



INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Resíduos de laranja como fonte direta de lipases: obtenção,
caracterização bioquímica e aplicações**

VALESCA CRISTIANE BENELLI FRANCISCO

BOTUCATU – SP

2017



INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**Resíduos de laranja como fonte direta de lipases: obtenção,
caracterização bioquímica e aplicações**

VALESCA CRISTIANE BENELLI FRANCISCO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pelo programa de pós-graduação em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Adj. Luciana Francisco Fleuri
Co-orientador: Prof Dr Willian Fernando Zambuzzi

BOTUCATU – SP

2017

Francisco, Valesca Cristiane Benelli.

Resíduos de laranja como fonte direta de lipases:
obtenção, caracterização bioquímica e aplicações em
educação corporativa como ferramenta de gestão do
conhecimento : um estudo de caso / Valesca Cristiane
Benelli Francisco , 2017
72 f.

Orientador: Luciana Francisco Fleuri

Willian Fernando Zambuzzi

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual
Paulista. Instituto de Biociências, Botucatu, 2017

1. Lipase. 2. Hidrólise. 3. Esterificação. 4. Resíduos
de laranja. 5. Atividade biológica I. Universidade Estadual
Paulista. Instituto de Biociências. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo, sempre!

À minha família tão amada, Enrico, Maria Paula e Murilo, por todo apoio e compreensão.

Aos meus queridos pais e sogros, pelo suporte em todos os momentos.

À estimada professora Luciana Francisco Fleuri, por sua orientação, exemplo, amizade, confiança e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Willian Zambuzzi, pela co-orientação e à seus alunos Augusto Santana Nascimento e Célio Junior da Costa Fernandes por suas colaborações.

À professora Marcia Ortiz Mayo do departamento de Fitoquímica do I.A.C, pela parceria e Roselaine Facanali por suas colaborações.

À empresa J.B.T FoodTech de Araraquara, em especial à Daniela Kharfan pelo fornecimento dos resíduos de laranja para o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas parceiras e amigas de laboratório Mirella, Milene, Clarissa, Débora, Bruna e Júlia, pela amizade, paciência, cooperação e força que muito me ajudaram, vocês moram no meu coração!

À Fapesp (processo 2015/01753-8), Capes e CNPq, pelo auxílio financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

Aos colegas do departamento de Química e Bioquímica do I.B da Unesp de Botucatu.

Sumário

Índice Geral

Resumo.....	7
Abstract	8
1. Introdução	9
Referências bibliográficas.....	10
2. Revisão bibliográfica.....	13
2. 1 Resíduos.....	13
2.2 Enzimas.....	15
2.2.1 Lipases, reações e aplicações	16
2.2.1.1 Reações de hidrólise e esterificação.....	16
2.2.1.2 Reações de interesterificação.....	18
2.3 Compostos lipídicos e atividades biológicas.....	19
3. Materiais e métodos.....	24
3.1 Obtenção dos resíduos de laranja pera.....	24
3.2 Concentração dos extratos enzimáticos das lipases dos resíduos de laranja	24
3.3 Determinação da atividade de hidrólise das lipases dos resíduos de laranja.....	25
3.4 Determinação da atividade de esterificação das lipases dos resíduos de laranja.....	25
3.5 Caracterização das lipases dos resíduos de laranja	26
3.5.1 Especificidade das lipases quanto ao tamanho de cadeia do substrato.....	26
3.5.2 Caracterização do perfil proteico dos extratos de lipase dos resíduos de laranja.....	26
3.5.3 Especificidade das lipases quanto à posição estereoquímica do ácido graxo.....	27
3.6 Aplicação das lipases.....	27
3.6.1 Modificação de óleos vegetais por reação de hidrólise	27

3.6.2 Reação de esterificação.....	28
3.6.3 Análise do perfil dos ácidos graxos obtidos nas reações	29
3.6.4 Determinação das atividades biológicas dos produtos de reação.....	30
3.6.4.1 Atividades antioxidantes.....	30
3.6.4.2 Atividades antimicrobianas.....	30
3.6.4.3 Análise da citotoxicidade / viabilidade celular por meio da redução do MTT.....	31
4. Análise estatística dos resultados.....	33
5. Resultados e discussões.....	33
5.1 Obtenção de lipases de resíduos de laranja	33
5.2 Caracterização das lipases dos resíduos de laranja	35
5.3 Aplicação das lipases de resíduos de laranja em reações de hidrólise e síntese.....	39
5.4 Análise das atividades biológicas dos produtos das reações das lipases.....	40
5.4 .1 Avaliação da atividade antioxidante.....	40
5.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	41
5.4.3 Avaliação da citotoxicidade – viabilidade celular.....	43
5.5 Análise do perfil dos ácidos graxos obtidos nas reações de hidrólise e esterificação por lipases de laranja.....	49
6. Conclusão.....	57
7. Sugestões para trabalhos futuros.....	57
Referências bibliográficas.....	58

Índice das Figuras

Figura 1. Partes constitutivas da laranja, definições anatômicas e industriais.....	14
Figura 2. Representação esquemática das reações	19
Figura 3. Estrutura de ácidos graxos livres.....	20
Figura 4. Fluxograma dos experimentos.....	23
Figura 5. Extratos concentrados das frações residuais de laranja.....	24
Figura 6. Esquema experimental da avaliação de citotoxicidade.....	32

Figura 7. Atividade de hidrólise das lipases dos resíduos de laranja.....	34
Figura 8. Atividade de esterificação das lipases dos resíduos de laranja.....	35
Figura 9. Placa de SDS-Page / Caracterização proteica.....	37
Figura 10. Placa de regioespecificidade das lipases de resíduos de laranja e placa com padrões para regioespecificidade.....	38
Figura 11. Placa de inibição de crescimento bacteriano.....	42
Figura 12. Viabilidade celular dos produtos de hidrólise.....	45
Figura 13. Viabilidade celular dos produtos de esterificação.....	47
Figura 14. Viabilidade celular dos brancos de reação.....	48

Índice das tabelas

Tabela 1. Aplicação dos subprodutos de laranja.....	15
Tabela 2. Especificidade por tamanho de cadeia carbônica de ácido graxo.....	36
Tabela 3. % de hidrólise dos óleos vegetais pelas lipases de resíduos de laranja.....	39
Tabela 4. % de esterificação do ácido oleico com etanol pelas lipases de resíduos de laranja....	40
Tabela 5. Atividade antioxidante dos produtos de reação.....	41
Tabela 6. Atividade antibacteriana dos produtos de reação.....	42
Tabela 7. Perfil de ácidos graxos da hidrólise do óleo de oliva.....	50
Tabela 8. Perfil de ácidos graxos da hidrólise do óleo de milho.....	51
Tabela 9. Perfil de ácidos graxos da hidrólise do óleo de girassol.....	52
Tabela 10. Perfil de ácidos graxos da hidrólise do óleo de mamona.....	53
Tabela 11. Perfil de ácidos graxos da hidrólise do óleo de dende.....	54
Tabela 12. Perfil de ácidos graxos da esterificação do ácido oleico com etanol.....	55
Anexos.....	67

O processamento de suco de laranja gera grande volume residual, sendo este aproximadamente 50% do fruto. Esses resíduos contêm biomoléculas de interesse industrial tais como as lipases que são capazes de catalisar a hidrólise de glicerídeos e reações de síntese em condições micro-aquosas. A obtenção dessas enzimas diretamente de resíduos reduz os custos de produção e viabiliza diferentes aplicações. As lipases possuem características interessantes como a regioespecificidade e especificidade quanto aos tamanhos da cadeia carbônica de ácidos graxos, possibilitando a geração de produtos diferenciados. Desta forma, o presente trabalho visou, além da obtenção de lipases por meio resíduos de laranja Pera, a aplicação destas em reações capazes de promover mudanças nos substratos (lipídeos) a fim de se obter produtos diferenciados que possam apresentar atividades biológicas. Lipases foram obtidas dos resíduos de laranja Pera e caracterizadas como 1,3 específicas nas frações bagaço, casca e frit as quais apresentaram atividade lipolítica de 55,9 U/g; 58,0 U/g e 49,9 U/g, respectivamente; e da fração polpa como inespecífica com atividade de 40,4 U/g. Essas enzimas foram empregadas em reações de hidrólise e síntese com diferentes óleos vegetais e os produtos de reação analisados quanto às atividades biológicas. Foram observadas atividades antioxidante de até 94,87%; atividade antibacteriana sobre *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aureginosa*, *S. enteritidis* e *S. aureus*, e influência sobre a viabilidade de células cancerígenas SCC9 (carcinoma bucal) de vários produtos de reação para todas as frações enzimáticas. Apresentaram majoritariamente ácidos linoleico, oleico e palmítico, sendo desta forma correlacionado à presença dessas substâncias de forma isolada ou sinérgica ao exercício das atividades biológicas.

Palavras-chave: lipase, hidrólise, esterificação, resíduos de laranja, atividade biológica.

The orange juice production process generates a large residual volume, approximately 50% of the fruit. These residues contain biomolecules of industrial interests such as lipases that are capable of catalyzing the hydrolysis of glycerides and synthesis reactions under micro-aqueous conditions. The obtainment of these enzymes directly from wastes reduces production costs and enables different applications. Lipases have interesting characteristics such as regiospecificity and fatty acids chain length specificity, enabling the generation of different products. Thus, this study aimed, in addition to obtaining lipases through orange Pera residue, the application of these enzymes in reactions that can promote changes in reaction substrates in order to obtain modified products that may have biological activities. Lipases were obtained from the orange Pera residues and characterized as 1,3 specific in the bagasse, peel and frit fractions, which presented lipolytic activity of 55.9 U/g; 58.0 U/g and 49.9 U/g, respectively and the pulp fraction as nonspecific with activity of 40.4 U/g. These enzymes were used in reactions of hydrolysis and synthesis with different vegetable oils and the reaction products analyzed for biological activities. Antioxidant activity of up to 94.87% was observed, with antibacterial activity on *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aureginosa*, *S. enteritidis* and *S. aureus*, and influence on the viability of SCC9 (carcinogenic cells Buccal) of various reaction products for all enzymatic fractions. Presenting mainly linoleic, oleic and palmitic acids, being therefore correlated to the presence of these substances in an isolated or synergic way to the exercise of biological activities.

Keywords: lipase, hydrolysis, esterification, orange waste, biological activity.

1. Introdução

O Brasil possui a maior produção mundial de laranja sendo que desta produção aproximadamente 96% é usada no processamento de suco onde 50% do fruto torna-se resíduo (Alexandrino et al., 2007).

O grande volume de resíduos gerados pelo processamento de alimentos levanta um questionamento mundial de como podem ser aproveitados para diversos fins e o grande benefício ambiental obtido quando ocorre tratamento ou retirada destes do meio em que está poluindo (Forster-Carneiro et al., 2013).

Atualmente, o principal uso dos resíduos da laranja é como complemento para a ração animal. Entretanto, esses resíduos podem conter vários produtos de valor comercial (como enzimas) e, por isso, podem ser explorados para estes fins (Lohrasbi et al., 2010; Martínez et al., 2012).

As enzimas estão presentes em todos os tipos de célula, são eficientes catalisadores biológicos responsáveis por viabilizar inúmeras transformações celulares. Sua obtenção pode ser por meio de células animais, plantas e micro-organismos. O uso de vegetais para esta finalidade pode ser economicamente inviável e controverso, considerando o custo elevado desses produtos e a destinação para fins não alimentícios. Em contrapartida, a utilização de subprodutos agrícolas e agroindustriais constitui-se uma boa fonte dessas biomoléculas sem prejuízos para a cadeia produtiva de alimentos e com apelo de baixo custo (Castro, 2013; Fleuri et al., 2013; Fleuri, 2016).

A lipase (E.C. 3.1.1.3) (triacilglicerol lipase ou triacilglicerol acilhidrolase) encontra-se no grupo de enzimas que podem ser obtidas através de vegetais, incluindo resíduos, sendo que essas enzimas em meio aquoso catalisam a quebra da ligação éster do triglicerídeo (hidrólise) produzindo glicerol, ácidos graxos, diacilgliceróis e monoacilgliceróis. Também são capazes de catalisar outras reações e sob condições de baixa disponibilidade de água promove reação inversa à hidrólise, ou seja, a formação de ligações éster a partir de um álcool e um ácido carboxílico, denominada de esterificação (Castro et al., 2004; Barros et al., 2010; Fleuri et al., 2014).

Entre as características importantes dessas enzimas estão a regioespecificidade e afinidade por tamanho de cadeia do substrato, pois o perfil e a posição do ácido graxo liberado estão diretamente relacionados ao modo de ação enzimática (De Greyt e Kellens, 2001; Wang et al., 2006; Farfán et al., 2013). As lipases também são capazes de catalisar reações de interesterificação, nas quais os ácidos graxos de um triglicerídeo são removidos e redistribuídos dentro da mesma molécula ou entre moléculas

diferentes. Nesta reação a regioespecificidade da enzima é importante para designar onde ocorrerá a hidrólise das ligações ésteres que resultará em óleos e/ou gorduras com perfil peculiar de ácidos graxos e com diferentes propriedades físicas e químicas podendo tornar o produto mais atrativo do ponto de vista nutricional (De Greyt e Kellens 2001; Wang et al., 2006; Puligundla et al., 2012; Farfán et al., 2013).

O presente trabalho objetivou a obtenção a baixo custo de lipases oriundas de resíduos do processamento de suco de laranja da variedade Pera, que possuam características bioquímicas adequadas à aplicação em reações de hidrólise e síntese. Visou também a obtenção de produtos diferenciados quanto às atividades biológicas, visto que as reações citadas são eficazes para promover mudanças físico-químicas nas biomoléculas que alteram suas propriedades.

O efeito dessas frações lipídicas sobre as funções biológicas e celulares é pouco caracterizado, entretanto, bastante intrigante, representando uma lacuna a ser desvendada (Fleuri, 2016) sendo assim, os produtos obtidos podem apresentar atividades antioxidantes, antimicrobianas e sobre a viabilidade de diferentes células, as quais foram investigadas neste trabalho.

Referências bibliográficas

- ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.364-368, 2007.
- BARROS, M.; FLEURI, L.F.; MACEDO, G.A. Seed Lipases: Sources, Applications and Properties - A Review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.27, p15-29, 2010.
- CASTRO, R.J.S.; SATO, H.H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and alfa-amylase under solidstate fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p.813– 821, 2013.
- DE GREYT, W.F.J.; KELLENS, M.J. Improvement of nutritional and physicochemical properties in milk fat, in Structural and modified lipids (Gunstone, F. D., Ed. Marcel Dekker), New York, p. 285-312, 2001.

- FARFÁN, M.; VILLALÓN, M.J.; ORTÍZ, M.E.; NIETO, S.; BOUCHON, P. The effect of interesterification on the bioavailability of fatty acids in structured lipids. ***Food Chemistry***, v.139, p.571–577, 2013.
- FLEURI, L. F. Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas. Tese de Livre Docência. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, 2016.
- FLEURI, L.F.; CASSANI, M.; ARCURI, M.; CAPOVILLE B.L.; PEREIRA M.S.; DELGADO C.O.; NOVELLI P. K. Production of fungal lipases in wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. ***Food Science and Biotechnology***, v.1, p.1-15, 2014.
- FLEURI, L.F.; KAWAGUTI, H.Y.; PEDROSA, V.A.; VIANELLO, F.; LIMA, G.P.P.; NOVELLI, P.K.; DELGADO C.O. Exploration of Microorganisms Producing Bioactive Molecules of Industrial Interest by Solid State Fermentation. In: Giuseppina Pace Pereira Lima; Fábio Vianello. (Org.). ***Food Quality, Safety and Technology. Led.: Springer-Verlag Wien***, v.1, 163p, 2013.
- FORSTER-CARNEIRO, T.; BERNI, M.D.; DORILEO, I.L.; ROSTAGNO, M.A. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. ***Resources, Conservation and Recycling***, v. 77, p. 78–88, 2013.
- LOHRASBI, M.; POURBAFRANI, M.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M.J. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. ***Bioresource Technology***, v.101, n.19, p.7382-7388, 2010.
- MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M.A.; FIGUEROA, J.G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. ***Food Chemistry***, v.135, p.1520–1526, 2012.

PULIGUNDLA, P.; JUNG, J.; KO, S. Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications. *Food Control*, v.25, p.328-333, 2012.

WANG, H.X.; WU, H.; HO, C.T.; WENG, X.C. Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chemistry*, v.97, p.661–665, 2006.

ZAGO, E.; BOTTON, V.; ALBERTON, D.; CÓRDOVA, J.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; KRIEGER, N. (2014). Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. *Energy & Fuels*, 28(8), 5197-5203, 2014.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Resíduos

Nos últimos anos a procura da população por alimentos processados cresceu substancialmente. Para suprir a demanda a indústria de alimentos elevou proporcionalmente sua produção, trazendo como consequência uma expressiva geração de resíduos. No setor de citricultura isso também ocorre já que a maioria da produção é processada para suco e, durante o processamento, cerca de metade do peso do fruto se torna resíduo (Lanza, 2003; Hernández, 2005; Koblitiz, 2011).

Os processos utilizados para obtenção de suco de laranja são bem estabelecidos e subdividem o fruto em frações residuais que consistem em bagaço, casca, frit e polpa (J. B. T. Food Tech, 2015). Durante o processamento as frações não são submetidas a tratamentos químicos e térmicos, sendo esta particularidade interessante, visto que esses resíduos podem ser fonte direta de compostos ativos de valor comercial, e que tais processos poderiam diminuir ou inativar essas moléculas (Lanidaya, 2009; Okino-Delgado & Fleuri, 2014).

Por definição anatômica as partes constitutivas da laranja compreendem: epicarpo, parte colorida e mais externa do fruto; mesocarpo, composta pelo albedo; e endocarpo, composta pelos gomos, na qual estão inseridas as sementes. Comparando os constituintes do fruto pela definição da anatomia vegetal e a industrial, a fração residual denominada casca constitui o epicarpo; o frit corresponde à parte mais externa do fruto sendo também fração do epicarpo; o bagaço corresponde ao mesocarpo e a polpa ao endocarpo (Figura 1) (Vidal & Vidal, 2006; J. B. T. Food Tech, 2015; Fleuri, 2016).

A definição de resíduo, segundo a União Européia, “cabe a qualquer substância a qual o detentor se desfaz ou tem a intenção ou obrigação de se desfazer, considerando como tal tudo o que não é o produto principal” (Conselho Comunidade Européia – EU, 1991).

Com intuito de otimizar a utilização de resíduos para obtenção de biocompostos, deve-se observar alguns aspectos. Preferencialmente, esses devem estar atrelados a processos bem estabelecidos de obtenção e serem produzidos em grandes volumes. Outros fatores como sazonalidade do produto principal devem ser considerados para não haver limitação quanto à produção e obtenção das moléculas de interesse. A conservação e o armazenamento também são requisitos importantes, pois condições desfavoráveis podem acarretar em perda de atividade dessas biomoléculas. Um fator limitante ao uso dessas substâncias está no próprio processamento em que são submetidas e que podem desestruturá-las (temperaturas elevadas, condições extremas de

pH e adição de químicos). Desta forma, apresenta-se como boa alternativa para obtenção de enzimas os subprodutos provenientes do processamento de suco de laranja, pois as frações residuais são ricas em biocompostos e não são submetidas a esses tratamentos (Devasena, 2010; O'Shea et al., 2012; Okino-Delgado & Fleuri, 2014; Fleuri, 2016).

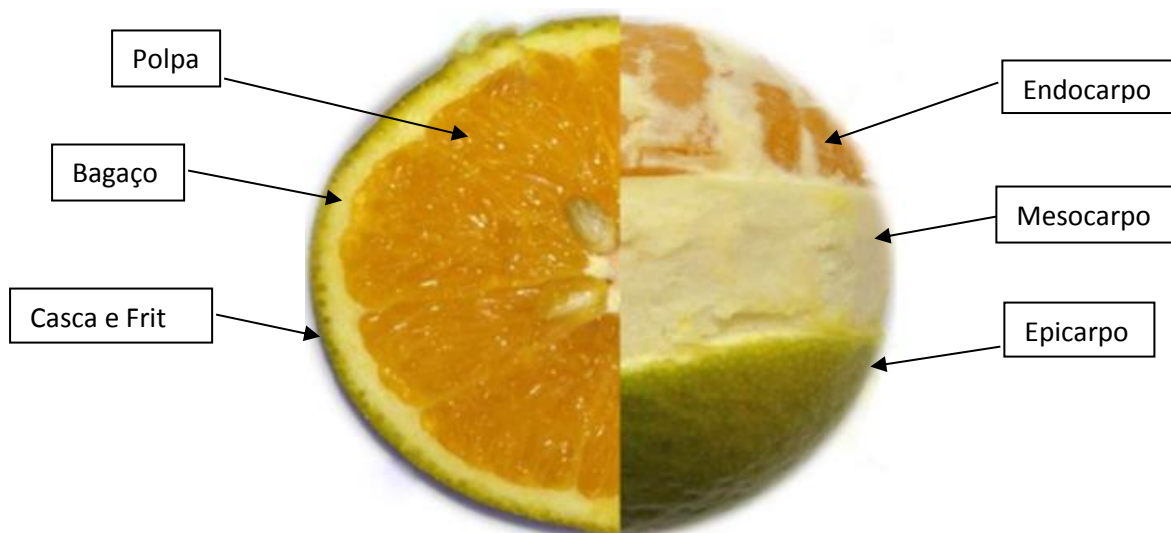


Figura 1. Partes constitutivas da laranja, definições anatômicas e industriais. Sendo epicarpo, parte colorida e mais externa do fruto; mesocarpo, composta pelo albedo; endocarpo, composta pelos gomos, na qual estão inseridas as sementes; casca constitui o epicarpo; frit corresponde à parte mais externa do fruto sendo também fração do epicarpo; bagaço corresponde ao mesocarpo e a polpa ao endocarpo (Okino-Delgado & Fleuri, 2014).

Nas últimas décadas, muitas indústrias estão considerando a utilização de resíduos não só como medida de preservação do meio ambiente, mas também, de geração de capital. Os resíduos do processamento de suco de laranja atualmente são aproveitados pelas indústrias química, farmacêutica, alimentícia (Tabela 1), como forma de agregar valor a tais subprodutos e diminuir o impacto ambiental causado pelo acúmulo destes no meio ambiente (Rezzadori e Benedetti, 2009).

Tabela 1. Aplicações dos subprodutos de laranja pela indústria

Subprodutos	Aplicação na indústria	Referências
-------------	------------------------	-------------

Óleo Essencial	Bebidas, cosméticos e produtos químicos	
Comminuted Citrus Base	Bebidas à base de frutas	
Pectina	Alimentos como geleias, marmeladas e gelatinas	
Essência	Bebidas e alimentos	Alexadrino et al. (2007)
Farelo de Polpa Cítrica	Alimentação fibrosa de aminaais como ovelhas e gado	
D-Limoneno ou Terpeno ítrico	Plásticos, resinas sintéticas e adesivos	
Resíduos da laranja	Produção de etanol	Antunes et al. (2015) Silva et al. (2015) Cardoso et al. (2014)

2.2 Enzimas

As enzimas são biocatalisadores presentes nas células que apresentam diversas funções metabólicas. Do ponto de vista biotecnológico são requeridas devido à sua grande versatilidade de atuação em diversas áreas apresentando um viés promissor(Sá-Pereira et al., 2008; Fleuri, 2016).

As enzimas podem ser obtidas de diversas fontes, dentre elas as vegetais como frutos, folhas, sementes e látex. No entanto, para que seu uso em escala industrial seja viável, deve apresentar baixo custo e não estabelecer competição com o setor alimentício. Nesse sentido, a utilização de subprodutos agrícolas e agroindustriais constitui-se uma boa fonte de enzimas vegetais sem prejuízos (Sá-Pereira et al., 2008; Castro & Sato, 2013; Fleuri, 2016).

Enzimas hidrolíticas como as lipases são úteis em reações de transformação e se distinguem por apresentarem características muito peculiares (Armenta et al., 2015).

2.2.1 Lipases, reações e aplicações

A lipase (E.C. 3.1.1.3) (triacilglicerol lipase) está entre as enzimas que podem ser obtidas de resíduos vegetais. Estudos como o de Okino-Delgado e Fleuri (2014) observaram a presença de lipases em resíduos do processamento de suco de laranja nas frações bagaço, casca e frit, que além de apresentarem alta atividade são ambientalmente corretas, pois são oriundas de recursos renováveis.

Essas enzimas se destacam pela atuação em condições amenas de temperatura e pressão, alta atividade e estabilidade em água e em solventes orgânicos. Além disso, catalisam reações diferentes com baixa ou nenhuma produção de compostos tóxicos. A facilidade de manipulação oferece acesso à vasta gama de transformações que são amplamente utilizadas para a obtenção de produtos farmacêuticos, cosméticos, agrícolas, química fina, e outros (Armenta et al., 2015).

2.2.1.1 Reações de Hidrólise e Esterificação

As lipases atuam como catalisadores em diferentes reações, mas tipicamente em meio aquoso, realiza a quebra da ligação éster do triglicerídeo produzindo água, glicerol, ácidos graxos, monoglicerídeos e diglicerídeos. Reações de esterificação (inversas à hidrólise) também são catalisadas pelas lipases em meio microaquoso (Barros et al., 2010; Fleuri et al., 2014). Assim sendo, além de hidrolisar ésteres de triglicerídeos, as lipases também catalisam reações de síntese em condições onde há baixa disponibilidade de água, promovendo a formação das ligações ésteres, a partir de um álcool e ácido carboxílico. Para essas reações os substratos reacionais podem ser, por exemplo, os ácidos graxos resultantes de reações de hidrólise e álcoois como etanol, glicerol e metanol, sendo que o conteúdo de água no meio normalmente controla a direção (direta/hidrólise ou inversa/síntese) e a velocidade que elas irão ocorrer (Carvalho et al., 2003; Castro et al., 2004; Fleuri, 2016).

Segundo Fleuri (2016) a disponibilidade de água, agitação, tempo, temperatura, concentração inicial de substrato e pureza dos reagentes, podem influenciar essas reações. Em relação à enzima deve-se considerar a especificidade e condições ótimas para catálise (pH, temperatura e estabilidade) e a utilização de sistemas livres ou combinados de lipases.

Reações de hidrólise e esterificação catalisadas por lipases apresentam diversas aplicações, tais como, tratamento de óleos e gorduras residuais (biorremediação); obtenção de ácidos graxos poli-insaturados aos quais são atribuídos diversos efeitos

funcionais; produção de ácidos graxos livres a partir de óleos e gorduras que podem ser posteriormente esterificados resultando em um rearranjo dos grupos de ácidos graxos produzindo um novo glicerídeo com propriedades físicas e químicas particulares; produção de biodiesel, entre outras (Carvalho et al., 2003; Pereira et al., 2003; Morin et al., 2013; Fleuri, 2016).

Além disso, de maneira geral, essas reações apresentam grande aplicabilidade no setor industrial como nas indústrias farmacêuticas, cosméticas, de detergentes, têxtil, biocombustíveis, agrotóxicos e de alimentos (panificação, lácteos, dietéticos). As vantagens associadas às aplicações de lipase incluem: versatilidade de atuação, eficiência sob condições reacionais brandas, obtenção de biomoléculas aprimoradas e síntese de novos produtos com melhor funcionalidade. Devido às essas razões, as lipases destacam-se como as enzimas mais requeridas em reações de transformação (Devasena, 2010; Itabaiana et al., 2013).

Goswami et al. (2013) aplicaram lipases oriundas de diferentes fontes em reações de hidrólise do óleo de mamona para obtenção de ácido ricinoleico, um importante ácido graxo com vasta aplicabilidade na indústria, tais como: formulações de tintas e plásticos, proteção anti-corrosiva, lubrificante, fármacos, cosméticos entre outras. As reações foram eficientes para liberar o ácido graxo de interesse, podendo-se observar taxas de conversão maiores que 90% para a lipase vegetal proveniente de mamona e animal proveniente de pâncreas de porco.

Abdelmoez et al. (2013) verificaram a atividade de lipase de *Candida rugosa* ATCC 14830, que apresentaram 12 U/ml em substrato de azeite de oliva (OO). Essas lipases foram eficientes na hidrólise do óleo de girassol com conversão máxima de 39,5% após 24 h.

Lipases oriundas de *Rhizopus microsporus* CPQBA DRM 312-07, obtidas por meio de fermentação em estado sólido, foram utilizadas por Zago et al. (2014) na síntese de ésteres etílicos, com um rendimento de 68% após 72 h de reação, esses resultados foram promissores na aplicação de produção de biodiesel.

Por sua vez, Yan et al. (2014) sintetizaram por meio de reações de esterificação ésteres de ácidos graxos de cadeia curta com propriedades aromatizantes, com taxas de converção acima de 80%, utilizando lipases oriundas de *Aspergillus oryzae* WZ007.

2.2.1.2 Reações de Interesterificação

Outra importante reação catalisada pelas lipases é a interesterificação que pode ocorrer dentro da mesma molécula de triglicerídeo ou entre moléculas diferentes (De Greyt e Kellens, 2001). Nesta reação ocorre a remoção e a redistribuição dos ésteres de ácidos graxos e, por isso, a regioespecificidade da enzima é importante para designar onde ocorrerá a hidrólise e reposicionamento das ligações ésteres, podendo ocorrer nas posições 1 e 3 (extremidades da molécula) ou posição 2 (central) (Wang et al., 2006).

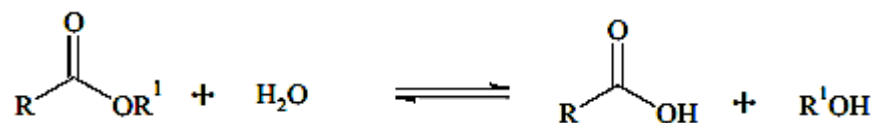
Desta forma, a regioespecificidade e a especificidade por substratos de tamanho de cadeia diferentes são características importantes para a aplicação em reações de interesterificação, já que, as lipases podem hidrolisar e recolocar as ligações ésteres em posições específicas da molécula de triglicerídeo liberando ácidos graxos com diferentes tamanhos ou formando lipídeos com características individuais. O perfil e a posição do ácido graxo liberado, bem como o lipídeo reestruturado estão diretamente relacionados com a elevada especificidade das lipases, o que possibilita um grande número de aplicações (De Greyt & Kellens 2001; Wang et al., 2006; Farfán et al., 2013).

Reações de interesterificação têm sido utilizadas para a mudança das propriedades nutricionais dos óleos e gorduras, pois a mudança na composição de ácidos graxos e reorganização de suas posições estereoquímicas nos triglicerídeos implicam em produtos diferenciados (Castro et al., 2004).

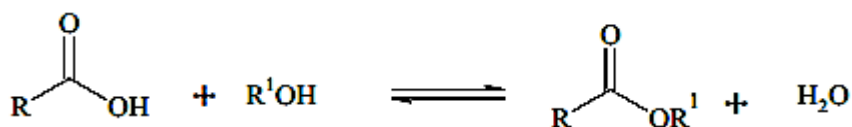
Além disso, lipases que interesterificam podem melhorar os atributos sensoriais de óleos e gorduras (Ribeiro et al., 2009) alterando as propriedades físico-químicas dos substratos sem a produção de ácidos graxos trans que são conhecidos por terem efeitos prejudiciais à saúde (Idris & Mat Dian, 2005). Os produtos resultantes mantêm o perfil e o grau de saturação dos ácidos graxos de partida da mistura reacional, mas apresentam um triglicerídeo estereoquimicamente diferente, o que resulta em novas características físico-químicas e novas propriedades nutricionais. Estas novas gorduras são definidas como lipídeos estruturados (Karabulut et al., 2004; Klinkesorn et al., 2004; Hamam et al., 2005).

Feddern et al. (2013) utilizaram interesterificação para modificar a estrutura da gordura presente na pele de frango que é naturalmente rica em ácidos graxos do tipo oleico e palmítico. Esta gordura é uma mistura de ácidos graxos de cadeia ramificada foram submetidos à reação catalisada por lipases fúngicas de *Rhizomucor miehei* resultando na produção de lipídios modificados enriquecidos em ácidos graxos poli-insaturados.

Hidrólise



Esterificação



Interesterificação

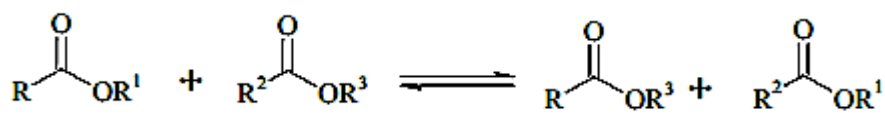


Figura 2. Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases (Barros et al., 2010). Sendo: R, R¹, R² e R³ referentes aos grupos funcionais dos glicerídeos, sendo R¹ e R³ correspondentes ao grupo éster da molécula; enquanto R e R² correspondem ao grupo metil.

2.3 Compostos lipídicos e atividades biológicas

Os óleos vegetais são gorduras extraídas de plantas, constituídos principalmente de triglicerídeos (> 95%) e pequenas quantidades de mono e diglicerídeos, os quais têm como constituição básica glicerol e ácidos graxos que variam quanto ao tamanho da cadeia de carbono e números de ligações duplas. A determinação do perfil lipídico desses compostos é fundamental para o conhecimento da qualidade dos óleos, para a verificação do efeito de processamentos, adequação nutricional do lipídio ou do alimento que o contém (Balat et al., 2008).

Óleos e gorduras possuem constituição diferente de ácidos graxos, cujas propriedades físicas, químicas e biológicas são determinadas, principalmente, pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbônica bem como pela distribuição espacial destes sobre o esqueleto do triglicerídio (Perdomo et al., 2015).

Os ácidos graxos (Figura 3) são considerados como ácidos monocarboxílicos alifáticos, amplamente distribuídos em vegetais onde geralmente estão ligados à açúcares, glicerol e grupos fosfatos formando os lipídios. A catálise dessas estruturas gera ácidos graxos livres que são cadeias de carbono ligadas a átomos de hidrogênio que

possuem em uma das suas extremidades um grupo carboxila e na outra o grupo metila, em que o número de átomos de carbonos pode variar entre 4 e 28. Os ácidos graxos de cadeia curta possuem cadeia com número inferior a 8 carbonos, cadeia média entre 8 e 16 e cadeia longa acima de 16 carbonos (Desbois et al., 2010; Ruiz-Rodriguez et al., 2010; Lima et al., 2011). Quanto ao grau de instauração são considerados saturados os que não possuem duplas ligações, insaturados os que contenham apenas uma e poli-insaturados (PUFAS) os que possuem duas ou mais (Perdomo et al., 2015).

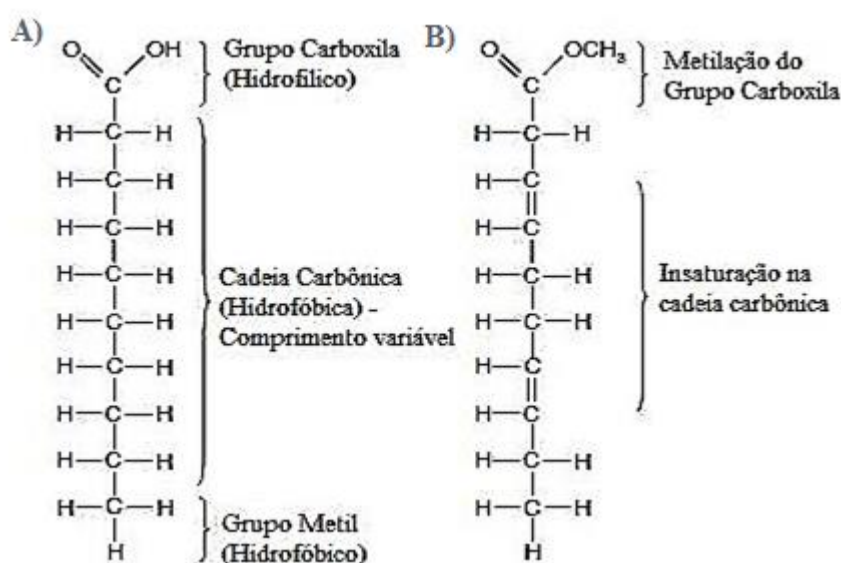


Figura 3. Estruturas de ácidos graxos livres. Sendo, A) ácido graxo livre saturado (ácido cáprico) com 10 átomos de carbono tendo em uma extremidade um grupamento carboxila (-COOH) e na outra extremidade um grupamento metil (-CH₃); B) Ácido graxo livre poli-insaturado com duas duplas ligações (C=C) (Desbois et al., 2010).

Os PUFAs são considerados ácidos graxos essenciais porque não podem ser sintetizados pelo organismo humano e devem ser fornecidos através da dieta. Classificam-se funcionalmente nas séries ω 9 (n-9), ω 6 (n-6) e ω 3 (n-3), representados respectivamente pelos ácidos oleico (OL), linoleico (AL) e alfa-linolênico (ALA), sendo dentre eles destacados os das séries ω -6 e ω -3 (Salem, 1999). A presença desses compostos pode ser observada em alguns alimentos como pescados, grãos e sementes oleaginosas e alguns óleos vegetais, entretanto, devido ao potencial biotecnológico para melhorar as propriedades de matérias-primas naturais, ou submetê-las às transformações, o mercado mundial apresenta uma ampla gama de suplementos alimentares de PUFAs ω 6 e ω 3 e de produtos nos quais estes ácidos são incorporados estando comercialmente disponíveis sob diferentes formas estruturais e de ligações

(ácidos graxos livres, ésteres etílicos, triacilglicéridos e fosfolipídios) (Carvalho et al., 2003; Castro et al., 2004; Morin et al., 2013; Xue et al., 2013).

Estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram que os PUFA ω -3 e ω -6, têm efeitos benéficos no tratamento de várias patologias, desde doenças cardiovasculares, autoimunes e inflamatórias, neurológicas, dislipidemia, resistência à insulina a vários tipos de neoplasias incluindo cancro de mama, de ovário, de próstata e colorectal (Garófolo & Petrilli, 2006; Kato et al., 2008; Siddiqui et al., 2008; Skulas-Ray et al., 2011; Simopoulos, 2016).

Ma et al. (2015) analisaram a resposta da viabilidade de células cancerígenas de tumor de próstata *in vitro* e *in vivo* na presença de uma proporção dietética de PUFA ω 6: ω 3. A análises revelaram uma diminuição dependente da dose na viabilidade das células cancerígenas e inibição dependente da dose do crescimento tumoral e do peso final do tumor à medida que a razão ω 6: ω 3 foi equilibrada. Isto sugere que a proporção dietética desses compostos desempenha um papel importante na viabilidade celular do tumor de próstata e pode indicar uma proporção dietética ótima para a prevenção e tratamento.

Os ácidos graxos também apresentam outras atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, antioxidante e de sinalização. A atividade antibacteriana de cada ácido graxo é influenciada por sua estrutura e forma, onde o comprimento da cadeia e a presença, o número, posição e orientação das ligações duplas interferem na atividade (Desbois et al., 2010; Mezni et al., 2012).

Vários estudos relataram ação antimicrobiana de ácidos graxos saturados e insaturados, sob a forma de óleo ou compostos individuais (Dilika et al., 2000; Yff Et al., 2002; Narasimhan et al., 2006).

Kitahara et al. (2006) investigaram *in vitro* o efeito sinérgico de uma combinação de ácido láurico e gentamicina, sendo que a combinação apresentou atividade sinérgica contra *Staphylococcus aureus* (MRSA). O estudo concluiu que o ácido láurico é um potencial agente antimicrobiano também adequado para aplicação externa.

Há um interesse crescente sobre os efeitos dos ácidos graxos e outros compostos lipídicos (ou deles derivados) no metabolismo e saúde (Oliveira, 2006; Fleuri, 2016). Em vista deste grande potencial, pesquisas voltadas a esta área têm relatado a aplicação de diferentes métodos físicos, químicos e enzimáticos visando à obtenção de lipídeos diferenciados a partir de substratos como os óleos vegetais (Carvalho et al., 2003;

Rodrigues & Gioielli, 2003; Karabulut et al., 2004; Klinkesorn et al., 2004; Armenta et al., 2015). Esses por sua vez, podem ser estruturalmente modificados por reações enzimáticas de hidrólise, esterificação ou interesterificação podendo gerar produtos com propriedades biológicas diferentes e promissoras (Fleuri, 2016).

Os experimentos para o desenvolvimento deste trabalho foram executados conforme o fluxograma a seguir (Figura 4).

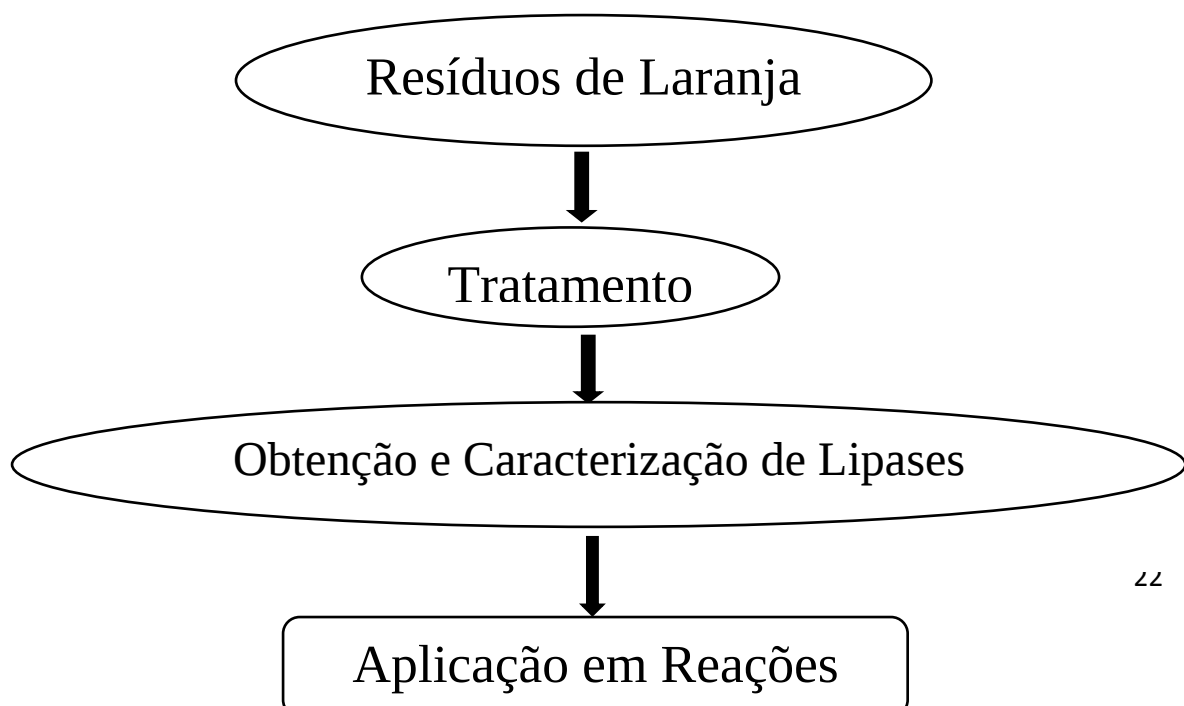


Figura 4. Fluxograma dos experimentos realizados. A partir de resíduos de laranja tratados foram obtidas lipases que foram caracterizadas e aplicadas em reações de hidrólise e síntese para a obtenção de compostos com diferentes atividades biológicas. Os compostos bioativos foram correlacionados com perfil e estruturas químicas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Obtenção dos resíduos de laranja Pera

Os resíduos de laranja utilizados para as análises são pertencentes à espécie *Citrus sinensis* variedade Pera Rio, cultivada no estado de São Paulo. Os resíduos foram separados em 4 subprodutos, a saber: bagaço, casca, frit e polpa em processos bem estabelecido utilizando extratoras *in line* da empresa J. B. T. FoodTech (J. B. T. FoodTech, 2013).

3.2. Concentração dos extratos enzimáticos de lipases oriundas de resíduos de laranja

Os resíduos de laranja da variedade Pera foram triturados mecanicamente até atingir granulometria homogênea, congeladas por 24 h e liofilizadas por 48 h a -60°C (Okino-Delgado, 2014). Posteriormente, foram concentradas por *salting out*, utilizando sulfato de amônio a 80%, dialisadas em membrana de celulose e novamente liofilizadas a -60°C por 24 h. Cada fração foi tratada separadamente sendo então embaladas e armazenadas congeladas a aproximadamente -7°C . As frações bagaço, casca, frit e polpa (Figura 5), foram utilizadas como extrato enzimático para as determinações de atividades enzimáticas e emprego nas reações.



Figura 5. Frações residuais de laranja após trituração mecânica, liofilização, concentração por saturação com sulfato de amônio 80% e liofilização.

3.3. Determinação da atividade de hidrólise de lipases dos resíduos de laranja

A atividade lipolítica foi medida seguindo o método descrito por Macedo et al. (1997) e modificado por Okino-Delgado (2014), utilizando como substrato 5 mL de emulsão de solução de goma arábica e azeite de oliva extra virgem (3:1, v/v), 2 mL de tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 e 0,5 g de extrato enzimático (frações residuais de laranja Pera: bagaço, casca, frit e polpa). A mistura reacional foi incubada por 30 min à 40°C em banho termostatizado com agitação de 130 opm. A reação foi paralisada pela adição de acetona:etanol (1:1, v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,05 M utilizando fenolftaleína como indicador. Um branco composto pelos mesmos reagentes exceto a enzima, foi preparado e submetido às mesmas condições reacionais para padrão comparativo e o resultado obtido na titulação foi descontado da amostra correspondente como garantia de que os resultados obtidos na titulação eram referentes à reação com os extratos enzimáticos e não dos ácidos presentes no substrato.

Cada unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 μ mol de ácido graxo por min nas condições de ensaio.

3.4. Determinação da atividade de esterificação de lipases dos resíduos de laranja

A atividade de esterificação foi analisada segundo o método descrito por Talukder et al. (2007) modificado. Em tubo falcon, uma alíquota de 1,17 g do extrato enzimático foi adicionada a um meio reacional contendo 0,40 g de ácido láurico (0,2 M); 0,37 g de dodecanol (0,2 M); 10 mL de isooctano e 1 mL de tampão fosfato 0,01 M pH 7. Esse sistema foi incubado por 30 min a 37°C com agitação de 200 opm. A reação foi paralisada pela adição de 10 mL de acetona:etanol (1:1, v/v) e os ácidos remanescentes foram titulados com NaOH 0,05 M e fenolftaleína como indicador. Um branco composto pelos mesmos reagentes exceto a enzima, foi preparado e submetido às mesmas condições reacionais para padrão comparativo e o resultado obtido na titulação foi descontado da amostra correspondente. Uma unidade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μ mol de dodecanol laurato por min nas condições de ensaio.

3.5. Caracterização das lipases dos resíduos de laranja

3.5.1 Especificidade quanto ao tamanho de cadeia do substrato

O p-nitrofenil palmitato (p-NPP) é um substrato sintético composto por ácidos graxos de cadeia longa (16 C) sendo que a atividade lipolítica das frações enzimáticas de laranja sobre esse substrato foi analisada pelo método descrito por Mahadik et al. (2002) e Lopes et al. (2011).

O p-nitrofenil laurato (p-NPL) é constituído por ácidos graxos de cadeia média (12 C), sendo que a atividade lipolítica sobre esse substrato foi analisada pelo método descrito por Gutarra et al. (2009).

O p-nitrofenil butirato (p-NPB) é composto por ácidos graxos de cadeia curta (4 C), sendo que a atividade lipolítica sobre esse substrato foi analisada pelo método descrito por Calado et al. (2002) e Lopes et al. (2011).

3.5.2 Caracterização do perfil proteico dos extratos enzimáticos dos resíduos de laranja

Na avaliação do perfil de proteínas utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) conforme metodologia de Weber e Osborn (1969). Para isso 0,1g dos extratos enzimáticos foram centrifugados em 0,5 mL de tampão fosfato 0,01 M pH7, sendo que uma alíquota do sobrenadante de cada extrato foi coletada e incubada a 70°C por 3 min juntamente com agente desnaturante SDS-PAGE e então aplicada no gel. O experimento foi conduzido usando tampão Tris/HCL 1,5M (pH 8,8); gel de concentração 4% e gel de separação 8% de poliacrilamida; em cuba vertical (sistema Mini Protean – Bio-Rad), empregando-se corrente de 80V para empacotamento e 100V para corrida por cerca de 2 h. Após o término da corrida, para a revelação das proteínas, utilizou-se a coloração com nitrato de prata (Shevchenko et al., 1996). Para comparação foi utilizado o padrão Precision Plus Protein Dual Color Standards da Bio-Rad, que possui pesos moleculares variando entre 10 a 250 KDa. Para o cálculo dos pesos moleculares das amostras foi utilizada equação da reta obtida pela relação entre o fator de retenção (Rf) e o log da massa molecular dos padrões e o Rf das frações avaliadas. O Rf foi calculado como a razão da distância percorrida pela amostra ou padrão pela distância percorrida pelo solvente.

3.5.3 Especificidade das lipases quanto à posição estereoquímica do ácido graxo

A regioespecificidade das lipases produzidas a partir de resíduos de laranja foi determinada segundo Meghwanshi et al. (2006) modificado, pela incubação de 0,5 mL de trioleína com 0,1 g de extrato enzimático dissolvido em 2,5 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 a 40°C e 100 rpm durante 24 h. Após a reação, alíquotas de 500 µL foram retiradas e 1,5 mL de éter etílico foi adicionado como paralisador. Os produtos resultantes da hidrólise da trioleína pelas lipases foram avaliados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel (fase estacionária). A fase móvel foi composta por éter de petróleo, éter etílico e ácido fórmico na razão de 210: 90: 0,4 (v:v:v) e como revelador foi utilizado método de imersão da placa em câmara contendo ácido sulfúrico 10% em etanol. A lipase 1,3-regioespecífica de *Rhizomucor miehei* da

empresa Sigma Aldrich foi utilizada como controle, bem como os padrões monoleína, dioleína, ácido oleico, trioleína e glicerol.

3.6. Aplicação das lipases

3.6.1 Modificação de óleos vegetais por reação de hidrólise

As lipases foram empregadas na modificação de nove óleos vegetais (babaçu, dendê, girassol, mamona, milho, oliva, palmiste, soja e uva) por reação de hidrólise. Para isso amostras de 2,1 g de cada óleo, 5 mL de tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 acrescido de 10% de extrato enzimático em relação ao volume total da reação, foram emulsionados em tubos cilíndricos de 50 mL com tampa e o sistema incubado por 24 h em shaker a 100 opm a 40°C (Hartman e Lago, 1973). Para cada substrato reacional foram testadas todas as frações enzimáticas, um branco composto pelos mesmos reagentes exceto a enzima e um padrão utilizando lipase de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich). Os valores dos brancos foram descontados das amostras correspondentes. Seis ensaios foram preparados para cada óleo, três para determinação da porcentagem de hidrólise por titulação (triplicata) e três para serem utilizadas nas análises por cromatografia gasosa e determinação das atividades biológicas. Para a determinação da porcentagem de hidrólise a mistura reacional foi paralisada com 5 mL de etanol e acetona (1:1, v:v) e os ácidos graxos liberados titulados com solução de NaOH 0,05 M aquosa, utilizando 6 gotas de fenolftaleína como indicador. A porcentagem de hidrólise foi calculada como descrito por Fleuri et al. (2014).

% Hidrólise = $(A \times B \times C) / D \times E \times 100$; onde:

A: volume (ml) de NaOH

B: concentração molar de NaOH

C: massa molar de NaOH

D: Massa óleo (g)

E: Índice de saponificação do óleo

3.6.2 Reação de esterificação

Os extratos enzimáticos das frações residuais de laranja foram aplicados em reações de esterificação utilizando ácido oleico e etanol como substrato (Fleuri et al., 2014). Um sistema reacional, composto por 1 mol de ácido oleico, 5 moles de etanol e 10% de extrato enzimático em relação ao volume total do sistema, foram emulsionados

em tubos cilíndricos de 50 mL com tampa e incubados em shaker a 40°C e 100 opm, por 72 h. Um branco composto pelos mesmos reagentes exceto a enzima e um padrão utilizando lipase de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich) foram preparados e utilizados para comparação. Seis ensaios foram preparados, três (triplicata) para determinação da porcentagem de esterificação por titulação e três para serem utilizadas nas análises por cromatografia gasosa e determinação das atividades biológicas. Para a determinação da porcentagem de esterificação a mistura reacional foi paralisada com 5 mL de etanol e acetona (1:1, v:v) e os ácidos graxos existentes titulados com solução de NaOH 0,5 M aquosa, utilizando 6 gotas de fenolftaleína como indicador. A porcentagem de esterificação foi calculada segundo a equação descrita por Fleuri et al. (2014).

% de esterificação = $(A \times B \times C) / 10 \times D \times 100$ onde:

A: volume (ml) de NaOH

B: Concentração Molar de NaOH

C: MM Acido Graxo

D: Massa da alíquota titulada

3.6.3 Análise do perfil dos ácidos graxos obtidos nas reações

Uma alíquota de 1 mL dos produtos formados pelas reações de hidrólise e esterificação foi utilizada para traçar o perfil dos ácidos graxos. As fases extraídas foram preparadas utilizando o método descrito por O'Fallon et al. (2007), com modificações e analisadas segundo Ebrahimi et al. (2012). Para os produtos de reação de hidrólise, foram adicionados em tubo falcon de 25 mL 100 µL de amostra e 1,5 mL de NaOH 0,5 M (diluído em metanol). A mistura foi submetida a incubação a 100°C por 5 min. O tubo então foi resfriado e foram adicionados 4 mL de esterificante BF₃-MeOH 14% e a mistura foi novamente submetida a incubação a 100°C por 5 min, e, posteriormente, resfriada. Foi realizada a extração dos ésteres formados, adicionando 2 mL de heptano e 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A mistura então foi homogeneizada em vortex por 2 min e, após a separação de fases, o sobrenadante foi encaminhado para análise em cromatografia gasosa de alta eficiência.

Para os produtos de reação de esterificação adotou-se o mesmo procedimento, no entanto, sem adição do BF₃-MeOH 14%.

Os ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos remanescentes das amostras foram analisados utilizando-se cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010/AOC-20i) e cromatógrafo a gás acoplado a

espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP- 5000, Kyoto, Japan) providos de coluna capilar de sílica fundida DB-5 e OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), respectivamente, com impacto de elétrons de 70 eV e utilizando gás hélio para arraste com vazão de 1,7 mL min⁻¹, split 1/30. Para cada amostra adotou-se uma temperatura ideal, sendo:

-150°C (1 min⁻¹), 150°C - 280°C, 2°C min⁻¹, 280°C (1 min⁻¹), injetor a 230°C e detector a 300°C; para amostras contendo óleo de mamona.

-170°C (1 min⁻¹), 170°C - 280°C, 2°C min⁻¹, 280°C (20 min⁻¹), injetor a 280°C e detector a 300°C; para amostras contendo óleo de uva.

-180°C (10 min⁻¹), 180°C - 280°C, 5°C min⁻¹, 280°C (10 min⁻¹), injetor a 280°C e detector a 300°C; para amostras contendo óleo de milho e girassol.

-180°C (10 min⁻¹), 180°C - 280°C, 5°C min⁻¹, injetor a 280°C e detector a 300°C; para amostras contendo óleo oliva e ácido oleico.

Realizou-se a quantificação dos ésteres metílicos e etílicos por normalização das áreas dos picos e identificou-se por comparação dos tempos de retenção dos picos dos padrões comerciais com as amostras analisadas. Este experimento foi executado por meio de parceria com a Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo, do Instituto Agrônômico de Campinas (I.A.C).

3.6.4 Determinação das atividades biológicas dos produtos de reação

Os produtos resultantes das reações de hidrólise e esterificação foram utilizados para a determinação das atividades antioxidantes pelo método DPPH (Zhu et al., 2002; Chen et al., 2003), atividades antimicrobianas (Motta e Brandelli, 2002) e de citotoxicidade (Mosmann, 1983; De Souza Queiroz et al., 2007).

3.6.4.1 Atividades antioxidantes

Os produtos formados das reações de hidrólise e esterificação foram analisados quanto ao potencial antioxidante pelo método DPPH, como descritos por Zhu et al (2002) e Chen et al. (2003). Para isso uma alíquota de 500 μ L do sobrenadante de cada frasco contendo os produtos das reações foi retirada e transferida para tubo de ensaio com 3 mL de etanol P.A e 300 μ L de DPPH. Este meio reacional foi homogeneizado e permaneceu por 60 min em repouso na ausência de luz. Após este período foi efetuado

leitura a 517 nm. Antes de cada leitura o equipamento foi zerado com um branco respectivo à sua reação (branco da reação sem a presença de enzima). Os resultados foram calculados segundo equação de Zhu et al. (2002):

$$\text{Abs do Branco} - \text{Abs da Amostra} / \text{Abs do Branco} * 100 = \% \text{ DPPH reduzido.}$$

3.6.4.2 Atividades antimicrobianas

As atividades antimicrobianas foram determinadas de acordo com Motta e Brandelli (2002) com modificações. Para determinar atividade antibacteriana as cepas indicadoras testadas foram *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901). Os micro-organismos indicadores na concentração de 10^8 UFC/mL⁻¹ em solução salina (0,85% NaCl, p/v), foram inoculados em placas de ágar Mueller Hinton. Discos de difusão foram distribuídos uniformemente sobre as placas e sobre eles foram pipetadas as amostras. Como controle negativo foi utilizado solução salina e como controle positivo foi usado gentamicina 10 µg para cepas gram-negativas e vancomicina 30 µg para cepas gram-positivas. Alíquotas de 20 µL das amostras (produtos de reação de hidrólise e esterificação) foram pipetados nas placas com as estirpes indicadoras a cada 1 h por 3 h. Após cada aplicação as placas foram incubadas à temperatura ótima para cada micro-organismo testado e ao término permaneceu incubado por 24 h. Subsequentemente, foi observada a atividade inibidora contra o indicador bacteriano representada pela presença de halos claros que foram medidos e apresentados como uma zona de inibição em mm.

Para determinar a atividade antifúngica os fungos *Fusarium oxysporum* ssp. (IOC 4065), *Aspergillus fumigatus* (IOC 0081), *Penicillium expansum* (IOC 4076) e *Candida albicans* (IOC 2508) foram utilizados como indicadores. Cada fungo foi cultivado em *slant* de *Potato Dextrose Agar* (PDA) por 5 dias a 30°C. Após esse período foram adicionados 6 mL de água destilada esterilizada em cada *slant*. O crescimento foi homogeneizado com o auxílio de uma alça e espreado em placas de PDA. O teste foi realizado da mesma forma que o teste antibacteriano, utilizando discos de difusão sobre os quais foram pipetadas as amostras. As placas foram incubadas por 72 h a 30°C e foi observada a atividade inibidora contra o indicador fúngico representada por presença de halos claros. Como controle negativo foi utilizado solução salina e como controle positivo foi utilizado anfotericina B (1 µg/mL).

Para ambos os testes uma placa com os brancos das reações foi feita seguindo a mesma metodologia.

3.6.4.3 Avaliação da citotoxicidade - Teste de viabilidade celular por meio da redução de MTT

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados segundo Brackett et al. (2012) e Farquharson et al. (1993) por meio de parceria com o Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, do Departamento de Química e Bioquímica do IBB da Unesp. Linhagens de fibroblastos de camundongo normal NHI/3T3, queratinócitos humano normal HaCaT e tumoral SCC9 (carcinoma epidermóide bucal) foram mantidas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 ng/mL de sulfato de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (antibióticos) e mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Para manutenção da linhagem tumoral, SCC9, o meio de cultura foi suplementado adicionalmente com 400 ng/mL de hidrocortisona.

Para cada composto proveniente das reações enzimáticas de hidrólise e esterificação, foram testados três volumes diferentes: 10 µL (5%), 20 µL (10%) e 40 µL (20%). Paralelamente, as células das linhagens (NHI-3t3, HaCaT e SCC9) foram plaqueadas em placas de 96 poços, com meio convencional; a cada poço foi adicionado 100 µL (10000 cels). Após 24 h, o tratamento de cada composto foi realizado adicionando volumes específicos e meio de cultura DMEM para um volume final de 200 µL por poço (a saber: 90 µL, 80 µL e 60 µL).

Controle: Linhagens tratadas com meio convencional (DMEM + 10% Soro Fetal Bovino);

Grupo 2: Linhagens foram tratadas com 10 µL dos produtos de reação + 90 µL de meio convencional;

Grupo 3: Linhagens foram tratadas com 20 µL dos produtos de reação + 80 µL de meio convencional;

Grupo 4: Linhagens foram tratadas com 40 µL dos produtos de reação + 60 µL de meio convencional.

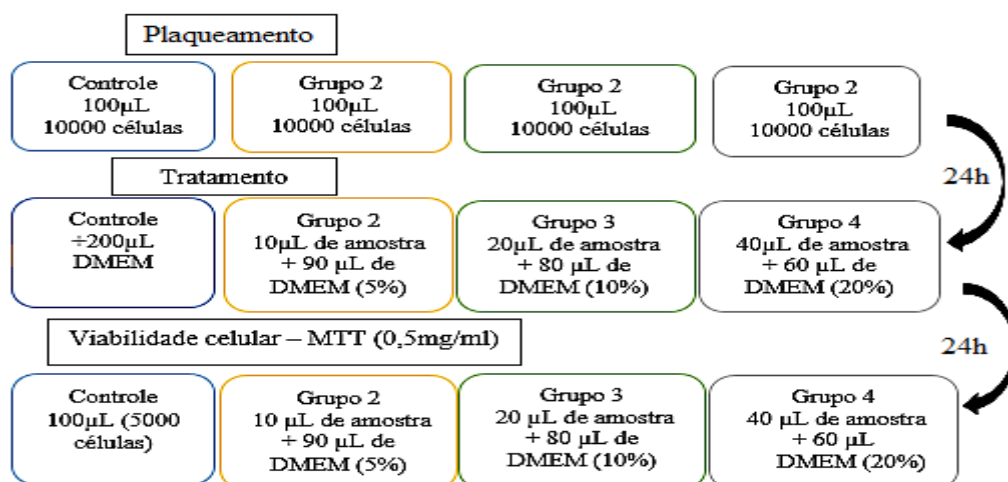


Figura 6. Esquema experimental da avaliação de citotoxicidade. Esquema sinalizando os momentos, em horas (h) de cada processo do MTT. As células foram plaqueadas 48 h antes da avaliação da viabilidade celular. Para cada grupo foi realizado um conjunto de replicatas (3 experimentos independentes), com n=9 para cada experimento.

Para realização dos testes de viabilidade celular, as células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células por poço em meio DMEM suplementado. Ao atingirem a semi-confluência (24 h após o plaqueamento), as células foram expostas aos compostos provenientes de reações enzimáticas em concentrações de 5%, 10% e 20%, diluídos em meio DMEM suplementado com 10% SFB e antibióticos, exceto para as células SCC9, as quais foram mantidas as condições ideais de cultura preconizadas pela ATCC (400 ng/ml). Após 24 h a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT.

4. Análise estatística dos resultados

Todos os testes foram realizados em triplicatas, com exceção da atividade antimicrobiana que foi realizada em duplicata. Os ensaios paramétricos foram realizados pelo Software *Assistat*, submetidos ao teste de normalidade e, dependendo do resultado, submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$). Para a análise de MTT foi utilizado o Software *Prism 6* e aplicados os testes ANOVA e Tukey.

5. Resultados e Discussões

5.1. Obtenção de lipases de resíduos de laranja

Os quatro subprodutos provenientes do processamento de laranja testados apresentaram atividade de hidrólise de lipase. Procedeu-se esta análise com amostras enzimáticas brutas e amostras concentradas por *salting out* com sulfato de amônio 80% de saturação seguidas de liofilização.

As lipases das frações enzimáticas brutas de bagaço, casca, frit e polpa apresentaram, respectivamente, 34,6 U/g; 35,2 U/g; 38,7 U/g e 38,2 U/g; enquanto que as concentradas com sulfato de amônio 80% de saturação, apresentaram 55,9 U/g; 58,0 U/g; 49,9 U/g; e 40,4 U/g; respectivamente (Figura 7).

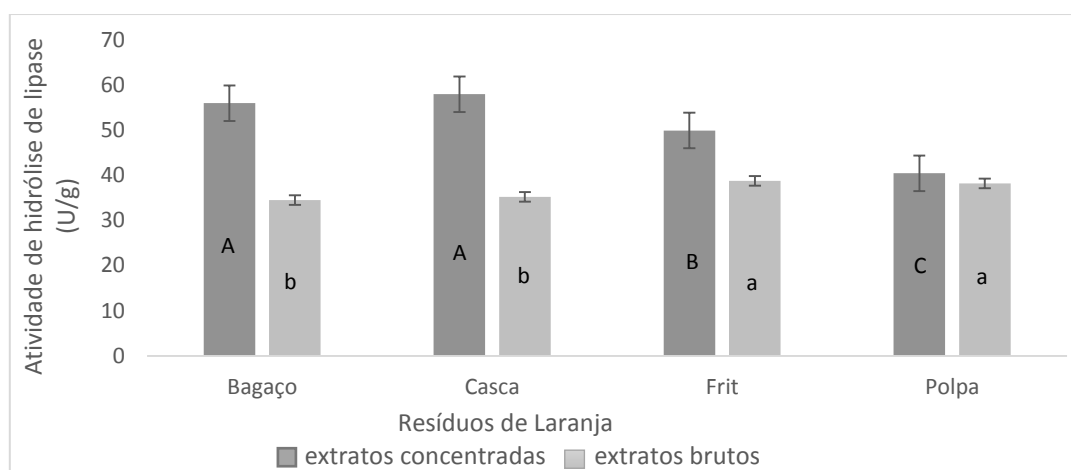


Figura 7. Atividade de hidrólise das lipases obtidas dos resíduos de laranja, bagaço, casca, frit e polpa, onde letras maiúsculas representam análise entre si dos extratos concentrados com sulfato de amônio 80% de saturação e minúsculas análise entre si dos extratos brutos. Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si para o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Okino-Delgado e Fleuri (2014) verificou atividades de lipases dos resíduos de laranja, em que foram detectadas para bagaço 36,5 U/g; para casca 37,2 U/g e 9,22 U/g para o frit.

Os quatro subprodutos foram avaliados quanto à atividade de esterificação (Figura 8), sendo detectado para bagaço 1,99 U/g; para casca 1,43 U/g; para frit 1,7 U/g e para polpa 1,16 U/g nas amostras concentradas com sulfato de amônio 80% de saturação. Nas amostras brutas não foi observada esta atividade.

Os valores obtidos nesse trabalho foram maiores do que os obtidos por Reinehra et al. (2014) que estudaram a atividade de esterificação de lipases oriundas de fungos utilizando a mesma metodologia aplicada no presente estudo. Os autores obtiveram taxas de 0,30 U/g para as lipases de *Aspergillus niger* (O-4) isolado de solo contaminado com óleo diesel, enquanto que o fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou atividade de esterificação de 0,47 U/g.

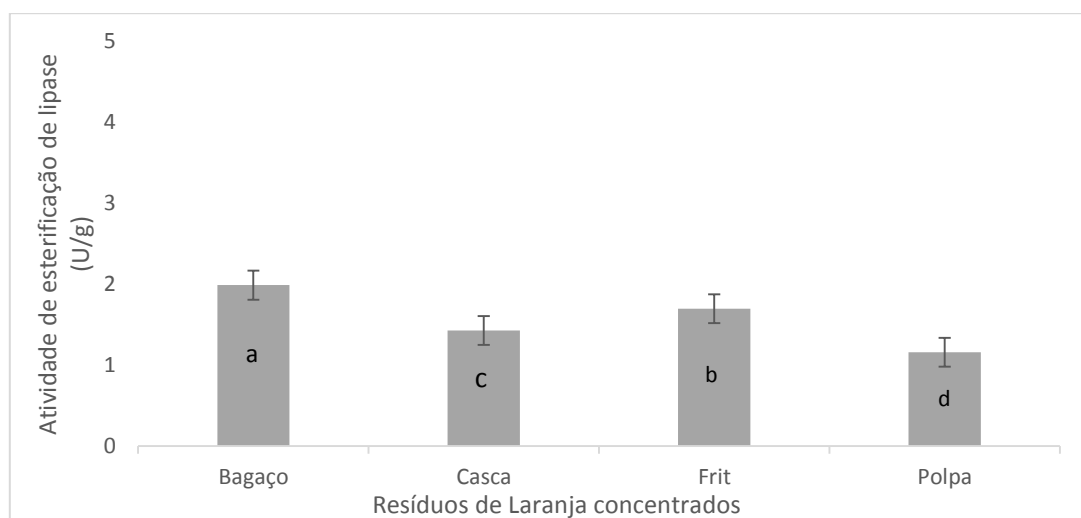


Figura 8. Atividade de esterificação das lipases obtidas dos resíduos de laranja, bagaço, casca, frit e polpa concentrados com sulfato de amônio 80% de saturação. Avaliadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Em função das atividades de hidrólise e esterificação mais expressivas obtida por meio das lipases saturadas com 80% de sulfato de amônio, e, posteriormente liofilizadas, os testes subsequentes foram executados com amostras enzimáticas submetidas a estes tratamentos.

5.2 Caracterização de lipases de resíduos de laranja

As amostras enzimáticas foram caracterizadas quanto à especificidade sobre cadeia carbônica de ácidos graxos de diferentes tamanhos (Tabela 2) utilizando-se substratos sintéticos de ácidos graxos de cadeias longa, média e curta, respectivamente, p-nitrofenil palmitato (p-NPP), p-nitrofenil laurato (p-NPL) e p-nitrofenil-butirato (p-NPB). As lipases de casca, frit e polpa apresentaram atividade de até 3,5 U/g em p-NPP e as de bagaço, casca e polpa de até 5 U/g em p-NPL. Todas as lipases (bagaço, casca, frit e polpa) apresentaram elevada atividade em p-NPB de até 19,5 U/g.

A alta atividade sobre ácidos graxos de cadeia curta apresentada pelas lipases, é muito interessante quando ponderado por exemplo, os benefícios da atuação desses compostos sobre regulação do sistema imunológico. Um conjunto de evidências indica que ácidos graxos de cadeia curta e seus metabólitos são reguladores por atuação direta ou indireta na diferenciação de células T, protagonistas nesse aspecto (Mucida et al., 2007; Arpaia et al., 2013; Mace et al., 2014; Nicolaou et al., 2014). Além disso, também induzem a quimiotaxia dos neutrófilos (Le et al., 2003; Vinolo et al., 2001) e regulam macrófagos e células dendríticas (Luhers et al., 2002; Millard et al., 2002) que são células envolvidas na resposta imune. Dessa forma, as lipases de resíduos de laranja Pera, se mostram uma alternativa para obtenção destes compostos.

Tabela 2. Estudo da especificidade por tamanho de cadeia carbônica do ácido graxo, em U/g, das lipases obtidas de resíduos de laranja Pera e concentradas com sulfato de amônio 80% de saturação.

Substrato Sintético	Lipase Bagaço	Lipase Casca	Lipase Frit	Lipase Polpa
P-NPP (cadeia longa)	0,00	1,08 U/g $\pm$ 0,44	3,50 U/g $\pm$ 0,08	1,40 U/g $\pm$ 0,07
P-NPL (cadeia média)	2,50 U/g $\pm$ 0,06	0,71 U/g $\pm$ 0,04	0,00	5,20 U/g $\pm$ 0,65
P-NPB (cadeia curta)	7,25 U/g $\pm$ 0,69	8,12 U/g $\pm$ 1,47	16,04 /g $\pm$ 2,6	19,50 /g $\pm$ 3,5

Na caracterização do perfil proteico das amostras de lipase dos resíduos de laranja por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 9) além de verificar o peso molecular que é importante para purificação de proteínas, também foi possível avaliar a homogeneidade das frações. Foram observadas quatro bandas mais proeminentes para a fração de bagaço, que indicaram massas moleculares de 20,55 KDa; 24,9 KDa, 37,0 KDa e 49,5 KDa; seis bandas para as frações de casca e frit que apresentaram as mesmas massas moleculares 20,55 KDa; 24,9 KDa; 37,0 KDa; 47,54 KDa; 49,5 KDa e 158,4 KDa); e sete para a polpa com massas moleculares de 18,48 KDa; 20,55 KDa; 24,9 KDa; 30,0 KDa; 37,0 KDa; 47,54 KDa e 49,5 KDa.

Nota-se que o perfil proteico das amostras é semelhante, sendo que no bagaço observou-se ausência de duas bandas em relação à casca e frit e três bandas em relação a polpa; porém as quatro massas moleculares detectadas no bagaço também foram notadas nas demais frações. Para casca e frit o perfil se mostrou homogêneo, sendo as mesmas massas moleculares detectadas nas duas frações, nas quais notou-se também a

presença de proteínas com 158,4 KDa que não foram observadas nas outras frações. Para polpa foram detectados maior número de proteínas e a presença de duas massas moleculares que não foram observados nas demais frações, a saber: 18,48 KDa e 30,0 KDa, sendo essa fração a mais heterogênea em relação as demais. Perfil semelhante foi observado por Lerma et al. (2016) que avaliaram o perfil proteico de casca e polpa de laranja, esses estudos detectaram um número maior de proteínas na fração de polpa em relação à casca e também maior diferença entre as massas moleculares observadas nesta fração.

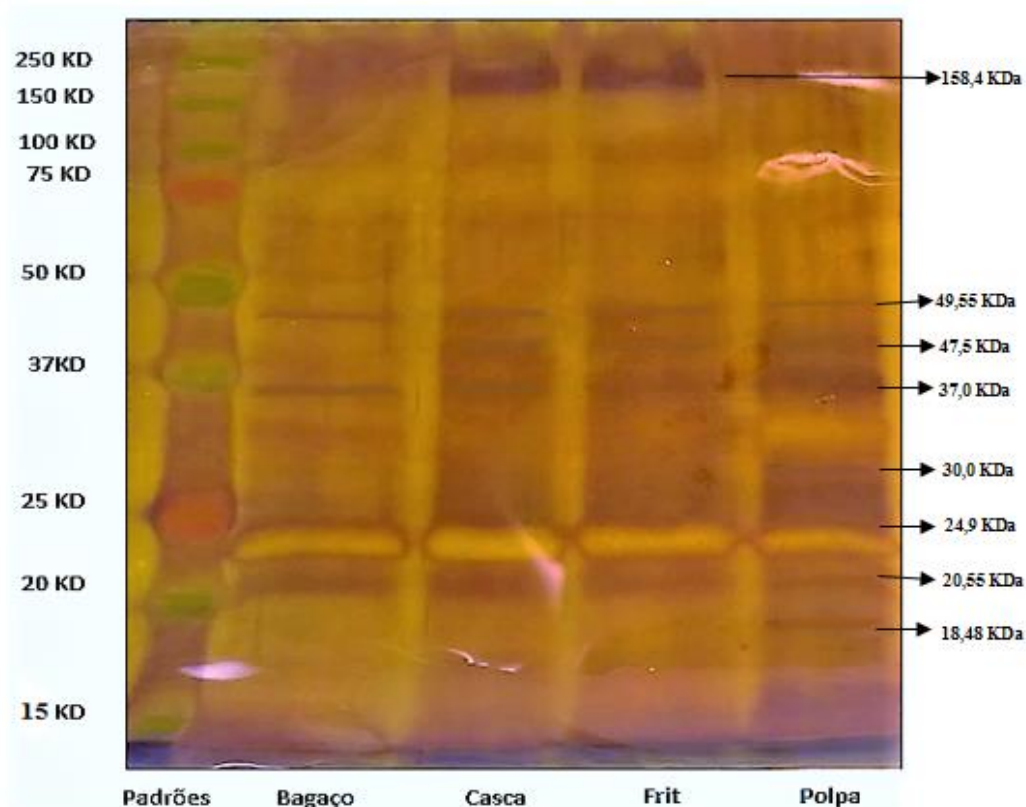


Figura 9: Placa de eletroforese em gel de poliacrilamida (4% concentração e 8% separação) para caracterização proteica por eletroforese SDS-PAGE dos extratos enzimáticos dos resíduos de laranja: bagaço, casca, frit e polpa.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, é amplamente utilizada para detectar massa molecular de proteínas (MARTINS et al., 2006). Muitos estudos relatam que lipases possuem peso molecular predominante de 19 a 60 KDa (LESUISSE et al, 1993; GAUR et al., 2008; LIU et al., 2008).

Pesquisadores purificaram em cromatografia de troca iônica e caracterizaram por SDS-page lipase hepática de *Tarodes pacifus*, sendo que os resultados mostraram que a massa molecular da enzima foi de 27 KDa (Park et al., 2007). Outros estudos, como os de Liu et al. (2008) produziram, purificaram e caracterizaram uma lipase

extracelular de *Aureobasidium pullulans* HN2.3 utilizando a técnica do SDS-Page, por meio da qual foi determinada a massa molecular da lipase de 60,5 KDa.

Esses dados corroboram com o presente estudo, no qual o perfil proteico das lipases de bagaço, casca, frit e polpa de laranja analisados apresentaram massas moleculares similares à outras estudadas.

No estudo da regioespecificidade das lipases observou-se que a lipase de bagaço, casca e frit correspondem às lipases 1,3 específicas (Figura 10), devido à comparação com os produtos de reação descritos por Meghwanshi et al. (2006) e com o padrão de lipase comercial de *Rhizomucor miehei* (Figura 11). Verificou-se a presença de monoleína, dioleína, ácido oleico e glicerol como produtos da degradação da trioleína por atuação destas enzimas, produtos estes que são típicos de lipases 1,3 específicas.

Em relação às lipases de polpa observou-se majoritariamente a presença de ácido oleico, levando-se em consideração a diferença em relação ao controle e os dados da literatura que apontam dioleína como principal produto decorrente da atuação de lipase 2 específica, concluiu-se tratar-se de uma lipase não específica.

É importante ressaltar que os extratos enzimáticos empregados nas reações não são purificados, dessa forma, há a possibilidade de isoformas de lipase na mesma amostra.

A)

B)

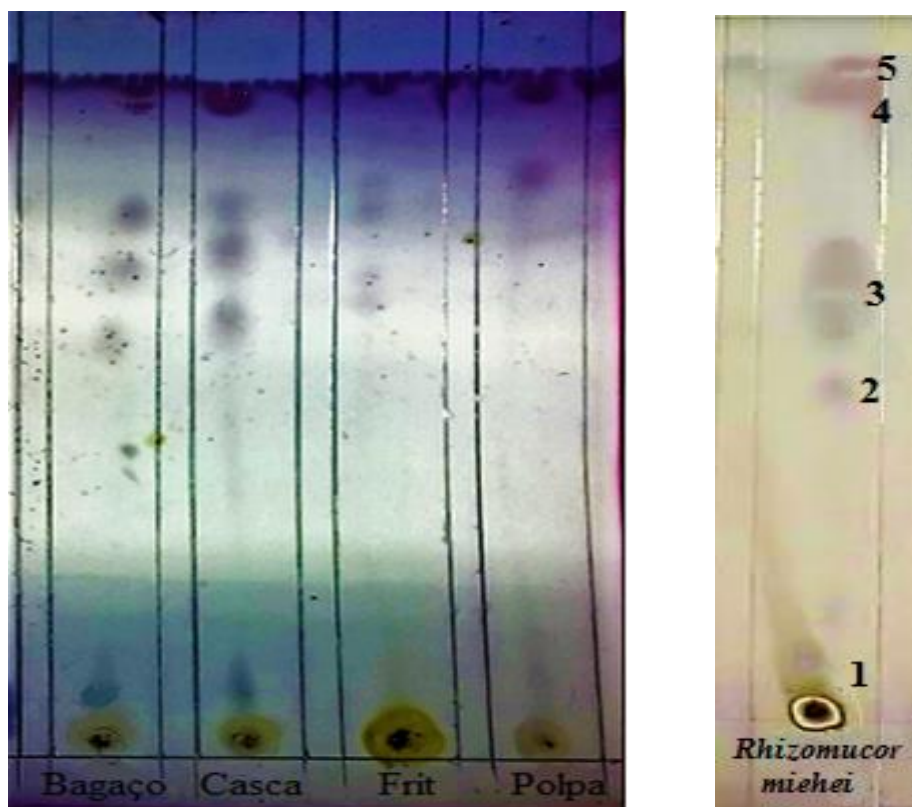


Figura 10 . Determinação da regioespecificidade por CCD de lipases, sendo A: Lipases de resíduos de laranja: bagaço, casca, frit e polpa, pela análise dos produtos de degradação da trioleína, e B: Padrões para a regioespecificidade, onde 1 = monoleína; 2 = dioleína; 3 = ácido oleico; 4 = trioleína e 5 = glicerol, referentes aos produtos de degradação da trioleína pela lipase 1,3 específica de *Rhizomucor miehei*.

5.3. Aplicações das lipases de resíduos de laranja em reações de hidrólise e síntese

As lipases vegetais hidrolisaram diferentes óleos com destaque para as lipases do bagaço na hidrólise dos óleos de dendê, girassol, mamona e oliva; para as lipases frit em óleo de dendê e oliva; e para as lipases da polpa nos óleos dendê, girassol, mamona, milho, oliva e uva (Tabela 3).

Essas diferenças de atuação enzimática estão provavelmente relacionadas às diferentes composições dos triglicerídeos (TG) presentes nos diferentes óleos, pois as enzimas em questão podem ser específicas quanto ao tamanho da cadeia de ácidos graxos (AG) que compõe os TG, bem como às posições dos AG nos TG. As combinações citadas (lipases+substrato) apresentaram porcentagem de hidrólise acima de 10% (Tabela 3), sendo resultados superiores do que os obtidos por Khelassi et al. (2012) que registraram valores de conversão abaixo de 10% utilizando lipases oriundas de *Candida cylindrica*, *Candida rugosa* e *Pseudomonas cepacia*.

Tabela 3. Hidrólise de óleos vegetais (%) catalisada por lipases obtidas de resíduos de laranja Pera e concentradas com sulfato de amônio 80% de saturação.

Óleo Vegetal (Substrato)	Lipase de Bagaço	Lipase de Casca	Lipase de Frit	Lipase de Polpa	Lipase comercial
Babaçu	7,38eAB	6,99cB	7,70eAB	8,18gA	35,11
Dendê	13,45bA	9,69aC	11,61bB	9,46fC	48,70
Girassol	10,72cB	8,34bC	8,02deC	11,59dA	54,45
Mamona	15,78aB	7,86bcD	8,92cdD	20,77aA	56,45
Milho	9,11dB	7,09cC	7,9eC	16,32bA	52,11
Oliva	11,35cB	7,69bcD	13,16aA	10,51eC	55,17
Palmiste	7,70eB	5,70dC	9,73cA	8,02gB	36,92
Soja	8,73dA	2,20eC	5,49fB	8,89fgA	48,03
Uva	7,29eC	8,40bB	6,29 fD	12,60cA	52,76

Médias comparadas pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), análise fatorial onde as letras maiúsculas comparam as linhas e minúsculas as colunas.

As lipases também foram empregadas em reações de síntese de ésteres utilizando como substratos ácido oleico e etanol. Todas as lipases promoveram a esterificação dos substratos, cujo maior valor absoluto foi obtido com a lipase do bagaço (17,82%), que foi estatisticamente igual às porcentagens de esterificação proporcionadas pelas lipases da casca e do frit (Tabela 4).

Fleuri et al. (2014) alcançaram na esterificação de ácido oleico e etanol taxas de 51 e 40,2% de conversão por meio das lipases LWB e LSB, respectivamente, obtidas por FES de *Aspergillus* sp. Apesar de ter sido utilizado meio reacional semelhante, o tempo de reação do presente estudo foi inferior ao utilizado por Fleuri et al. (2014). Além disso, essas diferenças podem ser em detrimento das unidades de atividades enzimáticas, estabilidades das lipases em solventes orgânicos e equilíbrio da reação (Fleuri, 2016).

Tabela 4. Esterificação do ácido oleico e etanol (%) catalisada por lipases obtidas de resíduos de laranja Pera e concentradas com sulfato de amônio 80% de saturação.

Substratos Reacionais	Lipase de Bagaço	Lipase de Casca	Lipase de Frit	Lipase de Polpa	Lipase Comercial
Ácido Oleico e Etanol	17,82a	16,81a	15,80a	11,09b	46,4

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si para o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

5.4 Análises das atividades biológicas dos produtos das reações das lipases

5.4.1 Avaliação da atividade antioxidante

Os produtos resultantes das reações de hidrólise mais promissores (que apresentaram hidrólise acima de 10%) foram selecionados para a análise quanto ao potencial antioxidante utilizando o método de redução do radical DPPH. Os produtos de reação que apresentaram atividade antioxidante foram os obtidos pela atuação da lipase do bagaço nos óleos de dende, girassol e mamona; pela atuação da lipase da casca no óleo de dende; da lipase do frit sobre o óleo de oliva e da lipase de polpa sobre os óleos de girassol, oliva e milho, sendo esta última combinação mais promissora (resultando em aproximadamente 95% de redução do DPPH) (Tabela 5).

Os produtos da lipase comercial da empresa Sigma Aldrich também foram testados e apesar de apresentar alta atividade de hidrólise frente às lipases vegetais *homemade*, seus produtos de reação não demonstraram atividade antioxidante.

Testes com os antioxidantes padrões BHA (butilhidroxianisol), α -tocopherol e trolox oriundos da empresa Sigma Aldrich, demonstraram atividade de 86,2; 85,2 e 14,3% de redução do DPPH, respectivamente (Gülçin, 2006). Em outro estudo, o efeito sobre o radical DPPH dos padrões BHA, α -tocoferol, BHT (butilhidroxianisol) e trolox foram de 67,8; 64,9; 62,5 e 29,4% respectivamente, enquanto o extrato de curcuma apresentou redução do radical em 62,2% (Ak & Gülçin, 2008).

Tabela 5. Atividade antioxidante (% de redução de DPPH) dos produtos de hidrólise catalisada por lipases obtidas de resíduos de laranja Pera e concentradas com sulfato de amônio 80% de saturação.

Óleo Vegetal (Substrato)	Lipase de Bagaço	Lipase de Casca	Lipase de Frit	Lipase de Polpa	Lipase Comercial
--------------------------	------------------	-----------------	----------------	-----------------	------------------

Dendê	73,18bA	75,56aA	0	0	0
Girassol	48,08cA	0	0	9,8cB	0
Mamona	82,31aA	0	0	0	0
Milho	0	0	0	94,87aA	0
Oliva	70,92bA	0	69,50bB	58,15bB	0
Uva	0	0	0	0	0

Médias comparadas pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), análise fatorial onde as letras maiúsculas comparam as linhas e minúsculas as colunas.

Os produtos das reações de síntese também foram analisados quanto à atividade antioxidante, sendo que somente os resultantes da atuação da lipase do bagaço na esterificação do ácido oleico com etanol demonstraram atividade antioxidante apresentando 41,28% de redução do radical DPPH. As outras lipases testadas, incluso a comercial, formaram produtos sem este potencial biológico. Isso mostra que altas taxas de conversão como os obtidos pelas lipases comerciais, não estão necessariamente relacionadas ao aumento da atividade antioxidante, e que determinadas substâncias mesmo em pequenas concentrações são capazes de promover esta atividade.

5.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Na avaliação quanto à atividade antimicrobiana (Tabela 6 e Figura12 – exemplo), os compostos que apresentaram atividade foram os hidrolisados de óleo de girassol e oliva com lipase de bagaço sobre *E. coli* e *P. aureginosa*; hidrolisados de óleo de milho com lipase de polpa sobre *E. coli* e *P. aureginosa*; hidrolisados de óleo de oliva com lipase de frit e polpa sobre *E. coli*, *L. monocytogenes* e *P. aureginosa*; hidrolisados de óleo de girassol com lipase de polpa sobre *L.monocytogenes*, *P. aureginosa*, *S. enteritidis* e *S. aureus*. A atividade foi observada de forma qualitativa pela presença de halos claros que indicam inibição do crescimento bacteriano.

Tabela 6. Atividade antibacteriana dos produtos das reações de hidrólise catalisadas por lipases obtidas diretamente dos resíduos de laranja Pera e concentradas com sulfato de amônio 80% de saturação.

Óleo + Lipase	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aureginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>
	abrangência dos halos (mm)				
Girassol/Bagaço	12	0	10	*	*
Girassol /Polpa	*	14,5	11	15,5	16,5
Milho/Polpa	10	*	10	*	*
Oliva/Bagaço	13	*	12,5	*	*

Oliva/Frit	15,5	18,5	13	*	*
Oliva/Polpa	15,5	10	14,5	*	*

* corresponde a não formação de halo.

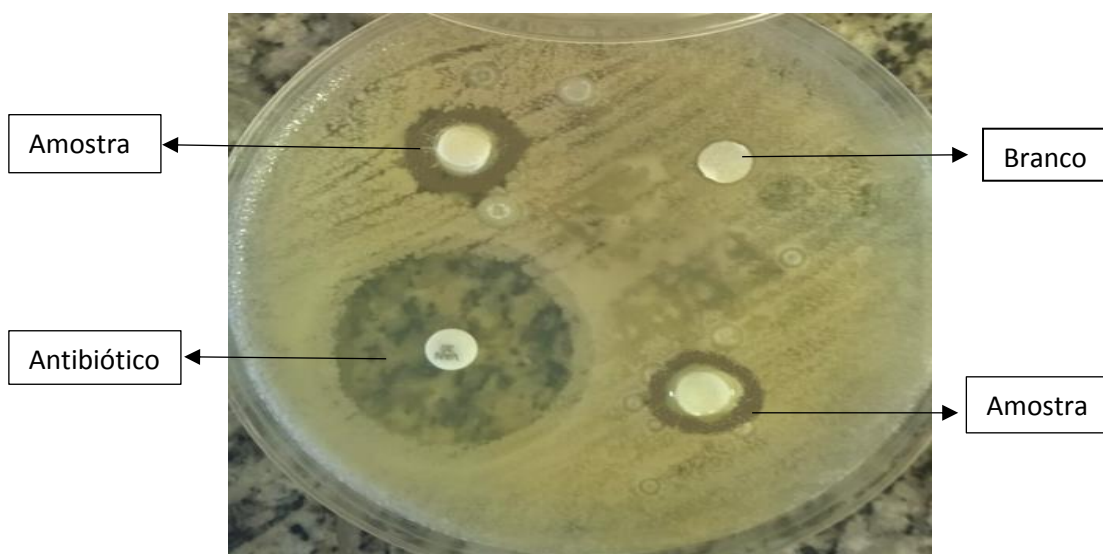


Figura 11. Exemplo de placa com inibição do crescimento bacteriano representado pela formação de halos. A imagem se trata da inibição de *L. monocytogenes* pelos produtos de reação da lipase de polpa na hidrólise de óleo de girassol.

Outros estudos avaliaram a atividade antibacteriana de compostos vegetais como óleo de orégano e óleo de cenoura, para as estirpes *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus plantarum*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* sp., e *Rhodotorula* sp., sendo que a inibição variou de completa com óleo de orégano (zona ≥ 70 a 80 mm) a nenhuma inibição com óleo de cenoura (Elgayyar et al., 2001).

Kabara et al. (1972) analisaram os efeitos antimicrobianos de ácidos graxos láurico, cáprico e oleico sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas a saber: *S. aureus* (gram +), *S. epidermidis* (gram +), *Streptococcus* (gram +), *Corynebacterium* sp. (gram +), *Nocardia asteroides* (gram -), *P. aureginosa* (gram -) e *E. coli* (gram -). Os pesquisadores observaram capacidade de inibição destes compostos sobre as cepas testadas, com destaque para o ácido láurico que apresentou a maior atividade sobre as bactérias gram positivas.

Os produtos obtidos nas reações de esterificação apresentaram discreta formação de halos, porém halos com diâmetros maiores foram observados na avaliação de seus brancos. Tendo em vista que o meio reacional desta análise é composto por ácido oleico

e etanol (sem enzima) o potencial antimicrobiano destas amostras pode estar atribuído ao etanol, como já é conhecido.

Nenhum produto testado apresentou atividade antifúngica.

5.4.3 Avaliação da citotoxicidade - viabilidade celular

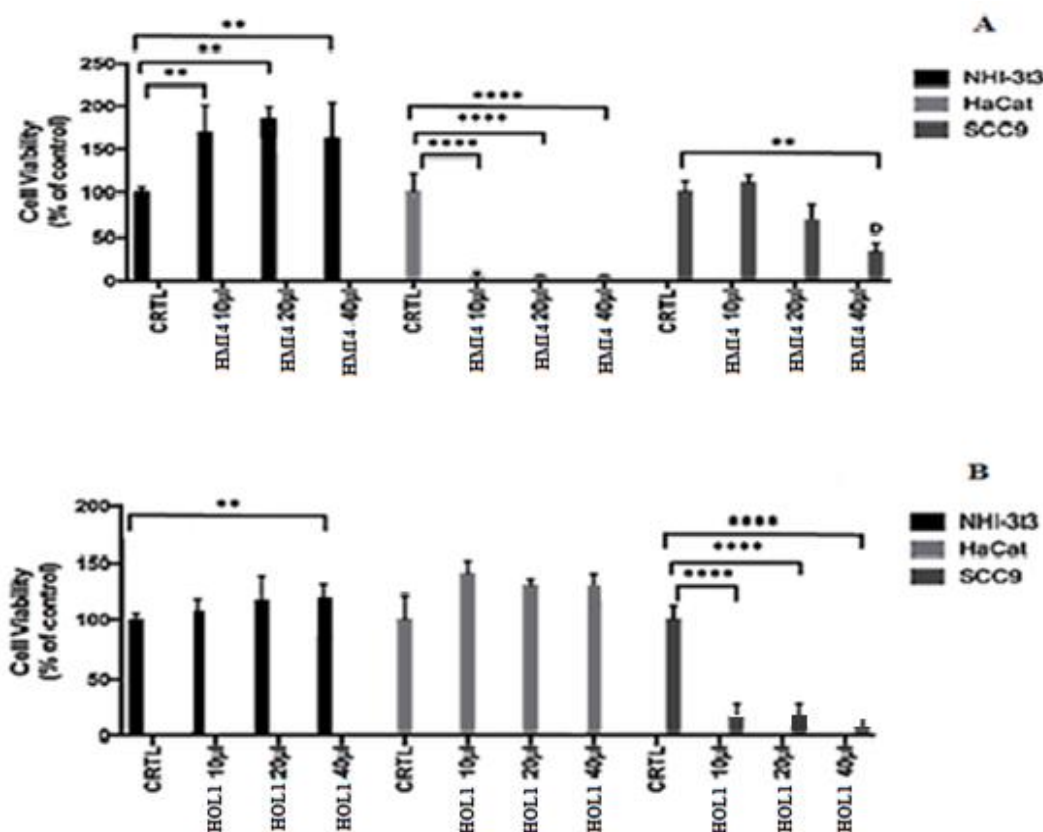
Os produtos da hidrólise do óleo de milho pela lipase de polpa diminuíram significativamente a viabilidade dos queratinócitos HaCat em relação ao controle em todas as concentrações (Figura 12 A). Para as células cancerígenas (SCC9) na concentração de 40 μ L do produto de reação houve diminuição em relação ao controle e às outras concentrações testadas (Figura 12 A). Para os fibroblastos observou-se aumento do metabolismo celular em todas as concentrações testadas em relação ao controle (Figura 12A). O branco desta reação (Figura 14 A) não promoveu interferência sobre a viabilidade das células.

As Figuras 12 B, C e D referem-se aos produtos de hidrólise do óleo de oliva com as lipases de bagaço, frit e polpa, respectivamente, nas quais notam-se diminuição da viabilidade celular das células tumorais SCC9 para todos os compostos. Para os produtos da hidrólise pelas lipases de frit e de polpa (Figura 12 C e D) essa diminuição foi notada apenas nas concentrações de 40 μ L e para os produtos da hidrólise pela lipase de bagaço esse perfil foi notado em todas as concentrações (Figura 12 B). Observou-se também aumento do metabolismo celular de NHI-3T3 quando se utilizou os produtos de hidrólise do óleo de oliva com a lipase de bagaço nas concentrações de 20 e 40 μ L e sobre HaCat em todas as concentrações testadas (Figura 12 B). Analisando seu branco de reação (Figura 14 B) também foi observado diminuição da viabilidade celular das células SCC9 em todas as concentrações testadas e não houve interferência sobre NHI-3T3 e HaCat (Figura 14 B). Apesar da inibição de SCC9 ter sido observada também no branco de reação (Figura 14 B) a diminuição da viabilidade do produto da hidrólise pela lipase do bagaço foi estatisticamente mais efetiva, sugerindo efeito sinérgico entre os produtos de reação e compostos presentes na amostra.

A diminuição de viabilidade de SCC9 observada tanto na presença dos produtos de hidrólise do óleo de milho quanto para os produtos de hidrólise do óleo de oliva (Figuras 12 A e B, respectivamente) demonstram um potencial promissor de aplicação destes produtos por tratar-se da inibição de uma célula cancerígena. Compostos que

exercem tal propriedade é intensamente requerido para aplicação clínica, com o intuito de combater células tumorais. O aumento do metabolismo celular dos fibroblastos (NHI-3T3) e queratinócitos (HaCat) diante de diferentes compostos também é interessante quanto ao potencial de aplicação, por exemplo, em regeneração de tecido conjuntivo e da epiderme (Bueno et al., 2014; Oliveira, 2014)

Avaliando-se a diminuição da viabilidade sobre as células sadias de queratinócito HaCat (que foram observadas na presença dos produtos da hidrólise de milho com lipase de polpa – Figura 12 A), pondera-se que esse efeito é igualmente observado em quimioterápicos utilizados clinicamente, que além de serem tóxicos para as células cancerígenas, também exercem toxicidade sobre as demais células do organismo tratado.



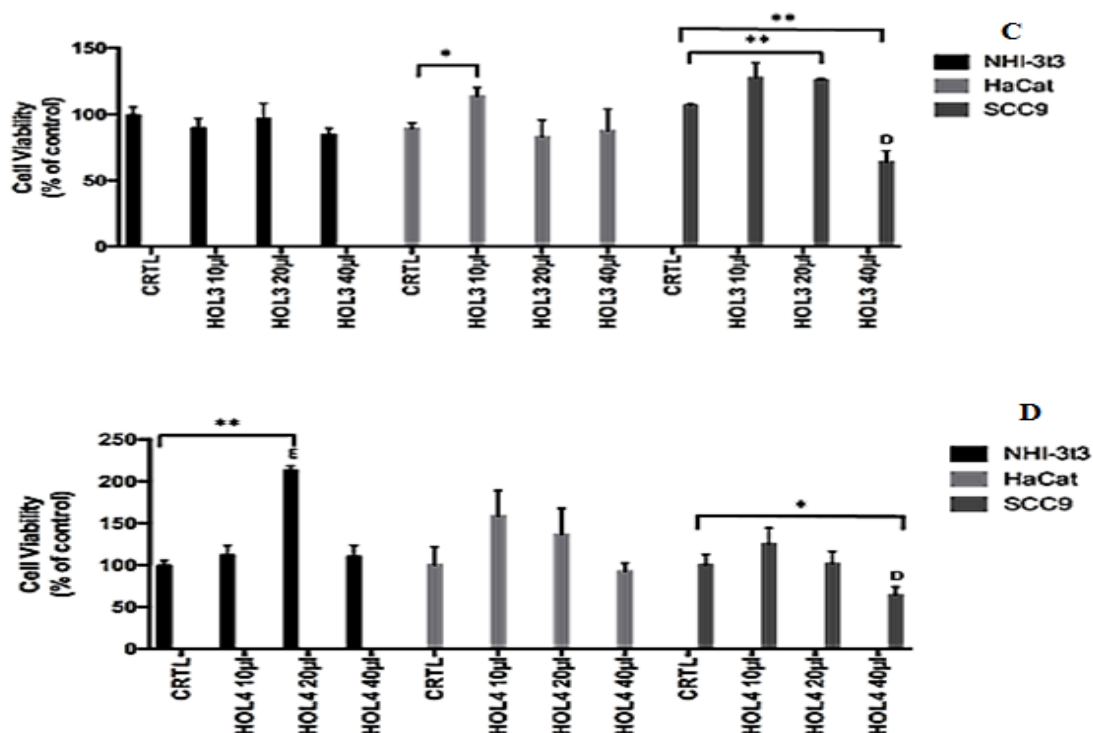
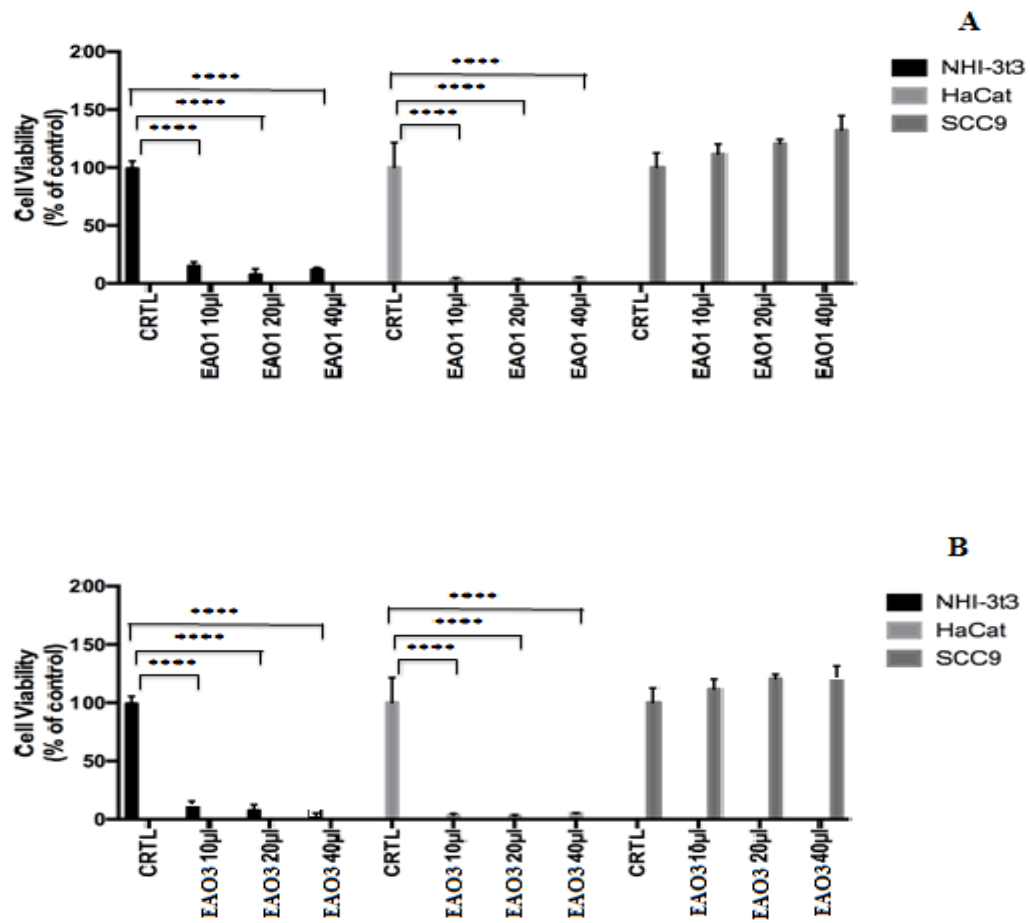


Figura 12. Viabilidade das células NHI-3t3, HaCat e SCC9 em teste com A) produtos da hidrólise do óleo de milho obtidos pela atuação da lipase de polpa; B) produtos da hidrólise do óleo de oliva obtidos pela atuação da lipase de bagaço; C) produtos da hidrólise do óleo de oliva obtidos pela atuação da lipase de frit; D) produtos da hidrólise do óleo de oliva obtidos pela atuação da lipase de polpa (* $\neq$ controle, sendo: * < ** < *** < **** e ^D = 40 μ L $\neq$ 10 μ L e 20 μ L).

Os produtos decorrentes das reações de esterificação entre o etanol e o ácido oleico pela lipase de bagaço, frit e polpa (Figura 13 A, B e C) foram tóxicos em todas as concentrações testadas para NIH-3t3 e HaCaT, porém não apresentaram toxicidade para as células SCC9, que por serem células cancerígenas, possuem mecanismos biológicos diferenciados. Esses produtos apresentaram comportamento muito semelhante ao seu branco de reação que foi composto de etanol e ácido oleico sem extrato enzimático, no qual a reação de esterificação não ocorreu (Figura 14 C).

O branco de reação do ácido oleico com etanol foi tóxico em todas as concentrações testadas para NHI-3T3 e HaCat e não interferiu na viabilidade de SCC9 (Figura 14 C).



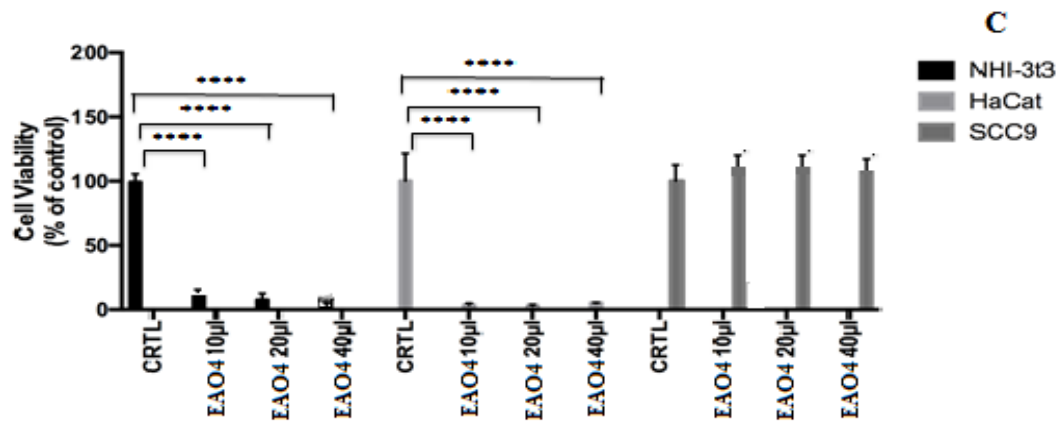
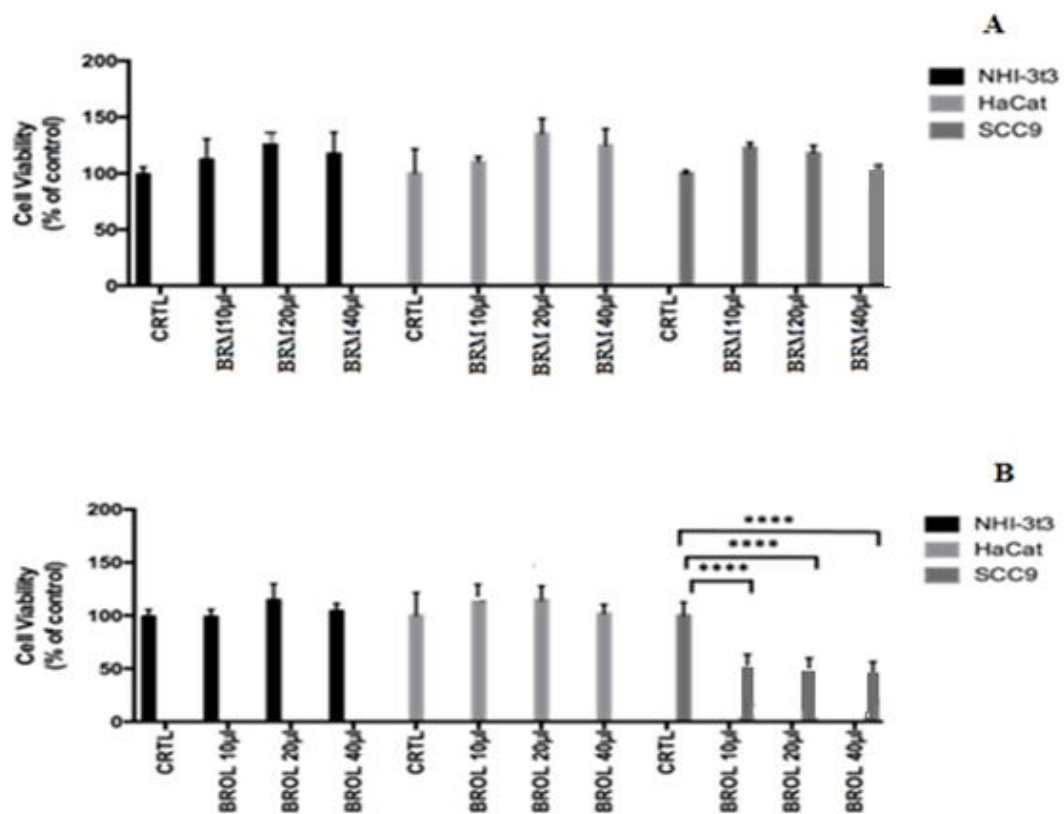


Figura 13. Viabilidade das células NHI-3t3, HaCat e SCC9 em teste com A) produtos da esterificação do etanol com ácido oleico pela atuação da lipase de bagaço e; B) produtos da esterificação do etanol com ácido oleico pela atuação da lipase de frit; C) produtos da esterificação do etanol com ácido oleico pela atuação da lipase de polpa (* $\neq$ controle, sendo: * < ** < *** < ****).



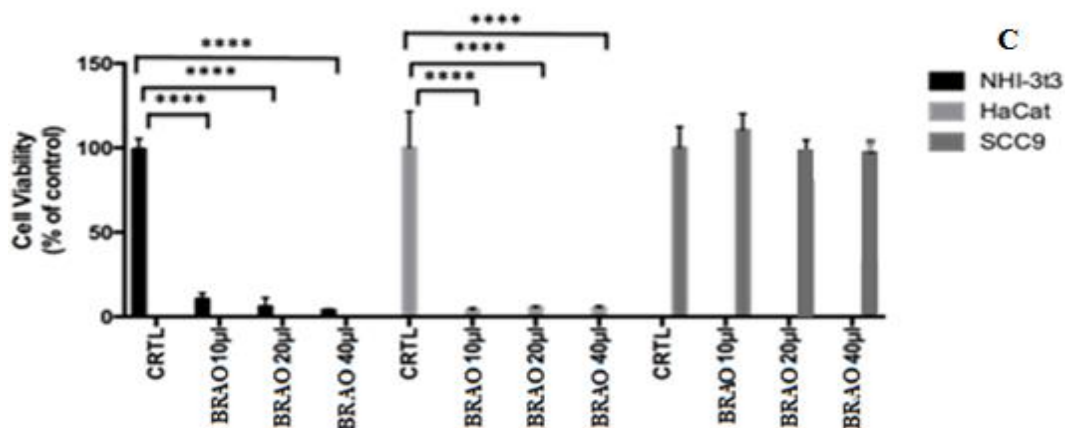


Figura 14. Viabilidade das células NHI-3t3, HaCat e SCC9 em teste com A) branco da hidrólise do óleo de milho sem atuação de lipase; B) branco da hidrólise do óleo de oliva sem atuação de lipase C) branco da esterificação do ácido oleico com etanol sem atuação de lipase (* $\neq$ controle, sendo: * < ** < *** < ****).

5.5 Análise do perfil dos ácidos graxos obtidos das reações de hidrólise e esterificação por lipases de resíduos de laranja

Nas análises cromatográficas executadas para traçar o perfil dos ácidos graxos remanescentes das reações (liberados pela atuação lipásica), avaliou-se a porcentagem relativa desses compostos nas amostras. Deste modo, foi possível correlacionar as substâncias com as atividades biológicas observadas.

Os produtos de reação que apresentaram atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica, foram: hidrolisado do óleo de oliva com lipase de bagaço, frit e polpa; hidrolisado do óleo de milho com lipase de polpa; hidrolisado do óleo de girassol com lipase de bagaço e polpa; hidrolisado do óleo de mamona com lipase de bagaço e hidrolisado do óleo de dende com lipase de bagaço e casca. Estes compostos possuem majoritariamente em sua composição os ácidos linoleico, oleico e palmítico, respectivamente, em ordem decrescente; excetos o hidrolisado do óleo de mamoma que apresentou altas taxas de ácido caproíco e o hidrolisado do óleo de dende, que além do ácido oleico, apresentou também altas taxas de ácido elaídico.

Os perfis dos ácidos graxos decorrentes das reações dos óleos de oliva milho, girassol, mamona, dendê e do ácido oleico com etanol com as lipases de resíduos de laranja oriundas de bagaço, casca, frit e polpa, estão apresentados nas tabelas a seguir.

Tabela 7. Perfil de ácidos graxos em % relativa referente aos produtos de hidrólise do óleo de oliva utilizando lipases de: 1= bagaço; 3 = frit; 4 = polpa.

Produtos da hidrólise do óleo de oliva				
Ácidos Graxos		% relativa de ácidos graxos		
		1	3	4
C12:0	Láurico	0,74	0,14	1,52
C14:1	Miristoleico	tr	tr	tr
C14:0	Mirístico	0,08	0,07	tr
C16:1	Palmitoleico	0,10	0,06	tr
C16:0	Palmitico	9,67	9,79	10,16
C17:1	Heptadecanóico (cis-10)	0,08	0,07	tr
C17:0	Margárico	0,09	0,09	tr
C18:2n6c	Linoléico	49,71	51,82	42,98
C18:1n9c	Oléico	27,23	27,85	23,19
C18:1n9t	Elaídico	1,51	1,49	1,26
C18:0	Esteárico	4,34	4,11	6,68
C20:3n3	Eicosatrienóico (cis-11,14,17)	0,60	0,35	0,38
C20:0	Araquídico	0,39	0,39	0,34
C22:0	Behênico	0,51	0,44	0,45
C24:0	Lignoceróico	0,19	0,18	0,18
Total Identificado		95,24	96,85	87,14
Substâncias não identificadas		4,76	3,15	12,86

tr = traço do ácido graxo (tr ≤ 0,05)

Os produtos da hidrólise do óleo de oliva que se destacaram quanto à atividade antioxidante foram os oriundos das lipases de bagaço e lipase de frit (Tabela 5); quanto à atividade antimicrobiana os destaques foram para os produtos de hidrólise das enzimas de frit e polpa (Tabela 6) e para diminuição da viabilidade celular destacaram-se os produtos da hidrólise do bagaço (Figura 12 A).

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos em % relativa referente aos produtos de hidrólise do óleo de milho utilizando lipase de polpa.

Produtos da hidrólise do óleo de milho		
	Ácidos Graxos	% relativa de ácidos graxos
C12:0	Láurico	tr
C16:0	Palmítico	11,18
C18:2n6c	Linoléico	41,65
C18:1n9c	Oléico	29,22
C18:1n9t	Elaídico	0,75
C18:0	Esteárico	2,11
	Eicosatrienóico (cis-	tr
C20:3n3	11,14,17)	
C20:0	Araquídico	0,39
Total Identificado		85,3
Substâncias não identificadas		14,7

tr = traço do ácido graxo ($tr \leq 0,30$)

Os produtos da hidrólise do óleo de milho que mais se destacaram quanto à atividade antioxidante foram os oriundos da ação da lipase de bagaço (Tabela 5); sendo que quanto à atividade antimicrobiana (Tabela 6) e diminuição da viabilidade celular (Figura 12 A), os produtos mais promissores foram os obtidos pela lipase de polpa. Esses compostos apresentaram majoritariamente em sua composição os ácidos linoleico, oleico e palmítico.

Tabela 9. Perfil de ácidos graxos em % relativa referente aos produtos de hidrólise do óleo de girassol utilizando lipases de: 1= bagaço e 4 = polpa.

Produtos da hidrólise do óleo de girassol			
Ácidos Graxos		% relativa de ácidos graxos	
		1	4
C12:0	Láurico	tr	1,01
C14:1	Miristoleico	tr	tr
C14:0	Mirístico	0,19	0,10
C16:1	Palmitoleico	0,08	tr
C16:0	Palmítico	6,00	7,04
C17:1	Heptadecanóico (cis-10)	tr	tr
C17:0	Margárico	tr	tr
C18:2n6c	Linoléico	50,57	47,15
C18:1n9c	Oléico	34,42	32,13
C18:1n9t	Elaídico	1,31	1,44
C18:0	Esteárico	3,73	4,34
C20:3n3	Eicosatrienóico (cis-11,14,17)	0,30	0,33
C20:0	Araquídico	0,30	0,29
C22:0	Behênico	0,67	0,59
C24:0	Lignoceróico	0,26	0,23
Total Identificado		97,83	94,65
Substâncias não identificadas		2,17	5,35

tr = traço do ácido graxo (tr ≤ 0,07)

Os produtos da hidrólise do óleo de girassol que mais se destacaram quanto à atividade antioxidante foram os oriundos da lipase de bagaço (Figura 5); já quanto à atividade antimicrobiana, os oriundos da lipase de polpa (Figura 6). Não foi observada atividade desses produtos quanto à viabilidade celular. Para esses compostos observou-se majoritariamente a presença dos ácidos linoleico, oleico e palmítico.

Tabela 10. Perfil de ácidos graxos em % relativa referente aos produtos de hidrólise do óleo de mamona utilizando lipase de bagaço.

Produtos da hidrólise de óleo de mamoma		
	Ácidos Graxos	% relativa de ácidos graxos
C6:0	Caproico	66,38
C8:0	Caprilico	4,21
C10:0	Cáprico	0,23
C16:0	Palmítico	1,26
C18:1n9c	Oléico	4,08
C18:1n9t	Elaídico	3,14
Total Identificado		79,3
Substâncias não identificadas		20,7

Os produtos de hidrólise do óleo de mamoma que se destacaram quanto à atividade antioxidante foram os obtidos pela lipase de bagaço (Tabela 5); no entanto este e os demais produtos da hidrólise do óleo de mamona não apresentaram potencial quanto às atividades antimicrobianas e diminuição da viabilidade celular. Para estes compostos observou-se majoritariamente o ácido caproico.

Tabela 11. Perfil de ácidos graxos em % relativa referente aos produtos de hidrólise do óleo de dendê utilizando lipases de: 1 = bagaço e 2 = casca

Produtos da hidrólise do óleo de dendê		% relativa de ácidos graxos	
Ácidos Graxos		1	2
C12:0	Láurico	0,28	tr
C14:0	Mirístico	3,02	tr
C16:1	Palmitoleico	4,45	tr
C16:0	Palmítico	6,83	6,73
C17:0	Margárico	0,13	tr
C18:1n9c	Oléico	tr	52,51
C18:1n9t	Elaídico	tr	34,46
C18:0	Esteárico	74,52	3,92
C20:3n3	Eicosatrienóico (cis-11,14,17)	tr	tr
C22:1n9	Éster metílico de ácido erucico	tr	tr
Total Identificado		89,23	97,62
Substâncias não identificadas		10,77	2,38

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

Os produtos de hidrólise do óleo de dendê de destaque quanto à atividade antioxidante foram os decorrentes da lipase de casca (Figura 5). Não foi observado potencial antimicrobiano e interferência sobre viabilidade celular desses produtos reacionais, cujo composto majoritário foi o ácido oleico.

Tabela 12. Perfil dos ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos em % relativa referentes aos produtos de esterificação do ácido oleico e etanol utilizando lipases de: 1 = bagaço; 2 = casca; 3 = frit e 4 = polpa.

Produtos da esterificação do ácido oleico com etanol					
Ácidos graxos		% relativa de ácidos graxos			
		1	2	3	4
C10:0	Cáprico	2,85	2,36	2,66	2,19
C16:0	Palmitico	6,26	5,00	5,56	5,77
C16:0	Palmitato de etila	tr	0,29	0,17	0,12
C18:1n9c	Oléico	55,30	69,21	74,45	54,69
C18:1	Oleato de etila	14,70	8,92	5,45	15,83
Total Identificado		79,11	85,78	88,29	78,60
Substâncias não identificadas		20,89	14,22	11,71	21,40

tr = traço do ácido graxo ($tr \leq 0,07$)

Os produtos da esterificação do ácido oleico com etanol não demonstraram potencial quanto às atividades biológicas testadas.

Lee et al. (1991) estudaram a composição de ácidos graxos de frutas, endocarpo e sementes de uma planta chinesa denominada Omija (*Schizandra chinensis Baillon*) e suas atividades antioxidantes foram determinadas pelo método DPPH. A composição de ácidos graxos observada foi majoritariamente ácidos linoleico, oleico e palmítico nas três frações avaliadas, sendo que para o endocarpo e sementes observou-se atividade antioxidante mais significativa do radical DPPH. Comportamento semelhante foi observado em nosso estudo onde os produtos das hidrólises do óleo de milho com lipase de polpa; óleo de oliva com lipases de bagaço, frit e polpa e óleo de girassol com lipase de bagaço, apresentaram atividades antioxidantes sobre DPPH e os mesmos compostos majoritários do estudo citado.

Öztürk et al. (2011) testaram os efeitos antioxidantes e efeitos antimicrobianos de espécies de cogumelo *Agaricus essettei*, *Agaricus bitorquis* e *Agaricus bisporus* sobre bactérias de gram-positivas e negativas tais como, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 e ATCC 12598, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 e *P. vulgaris* RSKK 96026; além de avaliarem sua composição de ácidos graxos. Para todas as cepas foi observada formação de halos que indicam inibição do crescimento bacteriano e foram observadas atividades antioxidantes avaliadas pelos métodos DPPH e ABTS. Na avaliação dos ácidos graxos verificou-se majoritariamente os ácidos linoleico, palmítico e oleico. No presente estudo observou-se também atividades antimicrobianas dos produtos de hidrólise do óleo de girassol com lipases de bagaço e polpa; óleo de oliva com lipases de bagaço, frit e polpa e óleo de milho com lipase de polpa, nos quais foram detectados como compostos majoritários os ácidos linoleico, oleico e palmítico.

As propriedades antibacterianas de ácidos graxos ainda são mal compreendidas, porém, uma hipótese seria sua atuação sobre membrana celular da bactéria podendo estar relacionada à inibição de crescimento ou mesmo morte do micro-organismo. Estudos relatam os efeitos antibacterianos de amplo espectro de ácidos graxos de várias fontes biológicas, incluindo algas, animais e plantas que são bastante interessantes. Uma vantagem da utilização de ácidos graxos em relação aos antibióticos convencionais seria à não resistência antimicrobiana (Narasimhan et al., 2006).

Estudos como os de Jiang et al. (1998) relacionam os efeitos de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa como ácido linoleico as atividades antitumorais por mecanismos ainda não elucidados e ressaltam que esta abordagem pode apontar para uma nova direção no tratamento de câncer. Outros pesquisadores (Durgam & Fernandes, 1997) avaliaram os efeitos *in vitro* de concentrações de ácido linoleico conjugado em células cancerígenas de humanos (M21-HPB - melanoma, HT-29 - colorretais, MCF-7- mama). A incubação dessas células cancerígenas e ácido linoleico conjugado apresentaram reduções significativas na proliferação dessas células em relação ao controle e sugerem que o ácido linoleico conjugado pode ser citotóxico para células tumorais humanas também *in vivo*. De forma semelhante aos estudos citados, os produtos de reação da hidrólise do óleo de milho com lipase de polpa e do óleo de oliva com lipases de bagaço, frit e polpa apresentados neste estudo, demonstraram potencial quanto à diminuição da viabilidade celular de células cancerígenas e apresentaram como compostos majoritários ácido linoleico, ácido oleico e ácido palmítico.

Os estudos citados mostram um perfil de ácidos graxos muito parecido com as amostras avaliadas em nosso estudo onde potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico também foram observadas. Dessa forma é possível correlacionar essas atividades à presença desses compostos, sendo que o mecanismo pode ser isolado ou sinérgico com outros compostos das amostras.

6. Conclusão

Do ponto de vista biotecnológico, os subprodutos do processamento de suco de laranja Pera, podem ser uma alternativa às lipases comerciais apresentando como vantagens, além do baixo custo e fácil obtenção, o acesso a produtos diferenciados.

Poucos estudos relatam atividades biológicas decorrentes de produtos de reações, sendo que a aplicação de lipases provenientes de resíduos nunca foi relatada anteriormente para esta finalidade, sendo uma estratégia inovadora.

Considerando o acesso da enzima e dos substratos utilizados, tem-se uma excelente alternativa para obtenção de ácidos graxos e outros compostos liberados durante as reações, que embora, ainda não tenham seu mecanismo de ação desvendado, demonstraram potencial para a exploração de suas atividades biológicas como antioxidantes, antitumorais e antibióticos.

7. Sugestões para trabalhos futuro

Para a continuidade do trabalho sugere-se a aplicação das lipases dos resíduos de laranja para obtenção de lipídeos modificados por reações de interesterificação, com posterior aplicação *in vitro* e *in vivo* dos produtos de reação, investigando a presença de atividades biológicas, toxicidade e concentração efetiva e correlação com as estruturas químicas.

Refêrencias bibliográficas

- ABDELMOEZ, WAEL; MOSTAFA, N. A.; MUSTAFA, Ahmad. Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. *Journal of Cleaner Production*, v. 59, p. 290-297, 2013
- AK, T.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological Interactions*, v.174, n.1, p.27-37, 2008.
- ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, p.364-368, 2007.
- ANTUNES, D.; VIANA, V.; SANTOS, M.; SOARES, E.; BARBOSA, K.; MOURA, K.; ALMEIDA, R. Produção de bioetanol de segunda geração a partir do hidrolisado do albedo da laranja como fonte de biomassa lignocelulósica. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v.1, n.2, 305-312, 2015.
- ARPAIA N, CAMPBELL C, FAN X, DIKIY S, VAN DER VEEKEN J, DEROOS P, LIU H, CROSS JR, PFEFFER K, COFFER PJ, RUDENSKY AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature Immunology* v 504, 451–455, 2013.
- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.
- BARROS M.; FLEURI L.F.; MACEDO G.A. Seed Lipases: Sources, Applications and Properties - A Review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.27, 15-29, 2010.
- BRACKETT GM, LEWIS JB, KIOUS AR, MESSER RLW, LOCKWOOD PE, BRACKETT WW, WATAHA JC. Cytotoxicity of endodontic sealers after one year of aging in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v, 100B, p. 1729-1735, 2012.
- BUENO, FERNANDA GIACOMINI. Poincianella pluviosa: estudo da viabilidade celular e proliferação de fibroblastos e queratinócitos in vitro, e avaliação da atividade cicatrizante em ratos diabéticos e normoglicêmicos. Diss. *Universidade Estadual de Maringá*, 2014.
- CALADO C. R. C.; MONTEIRO S. M. S.; CABRAL J. M. S.; FONSECA L. P. Effect of prefermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.93, p.354-359, 2002.

- CARDOSO, J.; SILVA, K.; GODOY, P.; SEOLATTO, A. Produção de etanol a partir do bagaço da laranja. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v.1, n.1, p. 657-661, 2014.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v.26, n.1, p.75-80, 2003.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A.; DOS SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.
- CASTRO, R.J.S.; SATO H.H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and alfa-amylase under solidstate fermentation using a simplex centroid mixture design. *Industrial Crops and Products*, v.49, p.813– 821, 2013.
- CHEN J., LINDMARK-MANSSON H., GORTON L., AKESSON B. Antioxidante capacity of bovine milk assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *Int Dairy Journal*, v.13, p.927-935, 2003.
- CONSELHO DA COMUNIDADE EUROPEIA (EU) (1991) Diretriz 91/156/CEE de 18 de março de 1991. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu>, acessado em setembro de 2015.
- DE GREYT, W.F.J.; KELLENS, M.J. Improvement of nutritional and physicochemical properties in milk fat, in Structural and modified lipids (Gunstone, F. D., Ed. Marcel Dekker), New York, p.285-312, 2001.
- DE SOUZA QUEIROZ, K.C.; ZAMBUZZI, W.F.; DE SOUZA, A.C.S.; DA SILVA, R.A.; MACHADO, D.; JUSTO, G.Z.; FERREIRA, C.V. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Letters*, v.258, n.1, p.126-134, 2007.
- DESBOIS, A.P.; SMITH, V.J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 85, p. 1629–1642, 2010.
- DEVASENA T. Enzymology. 1º edição, Oxford. YMCA Library Building, Jai singh Road, New Delhi, 2010.
- DHAKE, K.P.; THAKARE, D.D.; BHANAGE, B.M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, v.28, n.2, p.71-83, 2013.
- DILIKA, F.; BREMNER, P.D.; MEYER, J.J.M. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from Helichrysum pedunculatum: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia*, v.71, n.4, p.450-452, 2000.
- DURGAM, VIJAYENDER RAO; FERNANDES, GABRIEL. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer letters*, v. 116, n. 2, p. 121-130, 1997.

- EBRAHIMI, M. ET AL. Impact of different inclusion levels of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fronds on fatty acid profiles of goat muscles. ***Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition***, v. 96, n. 6, p. 962-969, 2012.
- ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F.A.; GOLDEN, D.A.; MOUNT, J.R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. ***Journal of Food Protection***, v.64, n.7, p.1019-1024, 2001.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/grao/9_edicao/grao_em_grao_materia_02.htm, acessado em janeiro de 2017
- FARFÁN, M.; VILLALÓN, M.J.; ORTÍZ, M.E.; NIETO, S.; BOUCHON, P. The effect of interesterification on the bioavailability of fatty acids in structured lipids. ***Food Chemistry***, v.139, p.571–577, 2013.
- FARQUHARSON C, MILNE J, LOVERIDGE N. Mitogenic action of insulin-like growth factor-I on human osteosarcoma MG-63 cells and rat osteoblasts maintained in situ: the role of glucose-6- phosphate dehydrogenase. ***Bone Miner***, v. 22, p. 105-115, 1993.
- FEDDERN, V.; DE SOUZA-SOARES, L.A.; XU, X. Chicken skin fat as raw-material for modifying lipids to high value diacylglycerol rich in pufa. In *III Symposium on Agricultural and Agroindustrial Waste Management*, 2013.
- FLEURI, L.F. Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas. 2016. Tese (Livre Docência). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- FLEURI, L.F.; NOVELLI, P.K.; DELGADO, C.O.; PIVETTA, M.R.; PEREIRA, M.S.; ARCURI, M.; CAPOVILLE, B.L. Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. ***International Journal of Food Science & Technology***, v.1, p.1-18, 2014.
- GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A.S. Omega-3 and 6 fatty acids balance in inflammatory response in patients with cancer and cachexia. ***Revista de Nutrição***, v.19, p.611-621, 2006.
- GOSWAMI, D.; BASU, J. K.; DE, S. Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review. ***Critical Reviews in Biotechnology***, v.33, n.1, p.81-96, 2013.
- GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). ***Toxicology***, v.217, n.2, p.213-220, 2006.
- GUTARRA, M.L.E.; GODOY, M.G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. ***Bioresource Technology***, v.100, p.5221-5249, 2009.

- HAMAM, F.; DAUN, J.; SHAHIDI, F. Lipase-assisted acidolysis of high-laurate canola oil with eicosapentaenoic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.82, n.12, p. 875-879, 2005.
- HARTMAN L; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. *Laboratory Practice*, v.22, n.3, p.475-473, 1973.
- HERNÁNDEZ, J.C. Patrimônio e globalização: o caso das culturas alimentares, capítulo de Antropologia e nutrição: um diálogo possível, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, p.129-143, 2005.
- IDRIS, N.A.; MAT DIAN, L.H. Interesterified palm products as alternatives to hydrogenation. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v.14, p. 396–401, 2005.
- ITABAIANA, I.; GONÇALVES, K.M.; CORDEIRO, Y.M.L.; ZOUMPANIOTI, M.; LEAL, I.C.R.; MIRANDA, L.S.M.; DE SOUZA, R.O.M.A.; XENAKIS, A. Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 96, p. 34–39, 2013.
- J.B.T. Food Tech (2013) Citros processing. Disponível em: www.jbtfoodtech.com/en/Solutions/Processes/Citrus-Processing, acessado em agosto de 2016.
- JIANG, Wen G.; BRYCE, Richard P.; HORROBIN, David F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. *Critical reviews in oncology/hematology*, v. 27, n. 3, p. 179-209, 1998.
- JÚNIOR, A.A.J.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, v.31, n.3, p.434-449, 1998.
- KABARA, J. J., SWIECZKOWSKI, D. M., CONLEY, A. J., & TRUANT, J. P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 2, n. 1, p. 23-28, 1972.
- KARABULUT, I.; TURAN, S.; ERGIN, G. Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. *European Food Research and Technology*, v.218, n.3, 224-229, 2004.
- KATO, T.; KOLENIC, N.; PARDINI, R.S. Docosahexaenoic acid (DHA), a primary tumor suppressive omega-3 fatty acid, inhibits growth of colorectal cancer independent of p53 mutational status. *HNUC*, v.58, p.178-187, 2008.
- KITAHARA, T.; AOYAMA, Y.; HIRAKATA, Y.; KAMIHIRA, S.; KOHNO, S.; ICHIKAWA, N.; HIGUCHI, S. In vitro activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.27, n.1, p.51-57, 2006.

- KLINKESORN, U.; H-KITTIKUN, A.; CHINACHOTI, P.; SOPHANODORA, P. Chemical transesterification of tuna oil to enriched omega-3 polyunsaturated fatty acids. ***Food Chemistry***, v.87, p. 415–421, 2004.
- KOBLITZ, M.G.B. Matérias-primas alimentícias, composição e controle de qualidade, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2011.
- LADANIYA, M. Citrus fruit – Biology, technology and evaluation. Elsevier Inc. San Diego, CA, 2009.
- LANZA, C.M. Processed and Derived Products of Oranges capítulo de Citrus Fruits/Processed and Derived Products of Oranges, ***Elsevier Science Ltda.***, p.1346-1348, 2003.
- LE PE, LOISON C, STRUYF S, SPRINGAEL JY, LANNOY V, DECOBECQ ME, BREZILLON S, DUPRIEZ V, VASSART G, VAN DJ, PARMENTIER M, DETHEUX M. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. ***The Journal of Biological Chemistry*** v 278, 25481–25489, 2003.
- LEE, JOUNG-SOOK; LEE, SUNG-WOO. The studies of composition of fatty acids and antioxidant activities in parts of omija (*Schizandra chinensis* Baillon). ***Journal of the Korean Society of Food Culture***, v. 6, n. 2, p. 147-153, 1991.
- LERMA-GARCÍA, M. J., D'AMATO, A., SIMÓ-ALFONSO, E. F., RIGHETTI, P. G., & FASOLI, E. Orange proteomic fingerprinting: From fruit to commercial juices. ***Food chemistry***, 196, 739-749, 2016.
- LESUISSE, E.; SCHANCK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme, ***European Journal of Biochemistry***, v. 216, p. 155–160, 1993.
- LIMA, L.A.R.S.; JOHANN, S.; CISALPINO, P.S.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. In vitro antifungal activity of fatty acid methyl esters of the seeds of *Annona 36 cornifolia* A.St.-Hil. (Annonaceae) against pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v. 44, n. 6, p. 777-780, 2011.
- LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils, ***Biochemical Engineering Journal***, v. 40, p. 445-451, 2008.
- LOPES, D.B.; FRAGA, L.P.; FLEURI, L.F.; MACEDO, G.A. Lipase and esterase to what extent can this classification be applied accurately? ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v.31, n.1, 2011.
- LUHRS H, GERKE T, MULLER JG, MELCHER R, SCHAUBER J, BOXBERGE F, SCHEPPACH W, MENZEL T. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. ***Scandinavian Journal Gastroenterology*** v 37, 458–466, 2002.

- MA, I.V.; MOURADIAN, M.; SORRETA, A.G.; KANG, S.; PARDINI, R.S. Decreasing omega-6 to omega-3 polyunsaturated fatty acid dietary ratios inhibit tumorigenesis in prostate cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Research**, v.75, n.15, p.906-906, 2015.
- MACE TA, KING SA, AMEEN Z, ELNAGGAR O, YOUNG G, RIEDL KM, SCHWARTZ SJ, CLINTON SK, KNOBLOCH TJ, WEGHORST CM, LESINSKI GB. Bioactive compounds or metabolites from black raspberries modulate T lymphocyte proliferation, myeloid cell differentiation and Jak/STAT signaling. **Cancer Immunology Immunotherapy** v. 63, 889–900, 2014.
- MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v.28, p.90-95, 1997.
- MAHADIK, N. D.; PUTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.38, p.715-721, 2002.
- MARTINS, E.S. Purificação de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido e caracterização bioquímica das mesmas. Tese apresentada ao Instituto de Biociências de campos de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de doutor em ciências biológicas, p. 132, 2006.
- MEQHWANSHI, G.K.; AGARWAL, L.; DUTT, K.; SAXENA, R.K. Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.40, n.3, p. 27-131, 2006.
- MEZNI, F.; MAAROUFI, A.; MSALLEM, M.; BOUSSAID, M.; KHOUJA, M.L.; KHALDI, A. Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* L. fruit oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n.39, p.5266-5271, 2012.
- MILLARD AL, MERTES PM, ITTELET D, VILLARD F, JEANNESSON P, BERNARD J. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. **Clinical & Experimental Immunology** v 130, 245–255, 2002.
- MORIN, C.; ROUSSEAU, E.; FORTIN, S. Anti-proliferative effects of new docosapentaenoic acid and monoacylglyceride in colorectal carcinoma cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.89, p.203–213, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological. Methods**, v.65, p. 55–63, 1983.

- MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.1, p. 63-70, 2002.
- MUCIDA D, PARK Y, KIM G, TUROVSKAYA O, SCOTT I, KRONENBERG M, CHEROUTRE H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science Immunology** v 317, 256–260, 2007.
- NARASIMHAN, B.; MOURYA, V.; DHAKE, A. Design, synthesis, antibacterial, and QSAR studies of myristic acid derivatives. **Bioorganic Medicina. Chemistry Letters**, v.16, p.3023-3029, 2006.
- NICOLAOU A, MAURO C, URQUHART P, MARELLI-BERG F. Polyunsaturated Fatty Acid-derived lipid mediators and T cell function. **Front Immunology**, 5-75, 2014.
- O`SHEA, N.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** v.16, p.1–10, 2012.
- O`FALLON, J. V.; BUSBOOM, J.R.; NELSON, M.L.; GASKINS, C.T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v.85, n.6, p.1511-1521, 2007.
- OKINO-DELGADO, C.H.; FLEURI, L.F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food chemistry**, v.163, p.103-107, 2014.
- OLIVEIRA, C.; ROSA, M.F. Enzymatic Transesterification of Sunflower Oil in an Aqueous Oil Biphase System. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.83, n.1, p.21-25, 2006.
- OLIVEIRA, N. A. J., CECCHI, C. R., HIGUTI, E., BARTOLINI, P., & PERONI, C. N. Enriquecimento de queratinócitos secretores de mGH em células-tronco mediante adesão rápida ao colágeno. In 56 **Congresso Brasileiro de Genética** pp. 287-287 2014.
- ÖZTÜRK, M., DURU, M. E., KIVRAK, Ş., MERCAN-DOĞAN, N., TÜRKÖGLÜ, A., & ÖZLER, M. A. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. **Food and Chemical Toxicology**, 49(6), 1353-1360, 2011.
- PARK, J.; CHO, S-Y.; CHOI, S-J. Purification and characterization of hepatic lipase from *Todarodes pacificus*, **BMB reports**, v. 41(3), p. 254-258, 2008.
- PERDOMO, L.; BENEIT, N.; OTERO, Y.F.; ESCRIBANO, Ó.; DÍAZ-CASTROVERDE, S.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, A.; BENITO, M. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. **Cardiovascular diabetology**, v.14, n.1, p.1-12, 2015.

- PEREIRA, E.B.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.20, n.4, p.343-355, 2003.
- PEREIRA, L. C.; SOUZA, A.O.; PAZIN, M.; DORTA, D.J. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.25, n.1, p.1-14, 2012.
- REINEHRA, C. O., RIZZARDIA, J., SILVA, M. F., OLIVEIRA, D., TREICHEL, H., & COLLA, L. A. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**, 37(3), 454-460, 2014.
- REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: **International Workshop Advances in Cleaner Production**, p. 1-11, 2009.
- RIBEIRO, A.P.B.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L.A.; GONÇALVES, L.A. Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: physico-chemical properties and food applications. **Food research international**, v.42, n.3, p.401-410, 2009.
- RODRIGUES, J.N.; GIOIELLI, L.A. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends *International Food Research*, v.36, p. 149–159, 2003.
- RUCHI, Gaur; ANSHU, Gupta; KHARE, S. K. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. **Bioresource technology**, v. 99, n. 11, p. 4796-4802, 2008.
- RUIZ-RODRIGUEZ, A.; REGLERO, G.; IBÁÑES, E. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 305– 326, 2010.
- SALEM, N.JR. Introduction to polyunsaturated fatty acids. **Backgrounder** , v.3, n.1, p.1-8, 1999.
- SÁ-PEREIRA, P.; DUARTE, J.C.; FERRARA, M.A.; LACERDA, P.S.B.; ALVES, F.C. Biocatálise: Estratégias de inovação e criação de mercados. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Interciência**, p. 433-462, 2008.
- SIDDIQUI, R.A.; HARVEY, K.A.; ZALOGA, G.P. Modulation of enzymatic activities by n-3 polyunsaturated fatty acids to support cardiovascular health. **The Journal of nutritional biochemistry**, v.19, p.417-437, 2008.
- SILVA, C.; GOIS, G.; SILVA, I.; SILVA, L.; ALMEIDA, R.; ABUD, A. Avaliação do potencial de uso do bagaço de laranja visando a produção de etanol 2g. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n.2, p.1139-1146, 2015.
- SILVEIRA, P. D. S. Avaliação do Potencial Antitumoral e do Mecanismo de Ação do Ditelureto de Difenila em diferentes linhagens de Glioblastomas, 2015.

- SIMOPOULOS, A.P. Genetic Variants in the Omega-6 and Omega-3 Fatty Acid Metabolic Pathways. *Nutrigenomics and Nutrigenetics in Functional Foods and Personalized Nutrition*, 83p, 2016.
- SKULAS-RAY, A.C.; KRIS-ETHERTON, P.M.; HARRIS, W.S.; HEUVEL, J.P.V.; WAGNER, P.R.; WEST, S.G. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.93, p.243-252, 2011.
- TALUKDER, M.M.R.; TAMALAMPUDY, S.; LI, C.J.; LE, Y.L.; WU, J.C.; KONDO, A. An improved method of lipase preparation incorporating both solvent treatment and immobilization onto matrix. *Biochemical Engineering*, v.33, p.60–65, 2007.
- VIDAL, W.N.; VIDAL, M.R.R. Botânica organografia – Quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- VINOLO MA, FERGUSON GJ, KULKARNI S, DAMOULAKIS G, ANDERSON K, BOHLOOLY Y, STEPHENS L, HAWKINS PT, CURI R. SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS One* v 6, 201-205, 2011.
- WANG, H.X.; WU, H.; HO, C.T.; WENG, X.C. Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food chemistry*, v.97, n.4, p.661-665, 2006.
- XUE, Z.; SHARPE, P.L.; HONG, S.P.; YADAV, N.S.; XIE, D.; SHORT, D.R.; POLLAK, D.W. Production of ômega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nature Biotechnology*, v.31, n.8, p.734-740, 2013.
- YAN, H.D.; ZHANG, Q.; WANG, Z. Biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters with high substrate loading by a whole-cell lipase from *Aspergillus oryzae*. *Catalysis Communications*, v.45, p.59-62, 2014.
- YFF, B.T.; LINDSEY, K.L.; TAYLOR, M.B.; ERASMUS, D.G.; JÄGER, A.K. The pharmacological screening of *Pentania prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. *J. Ethnopharmacol.*, v.79, p.101-107, 2002.
- ZAGO, E., BOTTON, V., ALBERTON, D., CÔRDOVA, J., YAMAMOTO, C. I., CÔCCO, L. C. & KRIEGER, N. (2014). Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. *Energy & Fuels*, 28(8), 5197-5203, 2014.
- ZHU, Q.Y.; HACKMAN, R.M.; ENSUNSA, J.L.; HOLT, R.R.; KEEN, C.L. Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p. 692-699, 2002.

ANEXOS

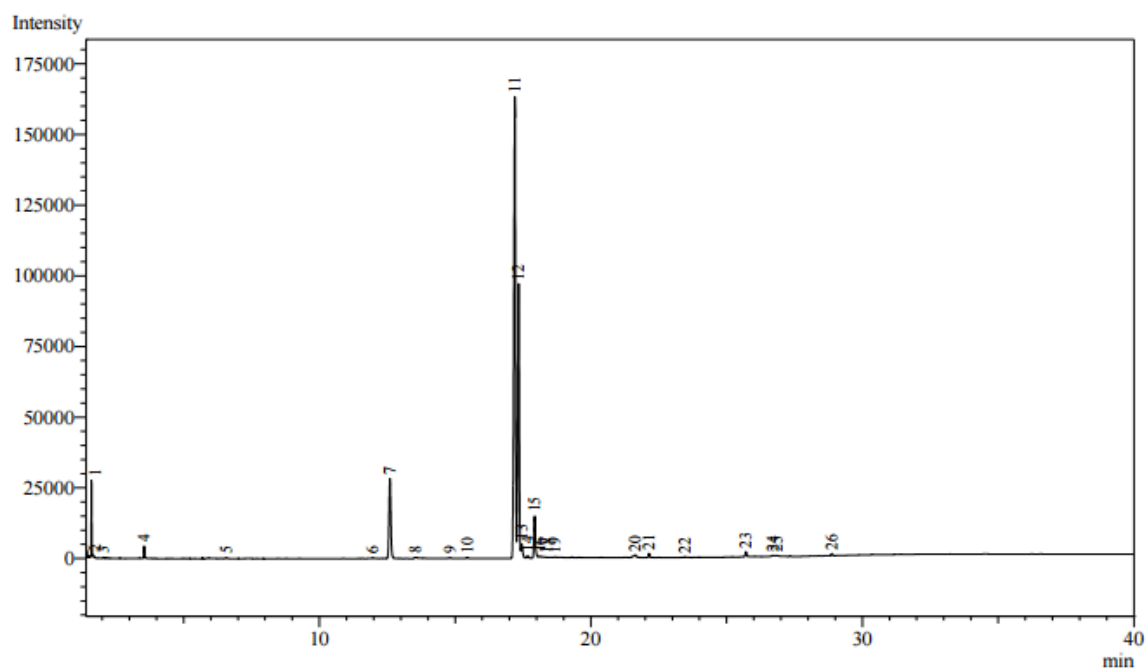


Figura 1: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de bagaço sobre óleo de oliva em reação de hidrólise.

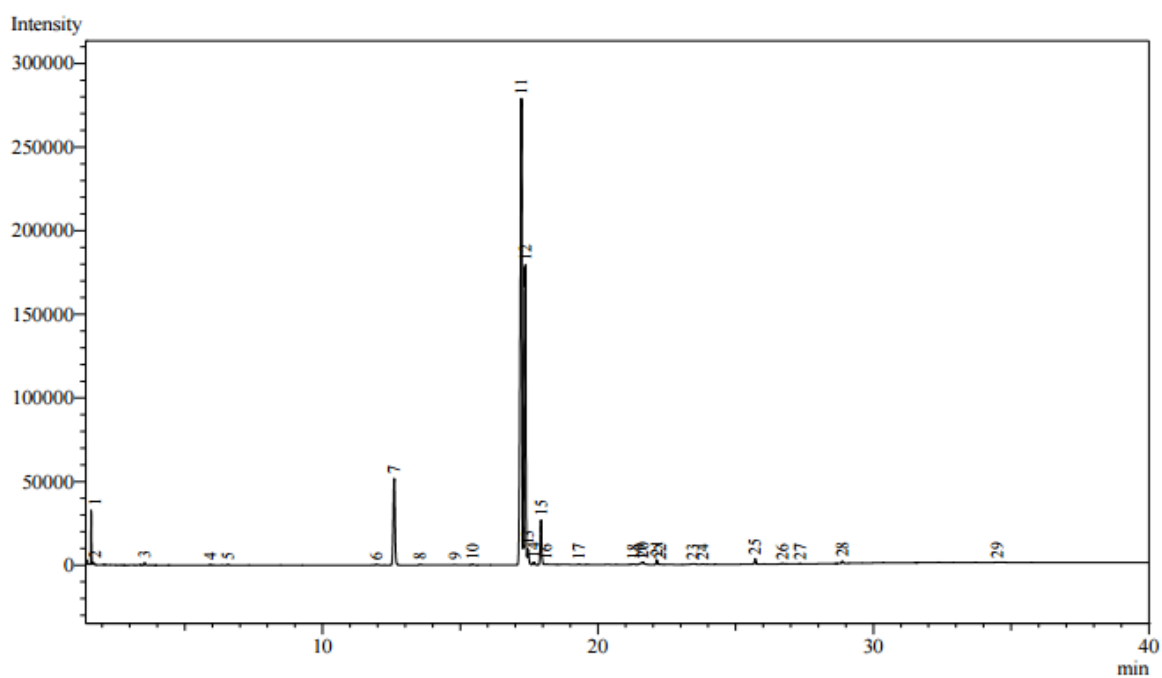


Figura 1: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de frit sobre óleo de oliva em reação de hidrólise.

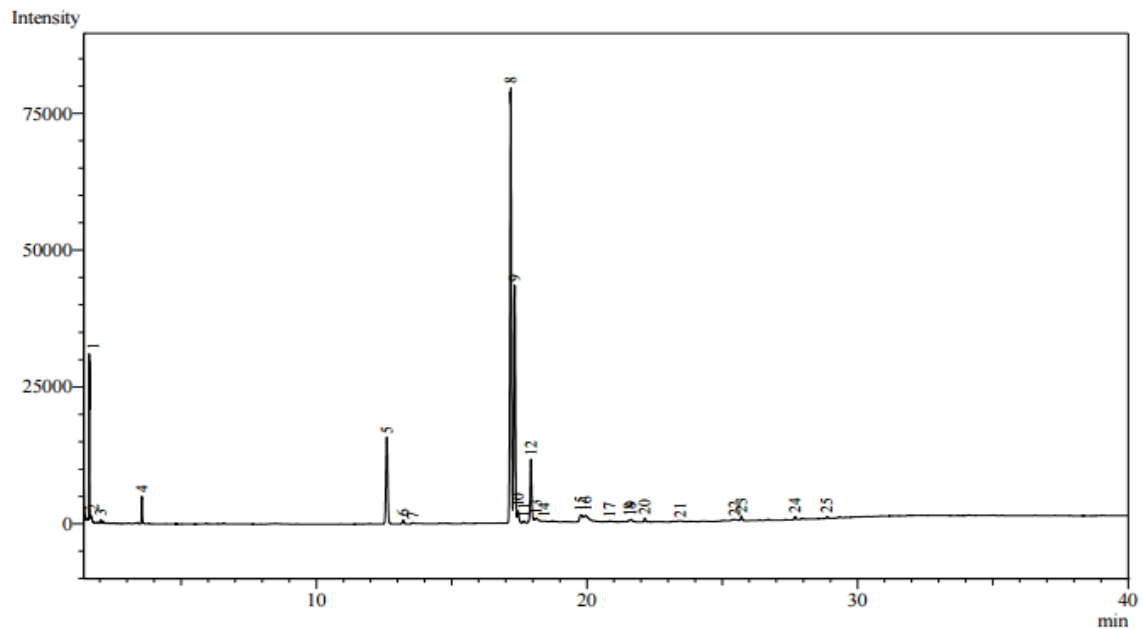


Figura 3: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de polpa sobre óleo de oliva em reação de hidrólise.

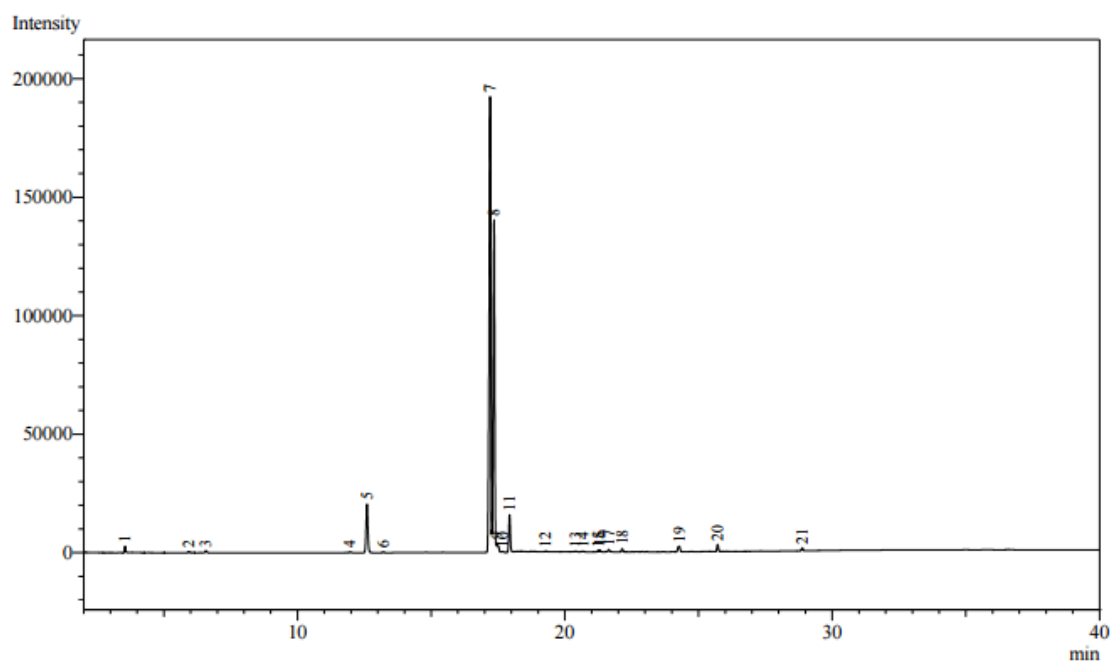


Figura 4: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de bagaço sobre óleo de girassol em reação de hidrólise.

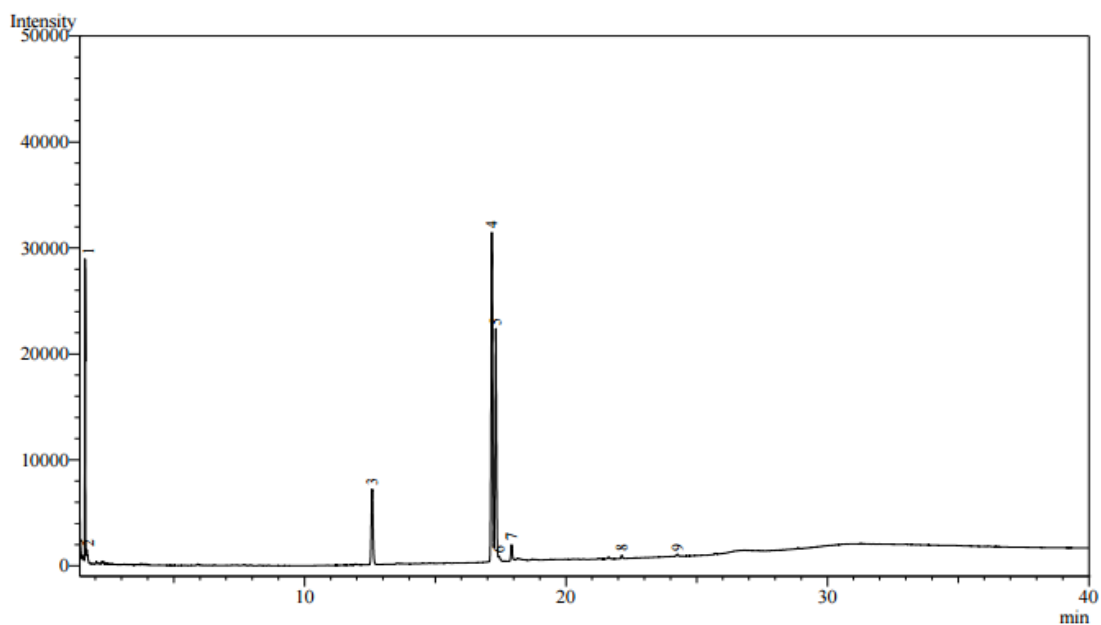


Figura 5: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de polpa sobre óleo de girassol em reação de hidrólise.

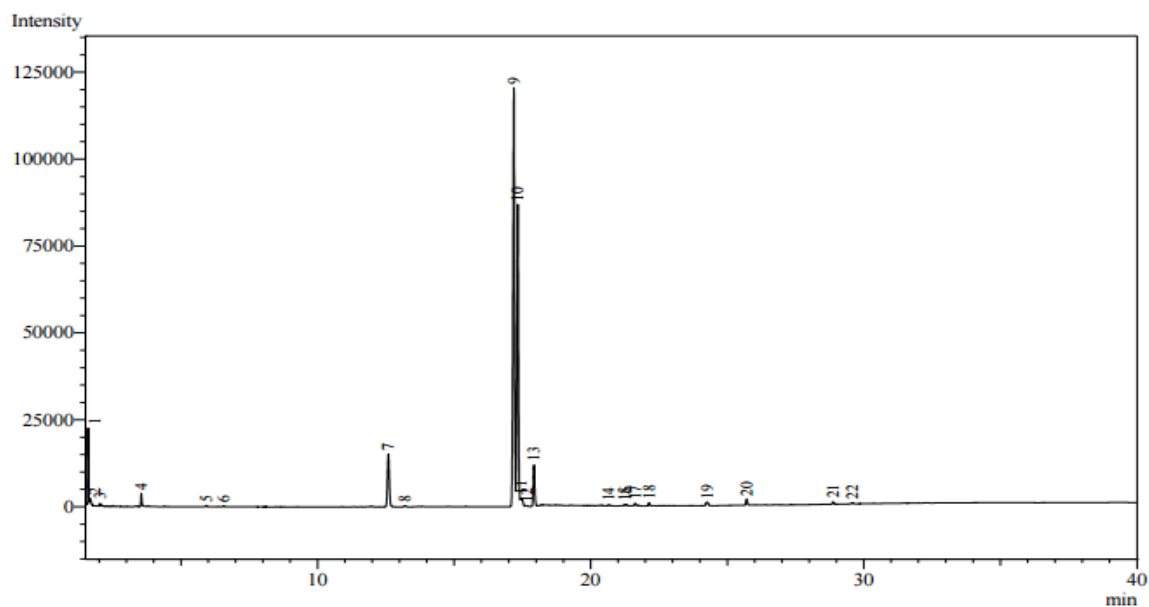


Figura 6: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de polpa sobre óleo de milho em reação de hidrólise.

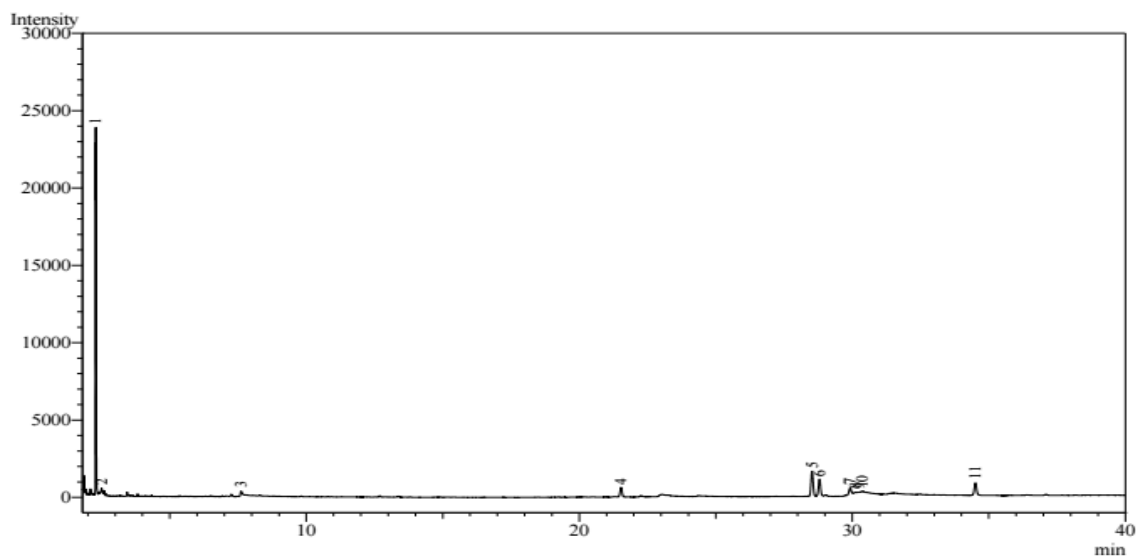


Figura 7: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de bagaço sobre óleo de mamona em reação de hidrólise.

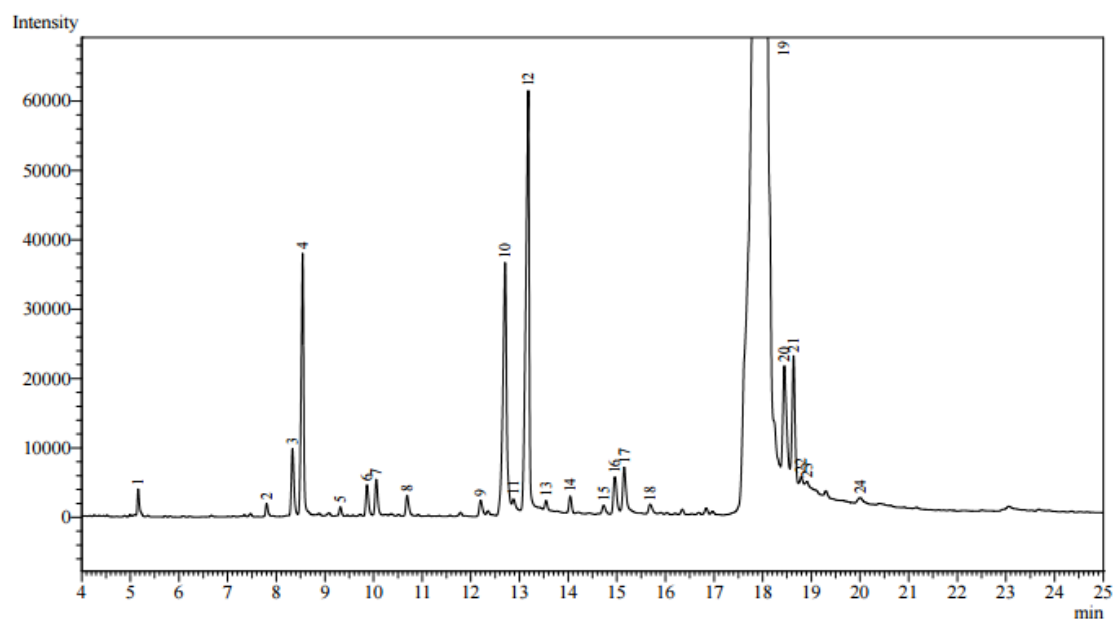


Figura 8: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de bagaço sobre óleo de dendê em reação de hidrólise.

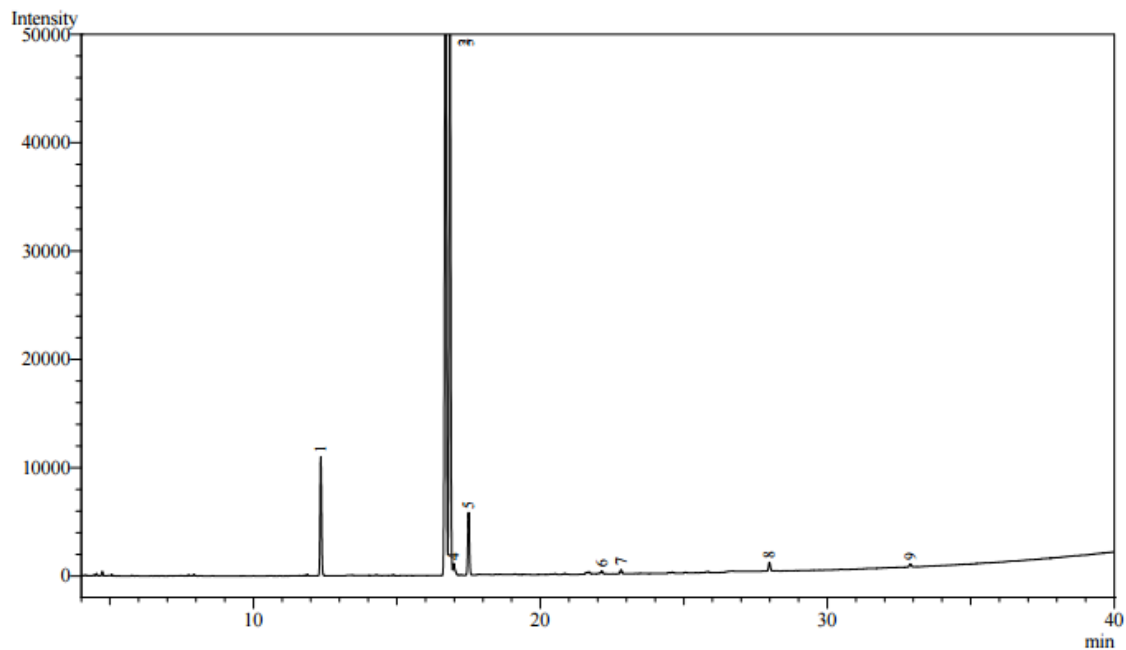


Figura 9: Perfil de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de casca sobre óleo de dende em reação de hidrólise.

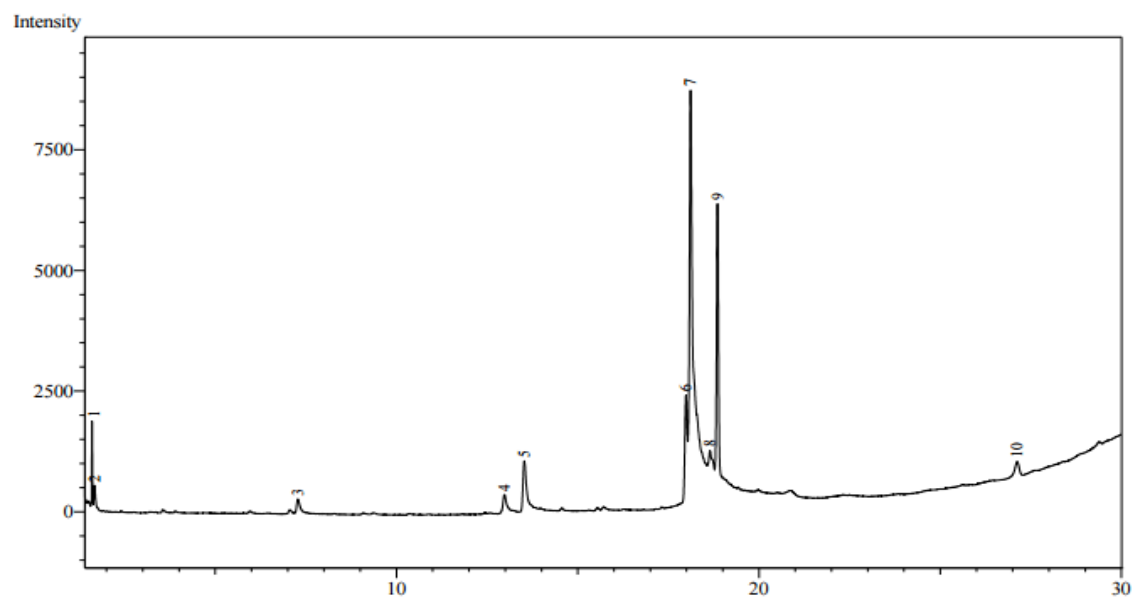


Figura 10: Perfil de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de bagaço sobre o ácido oleico e etanol em reação de esterificação.

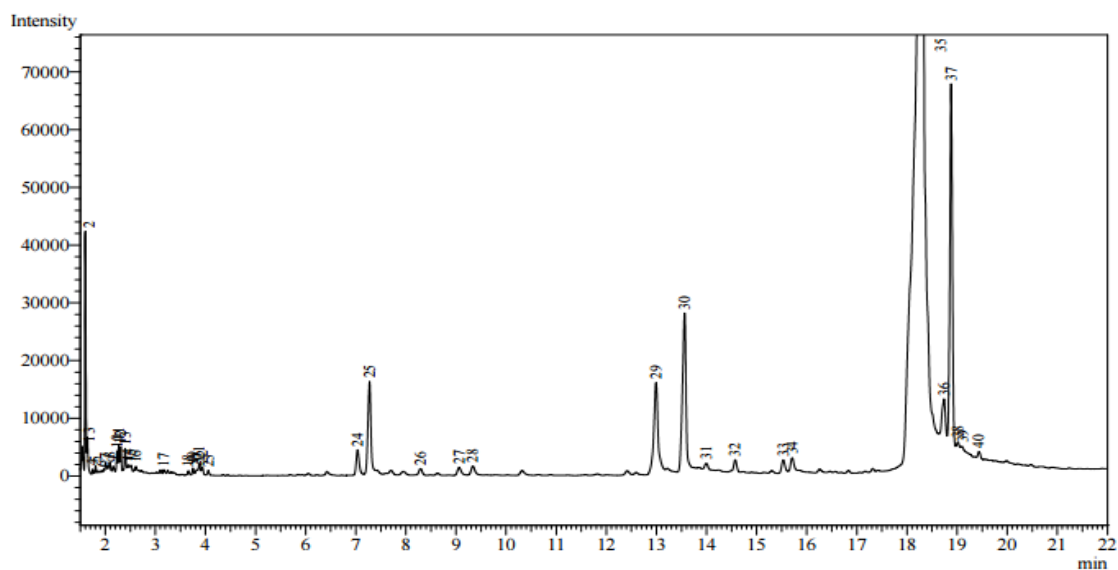


Figura 11: Perfil de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de casca sobre o ácido oleico e etanol em reação de esterificação.

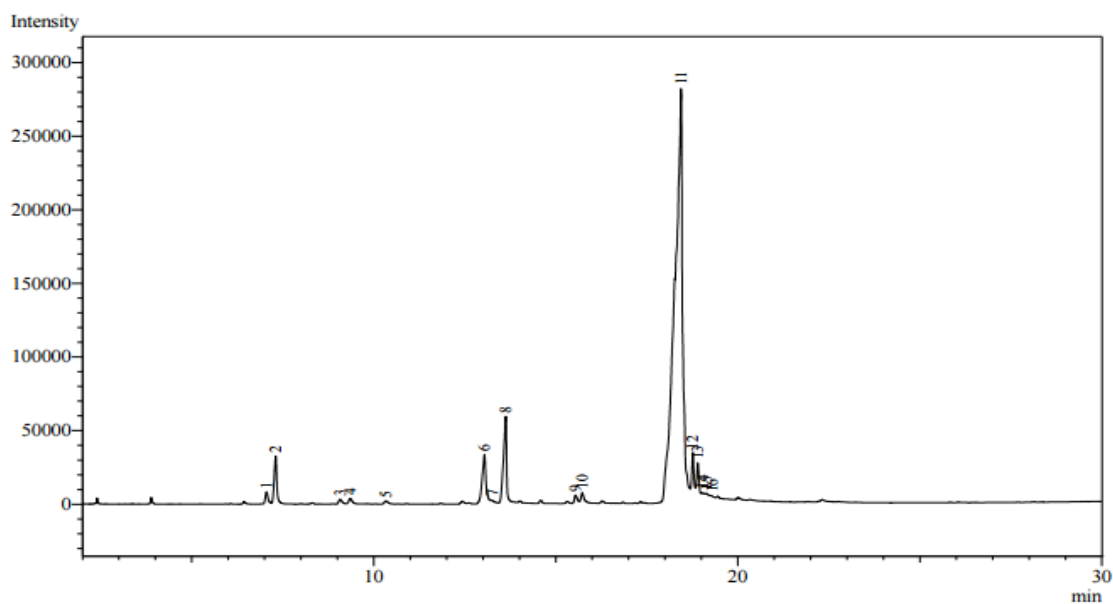


Figura 12: Perfil de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de frit sobre o ácido oleico e etanol em reação de esterificação.

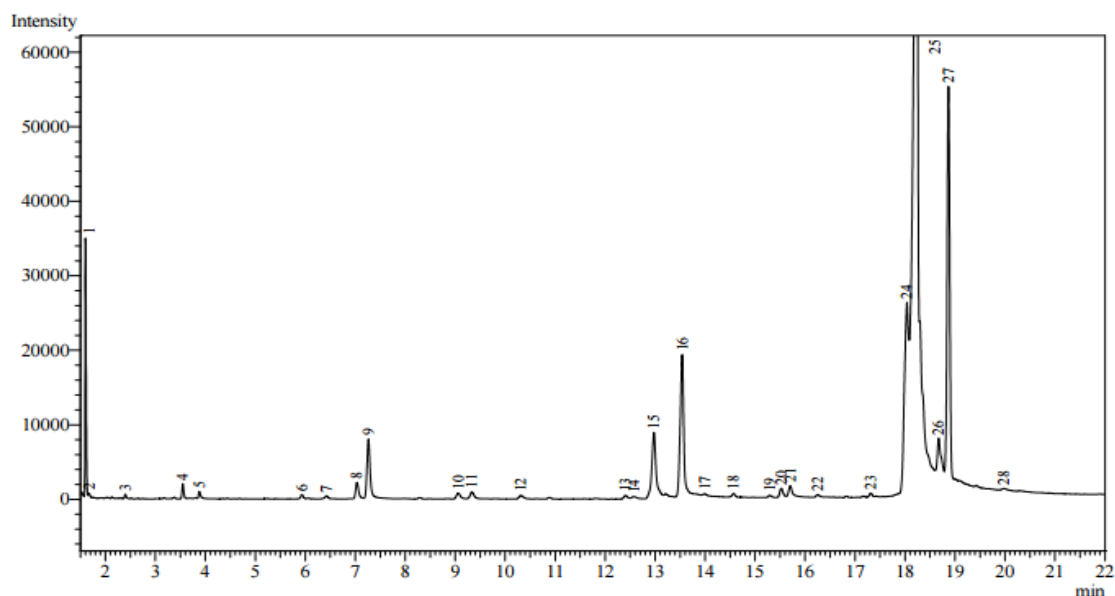


Figura 13: Perfil de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos resultantes da atuação da lipase de polpa sobre o ácido oleico e etanol em reação de esterificação.