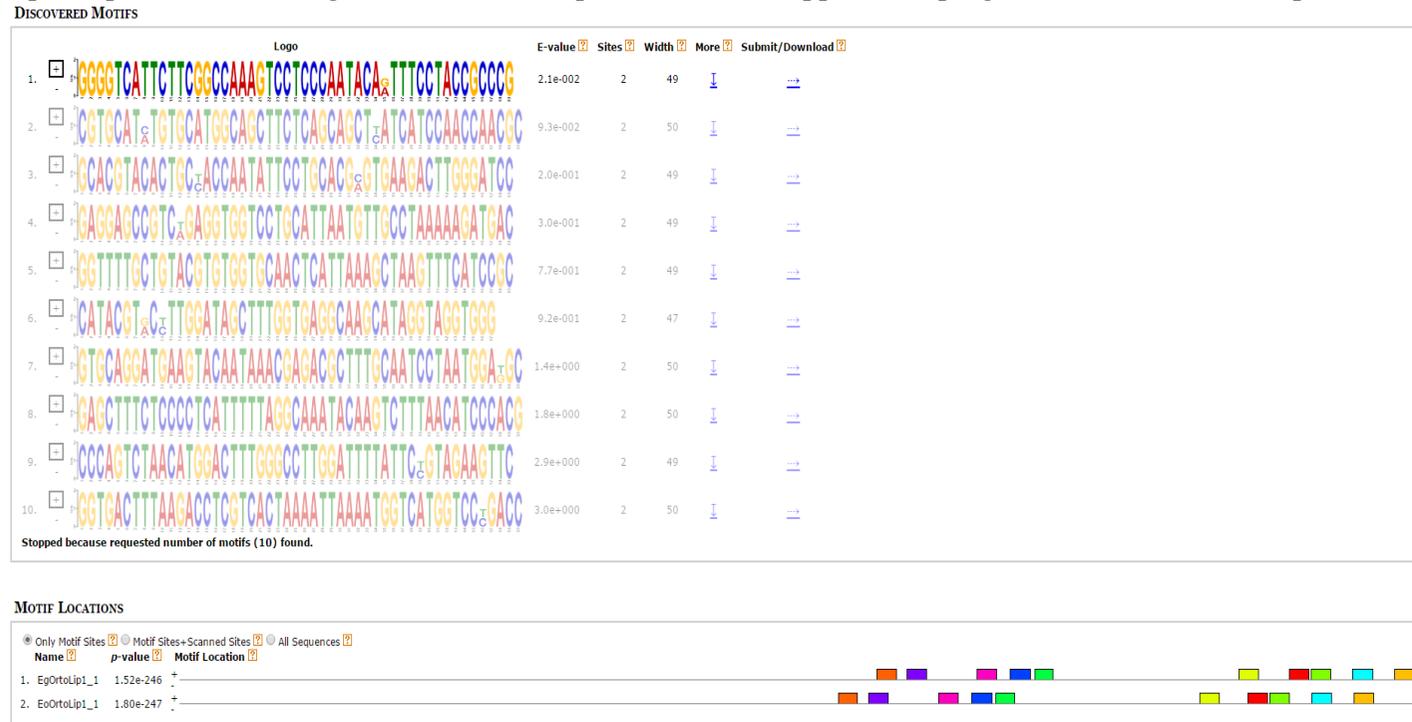


Figura Suplementar 6 - Alinhamento dos motivos conservados da região promotora das sequências EgOrtoLip1_2 e EoOrtoLip1_2. Comparação entre os pares de lipases putativas homólogas entre as duas espécies de *Elaeis* spp. com o programa MEME (3,0 Kb upstream).



Figura Suplementar 7 - Árvore filogenética das lipases da classe 3 (GxSxG). Contendo o domínio funcional Pfam PF01764. Foram identificadas 48 lipases da classe 3 (GxSxG) no genoma de *E. oleifera* (Versão 2.0 do Draft) e 65 no genoma de *E. guineensis* (EG5) com o programa FastTreeMP (Versão2.1.7).

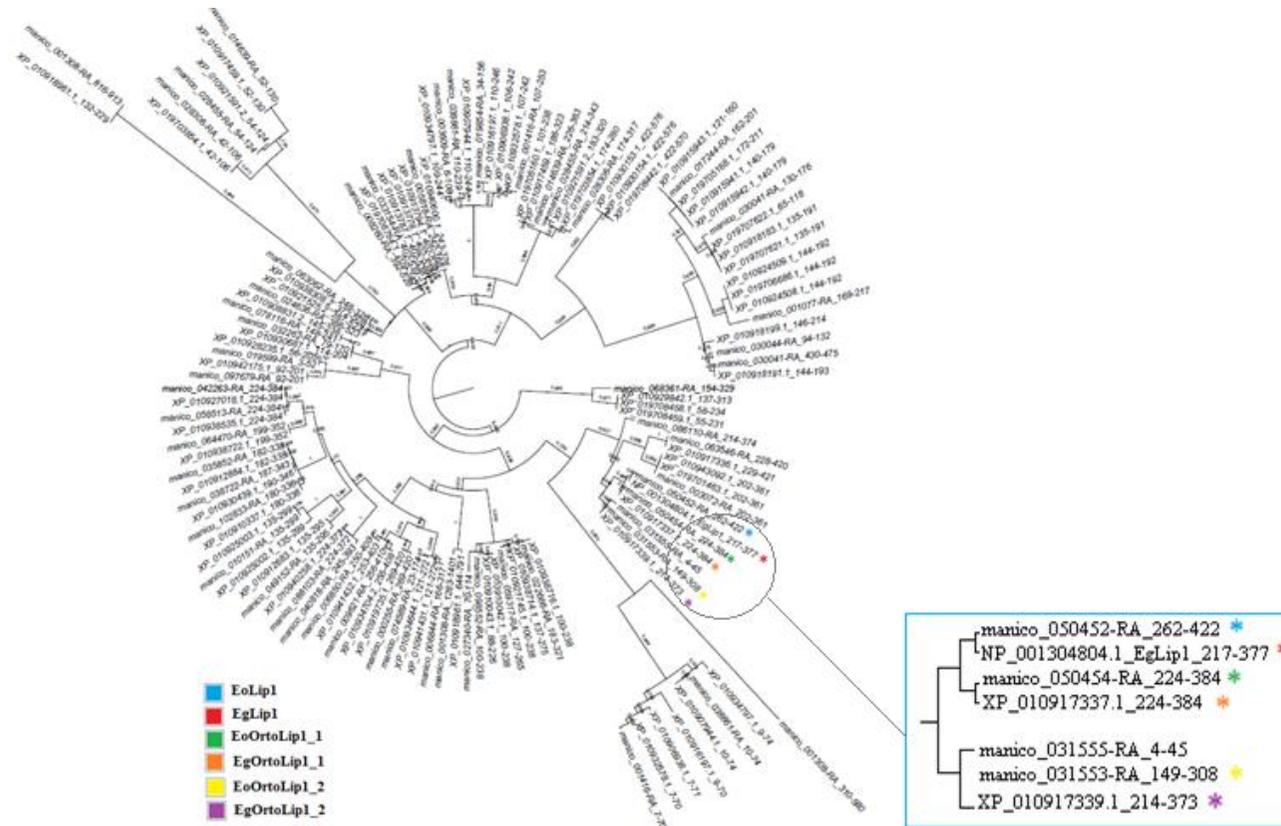
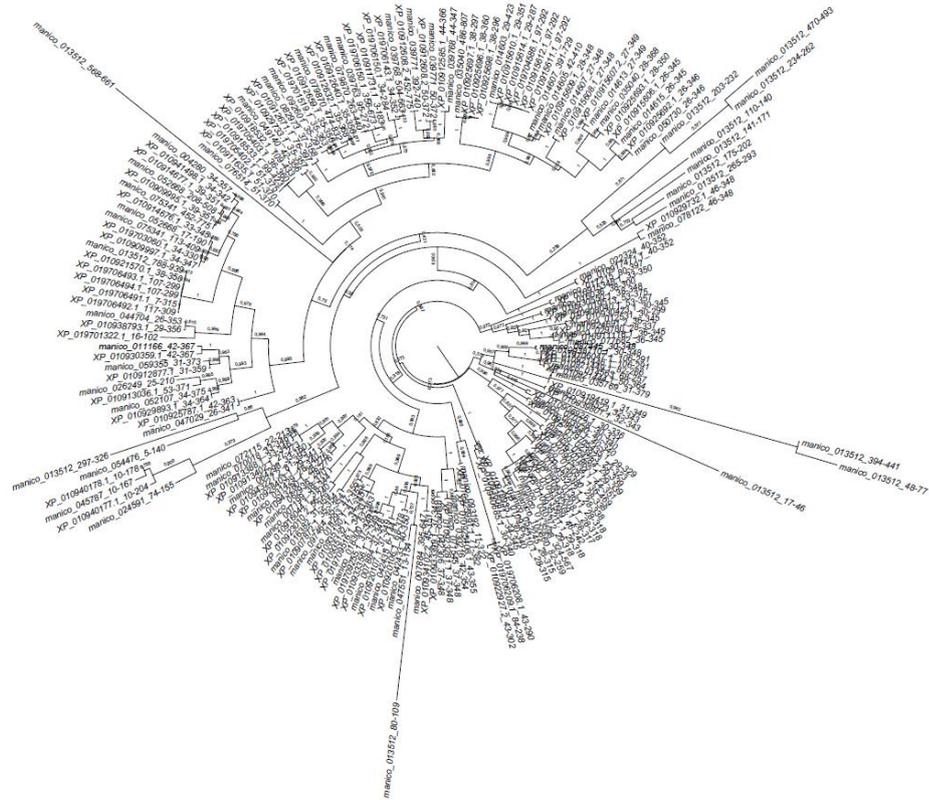


Figura Suplementar 8 - Árvore filogenética das lipases da classe GDSL. Contendo o domínio funcional Pfam PF00657. Foram identificadas 70 lipases da classe GDSL no genoma de *E. oleifera* (Versão 2.0 do Draft) e 101 no genoma de *E. guineensis* (EG5) com o programa FastTreeMP (Versão 2.1.7).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos estudos aqui descritos de mapeamento e anotação de lipases putativas no genoma de *Elaeis oleifera* que onde foram identificados genes ortólogos de *E. guineensis*, espera-se avançar nos trabalhos futuros de descoberta de marcadores (SNPs) nessas lipases candidatas para uso em seleção assistida de genótipos de baixa acidez, com a subsequente validação e comprovação de sua expressão específica. Além disso, com a realização deste trabalho, foi possível a identificação *in silico* de uma grande diversidade de lipases da classe GDSL e classe 3 nos genomas de *Elaeis* spp., a serem avaliadas em estudos de associação (BSA) para identificação de lipases relacionadas à acidificação do óleo de palma.

O estudo de caracterização química do óleo de diferentes acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Caiaué, de uma coleção de acessos oriundos de diferentes regiões da Amazônia Brasileira, permitiu a identificação dos acessos com melhores características fenotípicas de interesse comercial. Ao mesmo tempo, observou-se que existe variabilidade fenotípica entre os acessos mais representativos dessa coleção do BAG de Caiaué. Este estudo promoverá um uso mais eficiente dos recursos genéticos, principalmente, no que diz respeito à seleção dos melhores genótipos em termos de baixa acidez e maior rendimento de óleo como doadores de parentais para o desenvolvimento de híbridos interespecíficos superiores (com *Elaeis guineensis*) no Programa de Melhoramento Genético de Palma de Óleo da Embrapa.

Recomenda-se o prosseguimento do trabalho em questão com a identificação de SNPs (desenvolvidos a partir dos genes ortólogos de lipases putativas identificadas neste estudo) dentro da diversidade genética de Caiaué. Isso permitirá uma rápida identificação dos parentais elite (baixa acidez) potenciais a serem inseridos nos cultivares de palma de óleo. A união destas duas áreas de trabalho abrangidas (mapeamento de genes e fenotipagem dos acessos de Caiaué) é um passo importante para avançar na descoberta das possíveis soluções ao problema da acidificação do óleo de palma e, assim, em um futuro próximo atingir uma maior flexibilidade nos tempos pós-colheita de frutos a serem processados. Pois isso contribui para a agregação de valor para a cadeia produtiva do Dendê do Brasil.